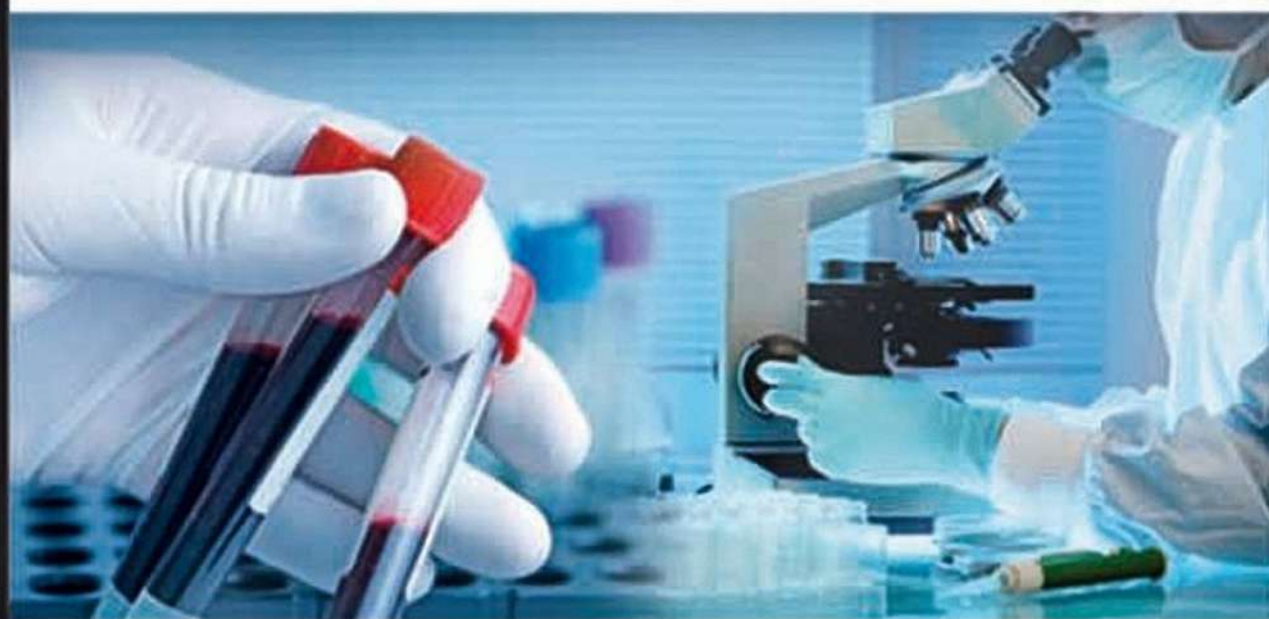


КЛИНИЧЕСКАЯ БИОХИМИЯ



С. В. Лелевич

С. В. ЛЕЛЕВИЧ

КЛИНИЧЕСКАЯ БИОХИМИЯ

Учебное пособие

Издание второе, стереотипное



САНКТ-ПЕТЕРБУРГ • МОСКВА • КРАСНОДАР
2018

ББК 28.072я73

Л 43

Лелевич С. В.

Л 43 Клиническая биохимия: Учебное пособие. — 2-е изд., стер. — СПб.: Издательство «Лань», 2018. — 304 с. — (Учебники для вузов. Специальная литература).

ISBN 978-5-8114-3354-4

В учебном пособии изложена информация по биохимическим методам определения различных веществ в биологических материалах. Приводится информация о лабораторных методах оценки белкового, углеводного, липидного, водно-электролитного и минерального обмена, а также КОС. Обсуждаются вопросы, касающиеся клинико-биохимических исследований в эндокринологии, коагулологии, а также онкологии.

Учебное пособие предназначено для студентов медико-диагностического и медико-профилактического факультетов.

ББК 28.072я73

Рецензенты:

А. И. ГРИЦУК — доктор медицинских наук, профессор,
зав. кафедрой биологической химии
Гомельского государственного медицинского университета;
В. К. КУХТА — доктор медицинских наук,
профессор кафедры биологической химии
Белорусского государственного медицинского университета.

Обложка
Ю. В. ГРИГОРЬЕВА

© Издательство «Лань», 2018
© Лелевич С. В., 2018
© Издательство «Лань»,
художественное оформление, 2018

СОДЕРЖАНИЕ

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ	4
ВВЕДЕНИЕ.....	6
АНАЛИТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ КЛИНИЧЕСКОЙ БИОХИМИИ	7
ЛАБОРАТОРНЫЕ МЕТОДЫ ОЦЕНКИ БЕЛКОВОГО ОБМЕНА	16
МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ НЕБЕЛКОВЫХ АЗОТСОДЕРЖАЩИХ КОМПОНЕНТОВ В КРОВИ И МОЧЕ	54
ЛАБОРАТОРНЫЕ МЕТОДЫ ОЦЕНКИ ПИГМЕНТНОГО ОБМЕНА	71
ЭНЗИМОДИАГНОСТИКА	80
ЛАБОРАТОРНАЯ ОЦЕНКА УГЛЕВОДНОГО ОБМЕНА	107
МЕТОДЫ ОЦЕНКИ ЛИПИДНОГО ОБМЕНА	120
ЛАБОРАТОРНАЯ ОЦЕНКА КИСЛОТНО-ОСНОВНОГО СОСТОЯНИЯ И ГАЗОВОГО СОСТАВА КРОВИ	139
ЛАБОРАТОРНАЯ ОЦЕНКА ВОДНО-ЭЛЕКТРОЛИТНОГО И МИНЕРАЛЬНОГО ОБМЕНА	158
ЛАБОРАТОРНЫЕ МЕТОДЫ ОЦЕНКИ МЕТАБОЛИЗМА ЖЕЛЕЗА	179
ЛАБОРАТОРНАЯ ОЦЕНКА СИСТЕМЫ ГЕМОСТАЗА	192
ЛАБОРАТОРНЫЕ МЕТОДЫ ОЦЕНКИ ГОРМОНАЛЬНОГО ОБМЕНА	228
НЕКОТОРЫЕ АСПЕКТЫ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ В ОНКОЛОГИИ	261
ЛАБОРАТОРНАЯ ОЦЕНКА ФУНКЦИЙ ПОЧЕК	271
КЛИНИКО-БИОХИМИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ПЕРИОДА БЕРЕМЕННОСТИ	292
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ	303

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ

АДГ	– антидиуретический гормон
АКТГ	– адренокортикотропный гормон
АлАТ	– аланинаминотрансфераза
АсАТ	– аспартатаминотрансфераза
АЧТВ	– активированное частичное тромбопластиновое время
АФП	– альфа-1-фетопротейн
БОФ	– белки острой фазы
БКЗ	– бромкрезоловый зеленый
БКФ	– бромкрезоловый фиолетовый
БО	– буферные основания
БФС	– бромфеноловый синий
ВМК	– ванилилминдальная кислота
ВЭЖХ	– высокоэффективная жидкостная хроматография
ГВК	– гомованилиновая кислота
ГГТП	– гамма-глутамилтранспептидаза
ГК	– гексокиназа
ГлДГ	– глутаматдегидрогеназа
ГЛ	– гонадолиберин
ИАП	– ингибиторы активаторов плазминогена
ИФА	– иммуноферментный анализ
КБГ	– кумасси бриллиантового голубого
КК	– креатинкиназа
КЛ	– кортиколиберин
КОС	– кислотно-основное состояние
17-КС	– 17-кетостероиды
ЛДГ	– лактатдегидрогеназа
ЛГ	– лютеинизирующий гормон
МДГ	– малатдегидрогеназа
МЕ	– международные единицы
МК	– мочева кислота
МНО	– международное нормализованное отношение
МСГ	– меланоцит-стимулирующий гормон
НСЕ	– нейронспецифическая енолаза
ОМ	– опухолевые маркеры
ПВ	– протромбиновое время

ПДФ	– продукты деградации фибриногена
ПИ	– протромбиновый индекс
ПО	– протромбиновое отношение
ПТТГ	– пероральный тест толерантности к глюкозе
ПРС	– пролактостатин
ПСА	– простатспецифический антиген
РИА	– радиоиммунный анализ
РЭА	– раково-эмбриональный антиген
РЭС	– ретикуло-эндотелиальная система
СКФ	– скорость клубочковой фильтрации
СЛ	– соматолиберин
СРБ	– С-реактивный белок
СС	– соматостатин
СТГ	– соматотропный гормон
ССК	– сульфосалициловая кислота
ТВ	– тромбиновое время
ТГ	– триглицериды
ТЛ	– тиреолиберин
ТПА	– тканевой активатор плазминогена
ТТГ	– тиреотропный гормон
ТХУ	– трихлоруксусная кислота
ХМ	– хиломикроны
ХС	– холестерол
ХЭ	– холинэстераза
ЩФ	– щелочная фосфатаза

ВВЕДЕНИЕ

Клиническая биохимия – клинико-диагностическая дисциплина, которая занимается разработкой и использованием стандартных методов диагностики, а также осуществляет контроль за течением заболеваний с позиций биохимии. Клиническая биохимия является важнейшим разделом клинической лабораторной диагностики наряду с лабораторной гематологией, иммунологией, клинической серологией и микробиологией, клинической токсикологией и др. Данная дисциплина располагает специфическим набором аналитического оборудования, использует множество диагностических методов и позволяет врачу-клиницисту оценить диагностически и прогностически значимые нарушения биохимических процессов в организме человека. Эта область клинической лабораторной диагностики достаточно бурно развивается. Современная клиническая биохимия позволяет существенно облегчить квалифицированную и обоснованную постановку диагноза, выбор лечения и оценку прогноза при многих заболеваниях.

Клинико-биохимические исследования выполняются практически всем пациентам. Их применяют главным образом для подтверждения или уточнения диагноза, характеристики формы, тяжести течения и определения прогноза болезни, выбора этиологической и патогенетической терапии, контроля за результатами лечения, а также для обнаружения патологии при скрининговых исследованиях.

В зависимости от клинических задач биохимические исследования могут выполняться однократно и многократно (в динамике), а также в процессе проведения функциональных или фармакологических тестов со стимуляцией или торможением этапов исследуемого обмена веществ, клеточных или гуморальных реакций либо других функций, выраженность или качество которых отражается в параметрах определяемого лабораторного показателя.

Биохимические технологии регулярно обогащаются новыми методами исследований. Повышение их диагностической чувствительности и специфичности способствует расширению объектов биохимического анализа. Помимо традиционного анализа сыворотки крови и мочи все шире в диагностических целях используются конденсат выдыхаемого воздуха, выпотная и слезная жидкость, ликвор, клеточные элементы и др. Широкое внедрение биохимических анализаторов позволяет проводить комплексный анализ с использованием все меньшего объема биологической пробы.

АНАЛИТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ КЛИНИЧЕСКОЙ БИОХИМИИ

Этапы лабораторного обследования

Лабораторное обследование пациента принято разделять на три этапа: *преаналитический, аналитический и постаналитический*. Аналитический этап полностью проходит в лаборатории, два других этапа имеют довольно существенную внелабораторную составляющую (рис.1).



Рисунок 1. – Этапы лабораторного исследования

Важно понимать, что, как и в любой сфере человеческой деятельности, ошибки, совершаемые в клинико-диагностических лабораториях, неизбежны. Задача каждой лаборатории с помощью системы контроля качества создать надежный набор инструментов, позволяющий выявить ошибки и проводить целенаправленные мероприятия, сводящие их к минимуму.

Под обеспечением качества понимается совокупность планируемых и систематически проводимых мероприятий, необхо-

димых для создания уверенности, что диагностическая информация, содержащаяся в авторизованном отчете, удовлетворяет определенным требованиям качества.

Вопрос стандартизации лабораторных исследований стоит достаточно остро. Лабораторное обследование начинается с назначения клиницистом перечня показателей, измерение которых необходимо для постановки диагноза или контроля за состоянием пациента. Одна из распространенных причин ошибок – неадекватное лабораторное обследование. Заведомо ценный тест не принесет пользы, если результат анализа никак не использовать.

Врач должен понимать, что лабораторные показатели, назначенные для подтверждения или исключения заболевания, могут принести больше вреда, чем пользы. Очевидно, что готового единого стандарта по проведению преаналитического этапа нет и, видимо, не будет. Есть различия в организации работы централизованной лаборатории и лаборатории, обслуживающей стационар. В данном случае каждому лечебно-профилактическому учреждению, опираясь на признанные международные и отечественные стандарты и рекомендации, следует разработать и утвердить стандарт проведения данного этапа лабораторного исследования.

Подготовка пациента к лабораторным исследованиям – одна из важнейших составляющих преаналитического этапа. Здесь обязательно должны быть выполнены определенные действия:

1. Врач-клиницист должен объяснить пациенту необходимость лабораторного исследования.
2. Медицинская сестра должна информировать пациента о том, как ему нужно подготовиться к исследованию.

Лабораторная часть преаналитического этапа начинается с момента доставки пробы и заявки в лабораторию. Выделяют следующие этапы этой части:

- организация приема проб и заявок;
- идентификация проб, центрифугирование;
- хранение проб до анализа;
- выявление влияний (гемолиз, липемия) и примесей (метаболиты лекарств, загрязнения);
- распределение проб по рабочим местам.

В лаборатории рекомендуется организовать отдельное место для приема биологического материала. При его поступлении в КДЛ регистратор проверяет соответствие проб направлениям, их состояние, время взятия и доставки материала. Специалистом клинической лабораторной диагностики должны быть определены и утверждены критерии отказа в приеме материала на исследование (например, расхождение между данными заявки и этикетки на пробирке, невозможность прочесть заявку, материал взят не с тем антикоагулянтом или консервантом, существует превышение сроков доставки, наличие сгустков в цельной крови с антикоагулянтом). После центрифугирования наиболее частые критерии отказа – гемолиз, а также мутность пробы.

Центрифугированию подвергается различный материал, который в дальнейшем предполагается использовать для лабораторных исследований. Оценка времени центрифугирования – это прежде всего определение соответствия его времени и условий данному виду материала.

Основная форма контроля преаналитического этапа – периодические внешние и внутренние проверки. Проблема контроля этого этапа лабораторных исследований остается на сегодняшний день одной из серьезнейших проблем современной лабораторной медицины.

В современных клиниках, клинико-диагностических лабораториях около 90-95% образцов крови и других биологических образцов забирается при помощи вакуумных систем (рис. 2).



Рисунок 2. – Вакуумная система для забора крови

Сравнение расходов на открытое взятие крови (шприцем), на пробирки для анализаторов, шприцы, иглы, моющие и дезинфицирующие средства, электроэнергию, дополнительное оборудование для мойки пробирок, учет боя стекла, приобретение необходимых реагентов и оплата труда персонала, с одной стороны, а также приобретение современных систем для взятия биологического материала, с другой, по экономическим затратам соизмеримо. Но фактор значительного снижения риска заражения персонала гепатитом и ВИЧ при использовании систем для забора крови (на протяжении всего времени взятия крови соблюдается стерильность забираемого образца, исключается контакт с кровью пациента гарантируя защиту медперсонала, безопасную транспортировку биоматериала) в сравнении с процедурой открытого взятия крови (шприцем) играет особо важную роль.

Без внедрения вакуумных или иных систем для взятия крови и образцов биологических жидкостей в широкую практику нельзя ожидать улучшения преаналитического этапа, а главное, – обеспечения качества лабораторного исследований в целом.

Биологический материал, используемый в биохимических исследованиях

Наиболее распространенным материалом для клиническо-биохимических исследований являются кровь, моча и некоторые другие биологические жидкости. Кровь рекомендуется брать утром (между 8 и 10 часами), до физической нагрузки и проведения диагностических процедур. За сутки до взятия крови прием пищи может быть обычным (следует исключить употребление алкоголя). Если для выполнения подавляющего большинства тестов взятие крови производят после 8-10 ч голодания, то для определения триглицеридов требуется выдержать 10-12-часовой интервал после приема пищи.

Непосредственно перед взятием крови пациенту необходимо предоставить отдых в положении сидя в течение 10-15 мин. (в процессе взятия крови рука пациента располагается под углом 45°). У пациентов, которым предписан строгий постельный режим, взятие крови осуществляют между 7 и 9 ч утра; при этом рука пациента, лежащего в постели, должна находиться в горизонтальном положении. Следует иметь в виду, что при пребыва-

нии человека в течение нескольких часов в горизонтальном положении объем плазмы оказывается на 10-15% больше.

Таблица 1. – Основные виды биологического материала, исследуемого для биохимических исследований

Цельная венозная кровь	Берется из крупных вен (чаще из локтевой) в пробирку, содержащую антикоагулянты (ЭДТА) для гематологических исследований
Цельная артериальная кровь	Берется из крупных артерий (чаще бедренной или подключичной) в пробирку, которая содержит антикоагулянт. Взятие артериальной крови требует особой осторожности и должно выполняться врачом. Наиболее часто применяется в этом случае антикоагулянт гепарин. Чаще всего артериальная кровь используется для исследования параметров КОС
Цельная капиллярная кровь	Забирают гепаринизированными капиллярами для газометрических, морфологических исследований, а также для определения глюкозы и электролитов
Плазма	Получают после центрифугирования крови и отделения клеточных элементов. В зависимости от вида антикоагулянта выделяют гепаринизированную, цитратную и плазму с ЭДТА
Сыворотка	Это плазма, лишенная фибриногена. Кровь для получения сыворотки берут в сухую стеклянную или пластиковую пробирку, содержащую активаторы свертывания. После того как произошло свертывание крови, кровь следует центрифугировать и отделить сыворотку от сгустка
Моча для «общего анализа»	Утренняя порция мочи, которую следует как можно быстрее доставить в лабораторию
«Суточная моча»	Моча, собранная в течение суток. Первая утренняя порция мочи не учитывается, затем собирают все порции мочи в течение суток, включая утреннюю порцию мочи следующих суток

Положение тела оказывает влияние на концентрацию общего белка, альбумина, креатинина, холестерина, триглицеридов, активность щелочной фосфатазы, аспартатаминотрансферазы и других компонентов плазмы. Содержание этих веществ и активность ферментов значительно повышается при переходе пациента

в вертикальное положение, и наоборот, уменьшается – в горизонтальном. Максимальное изменение характерно для уровня общего белка, активности ферментов (11%) и содержания кальция (3-4%). При взятии крови путем венепункции время сдавления сосуда жгутом по возможности должно быть минимальным.

Если нет возможности пользоваться одноразовым шприцем, то обычный, многоразовый, нужно кипятить только в дистиллированной воде, нельзя промывать его изотоническим раствором натрия хлорида. Во избежание гемолиза кровь следует брать сухим шприцем, сухой иглой, в сухую пробирку, соблюдая стерильные условия. Если набранная в шприц кровь переносится в пробирку, эту процедуру осуществляют медленно (для предотвращения вспенивания крови).

Таблица 2. – Изменения биохимических показателей при разных ошибках преаналитического этапа

Показатель	Причина ошибки
Альбумин ↑	Длительное наложение жгута при венепункции
Билирубин ↓	Длительная экспозиция пробы на свету
Бикарбонат ↓	Открытая пробирка с пробой
Кальций ↑	Длительное наложение жгута при венепункции
Холестерол ↑	Пациент не голодал 12 ч до исследования
ГГТП ↑	Прием алкоголя, барбитуратов или фенитаина
Глюкоза ↓	Не добавлен фторид натрия
Калий ↑	Длительное хранение крови, гемолиз
Общий белок ↑	Длительное наложение жгута при венепункции

При исследовании системы гемостаза к процессу взятия крови предъявляется ряд дополнительных требований. Так, рекомендуется использовать иглу с широким просветом, лучше без шприца (его применяют для взятия крови у детей, у взрослых пациентов с явлениями гипотензии, а также находящихся в терминальном состоянии). Дезинфекцию кожи осуществляют обработкой соответствующего ее участка над местом прокола (обычно в локтевом сгибе) 70% этиловым спиртом. Поскольку при прохож-

дении иглы через кожу в ее просвет перемещаются тканевая жидкость и фрагменты тканей, которые в дальнейшем существенно повлияют на коагулологические тесты, первые 0,5-1,0 мл вытекающей крови нельзя использовать для коагулограммы. Однако эту порцию крови можно применять для других биохимических исследований.

Чтобы исключить влияние на коагуляцию последствий венозного застоя, рекомендуют в процессе ее взятия на непродолжительное время (2-3 с) расслабить жгут. Кровь должна стекать по стенке пробирки. Если требуется получить плазму, в пробирку заранее добавляют соответствующий антикоагулянт. Кровь с антикоагулянтом осторожно перемешивают, закрывают пробирку кусочком полиэтиленовой пленки и оставляют в штативе на 20-25 мин. Интенсивное встряхивание вызывает гемолиз эритроцитов, что искажает параметры коагулограммы. Поэтому плазма с признаками гемолиза не пригодна для данного исследования.

Методы клинической биохимии

Из всех известных методов анализа в клинической биохимии практическую основу составляют физико-химические методы.

Это методы, позволяющие изучать какой-либо биологический материал, полученный от пациента, во взаимосвязи между химическими, физическими и физико-химическими его свойствами.

В зависимости от свойств исследуемой системы физико-химические методы подразделяются следующим образом:

1. Оптические.
2. Электрохимические.
3. Хроматографические.
4. Кинетические и др.

В работе клинико-диагностических лабораторий чаще используются оптические методы анализа:

- Рефрактометрия.
- Поляриметрия.
- Фотометрия:

А. Абсорбционная:

- Спектрофотометрия.
- Нефелометрия.
- Атомно-абсорбционная фотометрия.

Б. Эмиссионная:

- Флюориметрия.
- Пламенная фотометрия.
- Атомно-эмиссионный спектральный анализ.

Оптический количественный анализ основан на регистрации изменений, происходящих с лучом света при прохождении его через исследуемый раствор:

- Интенсивности поглощения (абсорбционная фотометрия).
- Свечения молекул и атомов вещества (флюориметрия, пламенная фотометрия).
- Величины отклонения монохроматического светового потока от первоначального направления его распространения (рефрактометрия).
- Изменения угла вращения плоскополяризованного света (поляриметрия).

В работе клинико-диагностических лабораторий используются следующие виды оптических измерительных приборов:

1. Фотометры и спектрофотометры.
2. Денситометры (сканирование разделенных на носителях фракций анализируемых веществ – белков, ЛП и др.)
3. Нефелометры и турбидиметры (определение содержания взвешенных в объеме жидкости частиц по интенсивности светорассеяния).
4. Флюориметры (определение концентрации сложных органических веществ (гормоны, витамины и др.) путем измерения интенсивности флюоресценции).
5. Пламенные фотометры (измерение светоизлучения внесенных в пламя ионов металла)
6. Люминометры (измерение количества излученного света).
7. Атомные абсорбциометры (измерение монохроматического светового потока атомами вещества, находящегося в раскаленном газе).

Помимо оптических методов анализа в современных клинико-диагностических лабораториях достаточно широко используются методы фракционирования компонентов биологических жидкостей и тканей (хроматография и электрофорез), а также иммунологические исследования (иммуноферментный, радиоиммунологический и иммунофлюоресцентный анализы).

ЛАБОРАТОРНЫЕ МЕТОДЫ ОЦЕНКИ БЕЛКОВОГО ОБМЕНА

Методы определения общего белка в крови

Среди методов определения концентрации общего белка в биологических материалах можно выделить несколько основных групп, основанных на разных принципах:

1. Азотометрические.
2. Гравиметрические.
3. «Преципитационные».
4. Спектрофотометрические.
5. Рефрактометрические.
6. Колориметрические.

Кроме перечисленных методов разработаны флюориметрические, поляриметрические методы, а также атомно-абсорбционная спектрофотометрия.

Азотометрические методы

Азотометрические методы определения общего белка основаны на определении количества белкового азота, образующегося при разрушении аминокислот. Впервые метод был предложен *Къедалем* в 1883 г. В этом методе азот, содержащийся в составе белков, окисляют до иона аммония и его количество определяют титрованием раствором соляной кислоты. Исходя из того, что белки биологических жидкостей содержат в среднем 16% азота, полученное в результате анализа его количество умножают на коэффициент 6,25. Для отдельных фракций белка в сыворотке или плазме величина фактора колеблется в диапазоне 5,69-6,52.

Недостатком азотометрических методов является длительность и сложность процедуры. Автоматизация позволяет использовать этот метод в ряде случаев в качестве метода сравнения.

Гравиметрические методы

Гравиметрические (весовые) методы определения общего белка основаны на высушивании белков до постоянной массы и их взвешивании на аналитических весах. Методы трудоемки и практически не используются. Гравиметрический метод в на-

стоящее время может использоваться в некоторых лабораториях для определения фибриногена в плазме крови.

«Преципитационные» методы

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

Результаты данных методов зависят от следующих факторов:

- скорости смешивания реактивов;
- температуры реакционной смеси;
- значения pH среды;
- присутствия посторонних соединений;
- способов фотометрии.

Тщательное соблюдение условий реакции способствует образованию стабильной суспензии с постоянным размером взвешенных частиц и получению воспроизводимых результатов.

Спектрофотометрические методы

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

Рефрактометрические методы

Данные методы основаны на способности растворов белка к преломлению светового потока. При температуре 17,5° С показатель преломления воды равен 1,33. При той же температуре показатель преломления сыворотки колеблется в пределах 1,34-1,35. В связи с тем, что концентрация электролитов и небелковых органических соединений, влияющих на ее преломляющую способность, невелика и достаточно постоянна в сыворотке здорового человека, величина показателя преломления сыворотки крови зависит в первую очередь от содержания в ней белков.

Колориметрические методы

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

Методы определения альбумина в крови

Методы определения альбумина в сыворотке крови можно разделить на две группы: *непрямые и прямые*. К непрямым методам относят методы, в которых альбумин определяют с помощью различных физико-химических реакций.

Методы фракционного осаждения

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

1. Глобулины осаждают сульфатом аммония, после чего осадок отделяют центрифугированием.

2. В надосадочной жидкости концентрацию альбумина определяют с помощью биуретовой реакции.

В настоящее время данная группа методов практически не используется, т.к. они сложны, неспецифичны и плохо поддаются автоматизации.

Электрофорез

После разделения белков сыворотки крови на носителе, фиксации и окраски процентное соотношение между различными фракциями рассчитывают с помощью денситометрии. Концентрацию определяют исходя из уровня общего белка в исследуемом образце сыворотки и процентного содержания альбумина.

Колориметрические методы

Данная группа методов основана на образовании комплекса альбумин-краситель. Это позволяет проводить фотометрию в присутствии избытка последнего, необходимого для насыщения всех связывающих сайтов альбумина, что дает возможность всем молекулам альбумина принимать участие в реакции.

Наиболее распространенным красителем, используемым для определения альбумина, является *бромкрезоловый зеленый*, который был предложен *F. Rodkey* в 1965 г. Реакцию обычно проводят при *pH* 4,2-4,5, фотометрию осуществляют при 620-630 нм.

В качестве красителей (рис. 3), применяемых для определения альбумина, могут быть использованы:

- бромкрезоловый зеленый (БКЗ);
- бромкрезоловый фиолетовый (БКФ);
- бромфеноловый синий (БФС).

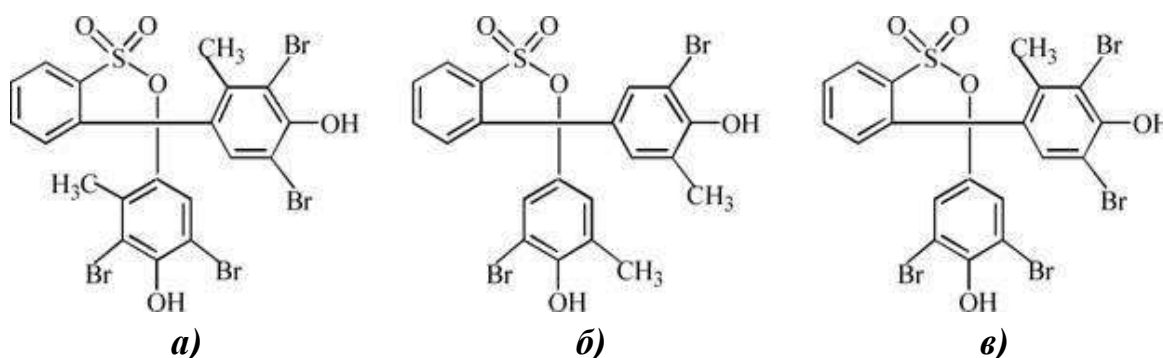


Рисунок 3. – Структурные формулы бромкрезолового зеленого (а), бромкрезолового фиолетового (б) и бромфенолового синего (в)

Методы, основанные на связывании с БКЗ, в настоящее время практически повсеместно используют в КДЛ для определения альбумина в крови, другие красители вышли из употребления из-за нежелательных вмешательств в реакцию и невысокой специфичности методов. БКЗ в качестве реактива также используют для определения альбумина сыворотки с помощью технологии «сухой химии».

Электрофорез белков сыворотки крови

Принцип электрофоретического разделения молекул состоит в их движении с разной скоростью в постоянном электрическом поле. Наиболее часто в клинической практике используется электрофорез на поддерживающих средах-носителях – хроматографической бумаге, ацетатцеллюлозных мембранах, различных гелях, а также на комбинированных средах. Электрофорез на бумаге до недавнего времени широко применялся во многих лабораториях, однако он имеет много недостатков.

Электрофорез в агарозном, крахмальном и особенно в полиакриламидном геле дает существенно лучшие результаты, позволяя идентифицировать большее количество белковых фракций, но и ему присущи недостатки – сложность приготовления геля или дороговизна готовых гелевых пластин. Использование мембран из ацетата целлюлозы позволяет достигнуть компромисса. Применение ацетатцеллюлозных мембран позволяет повысить четкость фракционирования и значительно сократить время, требуемое для разделения, окраски и анализа.

Знак и величина электрического заряда молекул белков сыворотки крови, а значит, направление и скорость их движения при электрофоретическом разделении, зависят от значения рН и ионной силы среды. Кроме того, скорость движения белковых молекул определяется их молекулярной массой, ионным окружением, приложенным напряжением и другими факторами. В связи с этим для получения сопоставимых данных электрофорез должен осуществляться при строго определенных значениях указанных параметров.

Электрофорез белков, позволяющий определить их количественные сдвиги и физико-химические характеристики, помогает выявить заболевания печени и почек, иммунной системы, неко-

торые злокачественные новообразования, острые и хронические инфекции, генетические нарушения и др.

Выделяют несколько так называемых электрофоретических «синдромов» – типичных картин электрофореграмм, характерных для некоторых патологических состояний:

1. Острое воспаление с активацией системы комплимента и увеличением синтеза острофазных белков (α 1-антитрипсина, гаптоглобина, фибриногена). Оно проявляется увеличением зоны α 1- и α 2-глобулинов и сопровождается ростом СОЭ, концентрации С-реактивного белка и фибриногена.

2. Хроническое воспаление с усилением синтеза ряда острофазных белков, а также иммуноглобулинов. Проявляется умеренным возрастанием α 2- и β -глобулинов, повышением γ -глобулинов и некоторым снижением альбумина. Подобные отклонения могут наблюдаться при хронических инфекциях, коллагенозах, аутоиммунных процессах и при малигнизации опухолей.

3. Тяжелые заболевания печени сопровождаются снижением синтеза альбумина и α -глобулинов. При хронических гепатитах и циррозах печени возрастает как относительное, так и абсолютное количество γ -глобулинов (β - и γ -фракции могут сливаться из-за накопления IgA).

4. Нефротический синдром сопровождается увеличением фильтрации белков в почках и селективной протеинурией – потерей с мочой большого количества альбумина и части низкомолекулярных глобулинов. При этом в печени усиливается синтез более крупных протеинов семейства α 2-глобулинов, которые накапливаются в крови и формируют картину со значительным снижением альбумина и повышением α 2-глобулинов.

5. Нарушение всасывания или значительная потеря белков возможны как при нефротическом синдроме, так и при массивных ожогах, патологии желудочно-кишечного тракта и т.д. В последнем случае снижается абсолютное содержание общего белка, особенно альбумина, а на протеинограмме оказывается уменьшенной доля альбумина при относительно равномерном возрастании всех глобулинов.

6. Тяжелый иммунодефицит врожденного или приобретенного генеза обычно сопровождается выраженным снижением

γ-глобулиновой фракции. При этом желательно провести дополнительное количественное определение Ig.

7. Парапротеинемия при злокачественных и доброкачественных процессах – симптом, для выявления которого именно электрофорез является методом выбора. При накоплении в крови моноклональных иммуноглобулинов или фрагментов их цепей, как бывает, в частности, при миеломной болезни и некоторых лейкозах, на протеинограмме появляется более или менее острый пик в области от α₂- до γ-глобулинов (так называемый М-градиент), хорошо заметный визуально. Электрофорез белков мочи, проведенный параллельно, в этом случае выявляет пик, находящийся в той же области.

Нарушения белкового обмена

Гипопротеинемии

Гипопротеинемией называется состояние, сопровождающееся снижением концентрации общего белка в крови **ниже 65 г/л**.

Гипопротеинемии можно разделить на относительные (при гипергидратации) и абсолютные (гипоальбуминемии). Опасным для жизни является снижение концентрации общего белка **ниже 40 г/л**, альбумина – **ниже 20 г/л**. При таких концентрациях онкотическое давление крови крайне низкое, происходит перемещение жидкости из сосудистого русла, что приводит к отекам и выпотам в полости тела, а также к гиповолемии. При большинстве патологических состояний, приводящих к гипопротеинемии, наблюдается изменение соотношения концентраций отдельных белков плазмы (**диспротеинемия**).

Причины абсолютных гипопротеинемий

1. Снижение синтеза белка:

- Нарушение питания (недостаток белка в пище).
- Нарушения всасывания (инфекции органов ЖКТ, муковисцидоз, целиакия).
- Болезни печени.

2. Повышение экскреции белка:

- Почечные причины (гломерулонефрит, СД и др.).

- Энтеропатии с потерей белка.
- Ожоги.
- Экссудативные дерматозы.

Причины гиперпротеинемий:

1. Гипер- γ -глобулинемии:

а) поликлональные:

- хронические болезни печени (цирроз, хронический гепатит);
- аутоиммунные заболевания;

б) моноклональные:

- миеломная болезнь;
- макроглобулинемия Вальденстрема;
- болезни тяжелых цепей;
- опухоли лимфатической системы.

2. Обезвоживание.

3. Артефакты.

Моноклональные гипер- γ -глобулинемии

Отображением данного вида гаммапатий на электрофореграмме является М-градиент – четкая, насыщенная полоса на границе β - и γ -глобулинов либо в зоне γ -глобулинов (рис. 4).

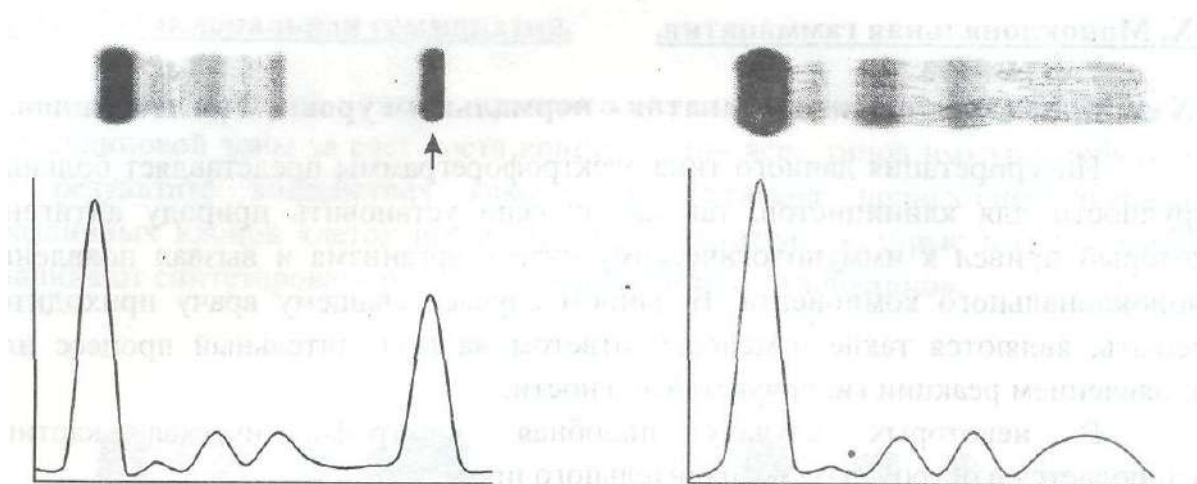


Рисунок 4. – М-градиент на электрофореграмме, расположенный в зоне γ -глобулинов (слева); нормальная электрофореграмма сыворотки крови (справа)

Виды моноклональных компонентов:

- Синтез преимущественно легких цепей Ig (κ , λ).
- Синтез преимущественно тяжелых цепей Ig (γ , α , μ , σ , ξ).
- Синтез полноценных молекул Ig (легкие и тяжелые цепи).

Референтные значения в крови:

Общий белок – 65-85 г/л

Альбумин – 35-50 г/л

Парапротеинемические гемобластозы

Парапротеинемические гемобластозы (греч. *para* около + *протеинемия*) – группа опухолевых заболеваний системы крови, основной признак которых – это секреция моноклональных иммуноглобулинов (парапротеинов) и (или) их фрагментов.

Моноклональные иммуноглобулины у пациентов с парапротеинемическими гемобластозами могут относиться к разным классам и достигать в сыворотке крови значительных концентраций.

Источником опухолевого роста при этом являются *В-лимфоциты*.

Парапротеинемические гемобластозы встречаются во всех странах мира. Их частота увеличивается с возрастом, максимум заболеваемости отмечается в 50-60 лет.

В зависимости от морфологической характеристики опухолевого субстрата и секретируемых иммуноглобулинов выделяют следующие формы парапротеинемических гемобластозов:

1. Множественная миелома.
2. Острый плазмобластный лейкоз.
3. Солитарные плазмоцитомы (костные и внекостные).
4. Макроглобулинемия Вальденстрема (болезнь Вальденстрема).
5. Болезни тяжелых цепей.
6. Ig-секретирующие лимфомы.

Клиническая картина характеризуется наличием опухоли, продуцирующей парапротеины, а также вторичным гуморальным иммунодефицитом, который развивается у всех пациентов по мере нарастания массы опухоли.

В зависимости от течения парапротеинемических гемобластозов выделяют:

- ✓ развернутую (хроническую);
- ✓ терминальную (острую) стадии.

Парапротеинемией обусловлены такие общие для парапротеинемических гемобластозов проявления, как:

1. Повышение вязкости крови и нарушение микроциркуляции (синдром повышенной вязкости).
2. Поражение почек (парапротеинемическая тубулоинтерстициальная нефропатия, миеломная почка).
3. Амилоидоз.
4. Криоглобулинемия.
5. Геморрагический синдром, связанный с блокадой тромбоцитарного и коагуляционных звеньев гемостаза и микроциркуляторными нарушениями.
6. Периферическая нейропатия.

Множественная миелома

Множественная миелома (миеломная болезнь, генерализованная плазмоцитома, болезнь Рустицкого-Калера) – самый распространенный вариант парапротеинемических гемобластозов.

Причины ее развития не ясны.

Морфологическая картина представлена плазматическими клетками той или иной степени зрелости, часто с чертами атипизма.

В развернутой стадии опухоль локализуется в костном мозге позвонков, костей черепа, ребер, костей таза; редко – в печени, селезенке, лимфатических узлах.

По характеру распределения очагов в костном мозге выделяют следующие формы множественной миеломы:

1. **Диффузно-очаговую**, при которой отмечается более или менее равномерное заселение костного мозга плазматическими

клетками, расположенными среди нормальных кроветворных клеток, и одновременно образование отдельных узлов опухоли.

2. Диффузную форму.

3. **Множественно-очаговую**, когда вне опухолевых очагов сохраняется нормальный костный мозг.

Поскольку клетки множественной миеломы стимулируют деятельность остеокластов, вокруг очагов опухоли происходит разрушение кости.

Остеолитический процесс при разных формах имеет особенности:

- ✓ диффузно-очаговая форма характеризуется *остеопорозом*, на фоне которого выявляются очаги *остеолиза*;
- ✓ при диффузной форме может наблюдаться *остеопороз*;
- ✓ при множественно-очаговой форме возможны *отдельные остеолитические очаги*.

В зависимости от класса секретируемых иммуноглобулинов выделяют несколько вариантов множественной миеломы:

1. G-, A-, D-, E-миелома.
2. Миелома Бенс-Джонса.
3. Несекретирующая множественная миелома.

Самый частый вариант – G-миелома (60%). Наиболее редкие – D- (3-5%) и E-миелома (единичные случаи).

На основании анализа показателей гемоглобина, рентгенограмм костей, содержания парапротеинов в сыворотке крови и моче, а также концентрации креатинина в крови выделяют *3 стадии множественной миеломы*:

I стадия – масса опухоли менее 600 г/м^2 .

II стадия – $600-1200 \text{ г/м}^2$.

III стадия – более 1200 г/м^2 .

В зависимости от наличия или отсутствия почечной недостаточности каждая стадия имеет, соответственно, символ В или А.

Часто подозрение на множественную миелому возникает при исследованиях крови и мочи:

- ✓ У 60-70% пациентов на ранних стадиях болезни СОЭ увеличивается до 50-80 мм/ч.

✓ По мере прогрессирования процесса появляется анемия, которая постепенно углубляется, содержание тромбоцитов может снизиться.

✓ *Протеинурия* в начале болезни регистрируется у 80% пациентов.

✓ У 30% пациентов развивается *почечная недостаточность (гиперазотемия)*, у 10-20% – *гиперкальциемия*.

Диагноз устанавливают на основании данных *стеральной пункции* (определяется плазмоклеточная инфильтрация костного мозга) и выявления *моноклональных иммуноглобулинов в сыворотке крови и моче*.

При исследовании белков сыворотки крови и мочи берут во внимание:

1. Содержание общего белка сыворотки крови (гиперпротеинемия выше 90 г/л регистрируется у 2/3 пациентов).
2. Наличие М-градиента на электрофореграмме (рис. 3).
3. Обнаружение белка Бенс-Джонса в моче.

Длительность жизни пациентов с множественной миеломой при эффективности химиотерапии – *более 40 мес.*, а при ее неэффективности – *около 18 месяцев*.

Некупируемая почечная недостаточность – один из главных прогностически неблагоприятных факторов.

При множественной миеломе D и миеломе Бенс-Джонса прогноз неблагоприятный.

Известны случаи полного излечения.

Солитарные плазмоцитомы

Солитарные плазмоцитомы (костные и внекостные) – локальные опухоли.

Клиническая картина зависит от их локализации и размеров.

Солитарные плазмоцитомы чаще являются ранними стадиями множественной миеломы.

Костные солитарные плазмоцитомы склонны к генерализации, которая выявляется как множественная миелома в сроки от 1 до 25 лет после проведения радикальной терапии.

Внекостные солитарные плазмоцитомы могут локализоваться в любом органе, преимущественно *в носоглотке и верхних дыхательных путях*.

Диагноз основывается на данных *морфологических исследований пункционного или биопсийного материала*.

За пациентами с солитарной плазмоцитомой устанавливают пожизненное наблюдение ввиду возможной генерализации процесса.

Макроглобулинемия Вальденстрема

Макроглобулинемия Вальденстрема представляет собой хронический, как правило, алейкемический или сублейкемический лимфолейкоз.

IgM-секретирующая опухоль локализуется в костном мозге и характеризуется лимфоцитарным составом клеток с примесью плазматических клеток.

Кроме моноклонального IgM, клетки опухоли не менее чем у 60% пациентов секретируют белок Бенс-Джонса.

Частота макроглобулинемии Вальденстрема значительно меньше, чем множественной миеломы.

Наиболее частыми клиническими проявлениями являются синдром повышенной вязкости и кровоточивость.

Наблюдается вторичный иммунодефицит, поражение почек, амилоидоз, периферическая нейропатия.

В развернутой стадии у 50% пациентов отмечаются потеря массы тела, увеличение лимфатических узлов и (или) печени и селезенки.

Диагноз основывается на данных:

- 1) стеральной пункции или трепанобиопсии;
- 2) электрофореза белков сыворотки и мочи;
- 3) иммунохимическом определении моноклонального IgM в крови.

Болезни тяжелых цепей

Их особенностью является наличие в сыворотке крови и (или) в моче аномального белка, представленного фрагментами тяжелых цепей иммуноглобулинов одного из класса (А, G или М).

В соответствии с этим различают:

1. А-
2. G-
3. М-болезни тяжелых цепей.

Самой частой является *А-болезнь тяжелых цепей*. Она поражает преимущественно детей и молодых людей в возрасте до 30 лет. Заболевание распространено в странах бассейна Средиземного моря, на Ближнем и Среднем Востоке. Может протекать в двух формах – абдоминальной и легочной. Клиническая картина определяется синдромом нарушенного всасывания.

Болезнь тяжелых цепей G (болезнь Франклина) описана у нескольких десятков пациентов, преимущественно у мужчин в возрасте до 40 лет. С наибольшей частотой отмечается увеличение лимфатических узлов, селезенки, печени, лихорадка, прогрессирующая анемия, тромбоцитопения, относительная нейтропения, протеинурия. Течение G-болезни тяжелых цепей обычно тяжелое, быстро прогрессирующее. Смерть, как правило, наступает через несколько месяцев.

Болезнь тяжелых цепей М – самая редкая форма. Болеют, как правило, пожилые люди. Заболевание проявляется в виде алейкемического или сублейкемического лимфолейкоза, обычно без выраженного увеличения лимфатических узлов, печень и (или) селезенка увеличены. В костном мозге почти у всех пациентов обнаруживается лимфоцитарная инфильтрация.

Ig-секретирующие опухоли

Опухоли преимущественно внекостномозговой локализации, чаще высокодифференцированные (лимфоцитарные, лимфоплазмочитарные), реже бластные (саркомы). Отличаются от других видов лимфом секрецией моноклональных иммуноглобулинов, обычно класса М, реже G, очень редко – А, и белка Бенс-Джонса. Принципы диагностики и терапии такие же, как при лимфомах, несекретирующих иммуноглобулины.

Методы определения белка в моче

Турбидиметрические методы

Данные методы основаны на преципитации белка различными веществами:

- сульфосалициловой кислотой (ССК);
- трихлоруксусной кислотой (ТХУ);
- бензетония хлоридом.

В основе всех турбидиметрических методов лежит измерение изменения светопропускания реакционной смеси, обусловленное рассеянием света (образованием мутности). При этом мутность образуется за счет того, что молекулы белков мочи в кислой среде денатурируют, переходя из компактной глобулярной формы в рыхлую. При этом у белков резко возрастает способность к образованию конгломератов. Чем больше концентрация белка в моче, тем большее количество таких конгломератов образуется.

Белковый спектр мочи в норме и патологии обычно содержит альбумины и глобулины (А/Г) в соотношении – 0,6-3,0. В этой связи при исследовании мочи результаты получаются достоверными только при близком соответствии белкового состава мочи белковому составу калибратора. Белковый спектр мочи, представленный одним альбумином, встречается крайне редко – только при нефротическом типе заболевания, поэтому при использовании альбумина в качестве калибратора результаты обычно занижены. Турбидиметрические методы плохо поддаются стандартизации, часто приводят к получению ошибочных результатов, но, несмотря на это, в настоящее время они широко используются в лабораториях.

Колориметрические методы

К группе колориметрических методов определения белка в моче относятся:

1. Метод Лоури.
2. Биуретовый метод.
3. Методы, основанные на связывании белка с органическими красителями.

Метод Лоури имеет высокую чувствительность и широкую линейную область измерения. Но результаты анализа зависят от аминокислотного состава белков.

Биуретовый метод практически не зависит от аминокислотного состава белков, это реакция на их пептидные связи. Метод малочувствителен к присутствующим в пробе соединениям. Линейная зависимость примерно в 10 раз выше, чем у метода Лоури, а чувствительность – в 8-10 раз ниже. Из-за низкой чувствительности метод не пригоден для определения низких концентраций белка. Чувствительность метода может быть повышена различными модификациями.

Одним из подходов для определения белка в моче являются **методы, основанные на связывании белка с органическими красителями**. Методы достаточно просты и быстры в исполнении, а также высокочувствительны. Принцип данных методов основан на взаимодействии белка с органическим красителем, в результате чего образуется окрашенный комплекс, интенсивность окраски которого пропорциональна концентрации белка в пробе.

Широкое развитие данные методы получили после предложения *Bradford M.M.* (1976г.) применять в качестве красителя *кумасси бриллиантового голубого (КБГ) G-250*. Этот метод основан на связывании аминок групп основных аминокислот с сульфогруппами красителя, который в кислой среде находится в двух цветных формах: красной в свободном состоянии с максимумом поглощения при длине волны 465 нм и синей – в комплексе с белком с максимумом поглощения при 595 нм. Комплекс «белок-краситель» образуется очень быстро и остается стабильным в течение примерно часа. Однако в методе отсутствует строгая пропорциональность между концентрацией белка и поглощением раствора.

Помимо этого, для определения белка в моче используется краситель *БФС*. Раствор БФС в кислой среде имеет желтый цвет с максимумом поглощения при 440 нм. При связывании красителя с белками максимум поглощения сдвигается до 597 нм. Реакция связывания БФС с белками происходит при $pH=3$ в течение 1 мин., окраска стабильна примерно 6-8 часов. Данный метод имеет меньшую чувствительность, чем КБГ, но и меньшее количество веществ, влияющих на результаты. Метод точен, чувствите-

лен, прост и доступен для лабораторной практики. Однако даже при низких значениях pH чувствительность метода остается более высокой для альбумина, чем для других белков, что приводит к определенным затруднениям при выборе адекватного белка для калибратора и получения корректных результатов.

При различных патологических состояниях белковый состав мочи может меняться:

- при нефротическом синдроме в моче содержится в основном *альбумин*;
- при миеломе – *легкие цепи иммуноглобулинов* (белки Бенс-Джонса);
- при тубулярной нефропатии – *низкомолекулярные белки*.

Кроме того, состав белков при многих заболеваниях различается разным соотношением альбуминов и глобулинов (А/Г).

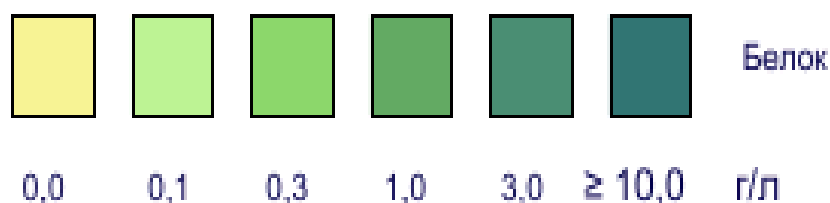
Методы «сухой химии»

Методы данной группы основаны на использовании pH индикаторов, которые в зависимости от количества белка в моче изменяют окраску от светло-желтого до темно-зеленого. Определение белка при этом высокочувствительно к наличию альбумина, реагируя на его присутствие в моче уже в концентрации от 0,11 г/л. Чувствительность к глобулинам и белкам Бенс-Джонса намного ниже. В этой связи тест-полоски на белок способны распознавать в основном нарушение гломерулярной функции почек. Ложноположительные результаты может давать моча пациентов, принимавших хининовые препараты или лекарства на базе производных хинолина, а также исследование биоматериала, собранного в недостаточно чистую посуду.

Любое изменение цвета реакционной сенсорной зоны тест-полоски считается положительным результатом (*качественное определение*). В зависимости от концентрации белка в анализируемой пробе исходная бледно-желтая окраска реакционной зоны может приобретать цвет от светло- до темно-зеленого. Количественный результат получается путем сравнения окраски реакционной зоны полоски с цветной шкалой на этикетке пенала (тубуса). Если цвет реагентной зоны оказывается промежуточным ме-

жду двумя цветовыми полями, результат определяется по наиболее близкой по окраске цветовой зоне шкалы.

Оценка результатов определения белка в моче с помощью тест-полосок



Клиническое значение:

В физиологических условиях с мочой за сутки выводится не более 150 мг белка. Увеличение экскреции белка носит название ***протеинурии***.

Выделяют следующие виды протеинурии:

1. По степени тяжести:

- легкая (до 1 г/сут);
- редняя (1-3 г/сут);
- тяжелая (более 3 г/сут).

2. По виду выводимого белка:

- селективная (альбумины);
- неселективная (альбумины и глобулины).

3. По механизму развития:

- преренальная (поступление в почки большого количества белка);
- ренальная (клубочковая и канальцевая);
- постренальная (воспалительные процессы в мочевыводящих путях).

4. Функциональная:

- после тяжелой физической нагрузки;
- алиментарная;
- лихорадочная;
- ортостатическая.

Микроальбуминурия

Термин «микроальбуминурия» (МАУ) определяется как экскреция альбумина с мочой в количестве **30-300 мг/сут.** Микроальбуминурия является одним из наиболее ранним критерием развития диабетической нефропатии (до появления протеинурии). Диабетическая нефропатия в настоящее время является одной из ведущих причин высокой инвалидизации и смертности пациентов с сахарным диабетом. Частота ее развития колеблется от 40 до 50% у пациентов с диабетом I типа и от 15 до 30% у пациентов с сахарным диабетом II типа. Появление у пациента с СД постоянной микроальбуминурии свидетельствует о скором развитии (в течение ближайших 5-7 лет) выраженной стадии диабетической нефропатии.

В связи с тем, что выделение альбумина с мочой изменяется в течение суток и повышается под воздействием многих факторов, диагноз стойкой альбуминурии следует устанавливать после повторных определений с интервалом в несколько недель. Существенное значение имеет количество теряемого с мочой альбумина, поскольку оно не только указывает на степень риска, но и позволяет оценивать эффект терапии.

При наличии факторов риска и указания на выявление микроальбуминурии в ранее проведенных исследованиях сразу выполняют количественное определение концентрации альбумина в моче.

К факторам риска относятся:

- ✓ сахарный диабет;
- ✓ артериальная гипертензия;
- ✓ аутоиммунные заболевания;
- ✓ воспалительные заболевания мочевыводящих путей;
- ✓ хронические заболевания почек в семейном анамнезе.

При оценке величины протеинурии международные эксперты рекомендуют следующее:

1. Для выявления и оценки величины протеинурии чаще всего нет необходимости анализировать суточную мочу.
2. Предпочтительнее исследование утренней мочи.
3. Для скрининга протеинурии приемлемы результаты «сухой химии».

4. Положительные данные скрининг-тестов должны подтверждаться результатами определения соотношения белок/креатинин или альбумин/креатинин.

5. Для установления диагноза стойкой протеинурии необходимо получение двух или более положительных результатов в период от 1 до 2 недель.

У пациентов с СД исследование экскреции альбумина с мочой начинают с полуколичественного определения его концентрации в утренней порции мочи с помощью тест-полосок. При получении положительного результата определяют соотношение альбумин/креатинин. Если его величина *менее 30 мг/г*, полученный результат считают нормой.

Необходимость повторного определения концентрации альбумина в моче количественными методами объясняется тем, что факт обнаружения у пациента микроальбуминурии является достаточно важным диагностическим критерием, требующим принятия определенных мер. В этой связи, для сведения к минимуму вероятности получения недостоверных результатов в каждом конкретном случае необходимо учитывать факторы, влияющие на концентрацию альбумина в моче:

1. Факторы, увеличивающие экскрецию альбумина с мочой:

- дегидратация;
- тяжелая физическая нагрузка;
- диета с высоким содержанием белка;
- воспалительные заболевания мочевыводящих путей;
- гематурия;

2. Факторы, уменьшающие экскрецию альбумина с мочой:

- гипергидратация;
- диета с низким содержанием белка;
- прием ингибиторов ангиотензинпревращающего фермента (каптоприл, эналаприл и др.);
- прием нестероидных противовоспалительных препаратов.

Для установления микроальбуминурии необходимо выявление факта повышения экскреции альбумина в двух из трех анализов, проведенных в интервале от 3 до 6 месяцев.

Белки острой фазы воспаления

В ответ на любое повреждение в организме развивается целый комплекс физиологических реакций, направленных на локализацию очага повреждения и скорейшее восстановление нарушенных функций. Этот сложный процесс, направленный на сохранение гомеостаза, известен как воспаление, а комплекс изменений, возникающих непосредственно вслед за повреждением, в совокупности составляет понятие острой фазы воспаления (рис. 5).

Белки острой фазы (БОФ) – это специфическая группа белков крови, уровень которых меняется (преимущественно растет) в ответ на развитие острого воспаления.



Рисунок 5. – Общая схема реакций острого воспаления

Особенностью большинства белков острой фазы является их неспецифичность и высокая корреляция концентраций в крови с активностью заболевания и стадией процесса. Это выгодно отличает их от других широко используемых маркеров воспаления

(СОЭ, количества лейкоцитов и лейкоцитарной формулы). В то же время диагностическая значимость этих тестов (в силу их неспецифичности) в ряде случаев может быть весьма ограниченной.

Классификация БОФ

1. Главные реактанты острой фазы (увеличение концентрации в крови в 100-1000 раз в течение 6-12 ч):

- С-реактивный белок (СРБ).
- Амилоидный белок А.

2. Умеренное увеличение концентрации (в 2-5 раз) в течение 24 ч:

- Орозомукоид (кислый α 1-гликопротеид).
- α 1-антитрипсин.
- Гаптоглобин.
- Фибриноген.

3. Незначительное увеличение концентрации (на 20-60%) в течение 48 ч:

- Церулоплазмин.
- Белки системы комплемента.

4. Нейтральные реактанты ОФ:

- Иммуноглобулины G, A и M.
- α 2-макроглобулин.

5. «Негативные» реактанты ОФ, уровень может снижаться в течение 12-18 ч:

- Альбумин.
- Трансферрин.

С-реактивный белок

Наиболее востребованным БОФ в клинике является С-реактивный белок:

✓ В норме концентрация С-реактивного белка составляет **0-10 мг/л.**

✓ Его название происходит от способности связываться с С-полисахаридом клеточной стенки *Pneumococcus pneumoniae*.

✓ Уровень СРБ в сыворотке возрастает весьма значительно до значений, 100-кратно превышающих норму, при бактериальных инфекциях, обширных повреждениях, ожогах, опухолевых заболеваниях, некрозах.

✓ Рост концентрации происходит быстро, в течение 6-12 ч, в некоторых случаях может опережать клинические проявления.

✓ СРБ может обуславливать появление дополнительной полосы на электрофореграмме между фракциями β - и γ -глобулинов, которая часто ошибочно интерпретируется как моноклональный белок.

Методы определения концентрации

Ранее методы для определения концентрации СРБ в крови были полуколичественными. В их основе лежало осаждение латексных частиц под влиянием С-реактивного белка. О его концентрации в исследуемом материале судили по характеру образующихся в реакции агрегатов, которые оценивали по балльной шкале от + до +++++.

Позже для определения СРБ стали использовать метод *латекс-агглютинации с использованием специфичных антител*. Метод обладал более высокой чувствительностью.

В конце 1970-х гг. внедрение метода аффинной хроматографии позволило получить антитела, нашедшие применение в высокочувствительных количественных методах определения концентрации СРБ в крови, включающих *нефелометрию, турбидиметрию и иммунохимический анализ*.

Достаточно распространенным методом определения концентрации СРБ является *иммунотурбидиметрия*. Для количественного определения концентрации СРБ продолжают использовать *иммунофлуоресцентный метод*. Данный метод полностью автоматизирован, имеет достаточную диагностическую чувствительность и специфичность.

В зависимости от степени чувствительности методы определения концентрации СРБ можно разделить на две группы:

1. Методы, позволяющие определять концентрацию белка в диапазоне *от 3 до 20 мг/л*. Этот интервал позволяет охватить колебания концентрации СРБ у пациентов с острыми инфекционными заболеваниями.

2. Методы со значительно большей чувствительностью, позволяющие выявить более низкую концентрацию СРБ.

Для определения небольших концентраций СРБ были внедрены высокочувствительные или «ультрачувствительные мето-

ды определения концентрации С-реактивного белка (hsCRP). Эти методы позволяют определить данный БОФ в диапазоне *от 0,05 до 0,2 мг/л*.

Увеличение чувствительности методов определения СРБ было достигнуто путем использования латексных микрочастиц с адсорбированными на их поверхность моноклональными антителами к человеческому С-реактивному белку. Добавление исследуемого образца сыворотки, содержащего СРБ, к суспензии микрочастиц приводит к образованию сложной пространственной структуры. Величина светорассеяния или светопоглощения при этом оценивается количественно с помощью соответствующих анализаторов. Данная технологическая особенность получила название «*латексное усиление*» (*Latex enhanced turbidimetry*).

Высокая чувствительность методов определения концентрации СРБ в крови дала возможность для изучения роли хронического воспалительного процесса при атеросклерозе, оценки риска развития инфаркта миокарда у пациентов с острым коронарным синдромом. Данная технология позволяет использовать СРБ в качестве маркера при проведении эпидемиологических исследований и дифференцировать группы пациентов по степени риска возникновения сосудистых осложнений при ИБС.

Клиническое значение СРБ

1. При острых заболеваниях

Бактериальная инфекция сопровождается самыми высокими уровнями СРБ (100 мг/л и выше). При эффективной терапии концентрация СРБ снижается уже на следующий день. Если этого не происходит, вопрос о выборе необходимого антибактериального лечения должен решаться с учетом изменений уровня СРБ.

Сепсис у новорожденных. При подозрении на сепсис у новорожденных концентрация СРБ более 12 мг/л – указание на немедленное начало противомикробной терапии. Следует учитывать, что у части новорожденных бактериальная инфекция может и не сопровождаться резким повышением концентрации СРБ.

Вирусная инфекция – при таких заболеваниях СРБ повышается незначительно (меньше 20 мг/л), что используется для дифференцирования вирусной инфекции от бактериальной. У детей с

менингитом СРБ выше 20 мг/л – основание для начала антибиотикотерапии.

Нейтропения. Уровень СРБ более 10 мг/л при нейтропении у взрослого пациента может оказаться единственным объективным указанием на наличие бактериальной инфекции и необходимость применения антибиотиков.

Послеоперационные осложнения. Если в течение 4-5 дней после хирургической операции уровень СРБ продолжает оставаться высоким (или увеличивается), это указывает на развитие осложнений (пневмонии, тромбоза, раневого абсцесса и др.).

Сопутствующие бактериальные инфекции. При любых заболеваниях, либо после операции присоединение бактериальной инфекции, будь то местный процесс или сепсис, сопровождается повышением уровней БОФ, концентрация СРБ становится большей, чем 100 мг/л. При этом повышаются также концентрации α 1-антитрипсина и ороомукоидов.

2. При контроле эффективности лечения хронических заболеваний

Системные ревматические заболевания сопровождаются резким увеличением целого спектра БОФ; уменьшение их концентрации при ревматоидном артрите четко указывает на эффективность лечения. При системном васкулите мониторинг СРБ – объективный тест, позволяющий контролировать дозы стероидов.

Воспалительные заболевания желудочно-кишечного тракта. Болезнь Крона сопровождается значительной выработкой БОФ, но при неспецифическом язвенном колите концентрация БОФ незначительна.

Злокачественные опухоли. В этих случаях возможны различные изменения уровней БОФ, так как это зависит от присоединения инфекции, некроза тканей, нарушения функций органов вследствие возникновения непроходимости респираторных путей или желудочно-кишечного тракта, влияния иммуносупрессии и химиотерапии. Лимфомы редко сопровождаются тканевым некрозом и изменением спектра белков плазмы. При миеломе возможна очень сильная ОФ, вызванная повышенным синтезом ИЛ-6 опухолевыми клетками – это плохой прогностический признак.

Вторичный амилоидоз. Повышение уровня СРБ коррелирует с развитием почечных осложнений.

Отторжение трансплантата. При отторжении сердечного аллотрансплантата высокий уровень СРБ коррелирует с инфекционными осложнениями, но не свидетельствует об отторжении как о таковом, тогда как при отторжении почечного трансплантата сильный острофазный ответ – один из ранних индикаторов отторжения.

Альфа 1-антитрипсин

Альфа1-антитрипсин (ААТ) – ингибитор α 1-протеиназы – синтезируется в печени. Альфа1-антитрипсин входит во фракцию α 1-глобулина при электрофорезе белков сыворотки. Белок принадлежит к семействам, которые ингибируют сериновую протеазу. Функционально альфа1-антитрипсин обеспечивает 90% активности, ингибирующей трипсин в крови, тормозит действие химотрипсина, эластазы лейкоцитов.

Выработка ААТ при реакциях острой фазы повышается примерно в 2-5 раза в течение первых 24 ч острого воспаления. Содержание ААТ в сыворотке крови повышается:

- ✓ при острых, подострых и хронических инфекционных заболеваниях;
- ✓ при острых гепатитах и циррозах печени в активной форме;
- ✓ при некротических процессах.

При дефиците ААТ развивается неспособность перемещать синтезируемый белок из цитоплазмы гепатоцита в сыворотку. Врожденный дефицит ААТ сочетается с базальной эмфиземой легких, ХОБЛ с развитием эмфиземы у людей в возрасте 30-40 лет. Это связано с отсутствием ингибирующего действия ААТ на эластазу лейкоцитов, которая повреждает стенки альвеол. Дефицит ААТ также проявляется разными формами повреждения печени в виде желтухи новорожденных, гепатита неясной этиологии у новорожденных и детей. Гетерозиготные мужчины больше предрасположены к ХОБЛ с развитием эмфиземы, сходной с таковой у гомозигот, но в более позднем возрасте. Диагноз дефицита ААТ ставят при отсутствии α 1-фракции на электрофореграмме белков сыворотки и подтверждают количественным определени-

ем ААТ в сыворотке. Дополнительным исследованием при этом является измерение концентрации преальбумина сыворотки.

Приобретенный дефицит ААТ может наблюдаться при нефротическом синдроме, гастроэнтеропатии с потерей белка, острой фазе термических ожогов. Снижение ААТ в крови может быть у пациентов с вирусным гепатитом.

Альфа-1-кислый гликопротеин (орозомукоид)

Альфа-1-кислый гликопротеин представляет собой гликопротеин, синтезирующийся в печени. Он модулирует влияние селектина на перемещение лейкоцитов к местам воспаления, подавляет иммунореактивность, изменяет адгезию тромбоцитов, связывает гормоны и лекарственные препараты.

Увеличение содержания концентрации орозомукоида в крови наблюдается при:

- ✓ бактериальных инфекциях и воспалении;
- ✓ травмах;
- ✓ опухолях;
- ✓ ревматоидном артрите;
- ✓ системной красной волчанке;
- ✓ инфаркте миокарда.

Исследование орозомукоида в динамике позволяет оценить течение воспалительного процесса, а при оперативном лечении онкозаболеваний это позволяет диагностировать рецидивы.

Наряду с гаптоглобином орозомукоид используют для диагностики гемолиза. Увеличение уровня орозомукоида при нормальном уровне гаптоглобина указывает на реакцию острой фазы с умеренным гемолизом.

Снижение содержания орозомукоида наблюдается при следующих состояниях:

- ✓ тяжелые поражения печени;
- ✓ гастроэнтеропатии с потерей белка;
- ✓ нефротический синдром;
- ✓ беременность;
- ✓ прием антимикробных препаратов, эстрогенов, оральных контрацептивов.

Гаптоглобин

Гаптоглобин является гликопротеином, основная функция которого – связывание свободного гемоглобина.

Существует три фенотипа гаптоглобина: 1-1, 2-1 и 2-2. Гаптоглобин выполняет защитную функцию, образуя комплексы с белками, освобождающимся при распаде клеток, является ингибитором катепсинов, принимает участие в транспорте витамина В₁₂.

Повышение концентрации гаптоглобина в крови происходит вследствие стимуляции интерлейкинами клеток печени. В острой фазе воспаления концентрация гаптоглобина в сыворотке увеличивается до 2-5 раз в течение первых 24 часов острого воспаления. Данное увеличение не является таким закономерным, как для других белков острой фазы. Это связано с тем, что при гемолизе, часто сопровождающим острофазовые процессы, гаптоглобин селективно связывается со свободным гемоглобином, что приводит к снижению его концентрации в крови. Для исключения влияния данного фактора на результаты определения гаптоглобина их необходимо сопоставлять с данными исследования хотя бы еще одного белка острой фазы.

Гаптоглобин увеличивается в крови при воспалительных и некробиотических процессах, отражая при этом степень деструкции соединительной ткани. Уровень данного белка также повышается при злокачественных опухолях (рак молочной железы, желудочно-кишечного тракта, легких и др.), холестазах, лечении глюкокортикоидами.

Снижение концентрации гаптоглобина в крови отмечается при:

- ✓ всех видах гемолиза;
- ✓ острых и хронических заболеваний печени;
- ✓ неэффективном эритропоэзе;
- ✓ дефектах мембран эритроцитов;
- ✓ спленомегалии.

Церулоплазмин

Церулоплазмин – α_2 -гликопротеин, связывающий до 94-95% меди плазмы крови. Синтезируется в печени. Церулоплазмин транспортирует медь к соответствующим ферментам в кро-

ви, играет важную роль в регулировании окислительно-восстановительного потенциала, а также метаболизме железа.

Определение уровня церулоплазмينا в сыворотке крови используется для диагностики болезни Вильсона-Коновалова, в основе которой лежит генетический дефект синтеза белка медь-транспортующей АТФ-азы В типа в печени. У пациентов с этим заболеванием отмечается значительное снижение экскреции меди с желчью, что приводит к ее накоплению в гепатоцитах. Содержание церулоплазмينا в сыворотке крови снижается (вследствие уменьшения его синтеза в печени), что имеет диагностическое значение. Недостаточность ионов меди в крови приводит к повышению их резорбции в кишечнике, что способствует ее накоплению в организме. Прежде всего, медь откладывается в печени и базальных ганглиях головного мозга, а также почечных канальцах. В ткани мозга при этом появляются полости и дегенеративные изменения не только в базальных ганглиях, но и в коре больших полушарий. Уже в детском возрасте появляются двигательные нарушения и психические отклонения, задержка умственного развития. У данных пациентов развивается почечный канальцевый ацидоз.

Выделяют следующие формы болезни Вильсона-Коновалова:

1. **Славянская.** Характеризуется поздним началом и преимущественно неврологической симптоматикой, концентрация церулоплазмينا в сыворотке при этом снижена.

2. **Ювенильная.** Основными проявлениями при этом являются нарушения функции печени, концентрация церулоплазмينا в крови снижена.

3. **Атипичная.** Наиболее редкая форма заболевания.

Снижение уровня церулоплазмينا в сыворотке крови может наблюдаться при:

- ✓ нефротическом синдроме;
- ✓ заболеваниях желудочно-кишечного тракта;
- ✓ тяжелых заболеваниях печени;
- ✓ поражениях центральной нервной системы.

Увеличение концентрации церулоплазмينا в сыворотке крови наблюдается:

- ✓ у пациентов с острыми и хроническими инфекционными заболеваниями;
- ✓ циррозом печени, гепатитами;
- ✓ инфарктом миокарда;
- ✓ системными заболеваниями;
- ✓ лимфогранулематозом;
- ✓ шизофренией;
- ✓ при злокачественных новообразованиях.

Некоторые индивидуальные белки крови

Тропонины

Тропонины – важные регуляторные белки поперечно-полосатых мышц. Они представлены тремя субъединицами С, I, Т и образуют тропониновый комплекс, который участвует в кальцийзависимой регуляции акта сокращения-расслабления мышц.

Тропонин С связывает кальций, при связании с ионами Ca^{2+} способствует взаимодействию актина с миозином (образованию актомиозина).

Тропонин I связывает актин в период расслабления и ингибирует АТФ-азную активность актомиозина, предотвращая таким образом мышечное сокращение в отсутствие ионов Ca^{2+} .

Тропонин Т связан с тропомиозином. Тропомиозин, в свою очередь, вместе с актином образует тонкие филаменты миоцитов – важнейший компонент сократительного аппарата клеток поперечно-полосатой мускулатуры (рис. 6).

В миокарде обнаружена одна изоформа тропонина I, а в скелетных мышцах – две. Тропонин I скелетной мускулатуры состоит из 181-211 аминокислотных остатков. Изоформа тропонина I миокарда имеет больший размер, обусловленный наличием дополнительного приблизительно 30-членного пептида, расположенного в N-концевой части молекулы белка.

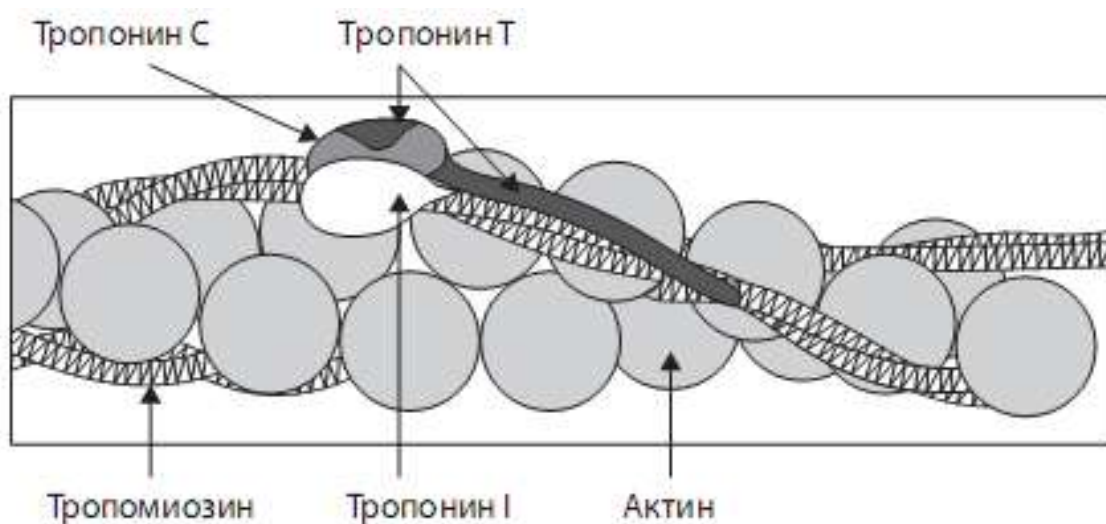


Рисунок 6. – Тропомиозиновый комплекс

Тропонин Т имеет 4 изоформы. Сердечные изоформы тропонина Т также значительно различаются по своей молекулярной структуре от 2 типов тропонина Т скелетной мускулатуры: существует 43% различий в аминокислотной последовательности тропонина Т сердца и скелетной мускулатуры.

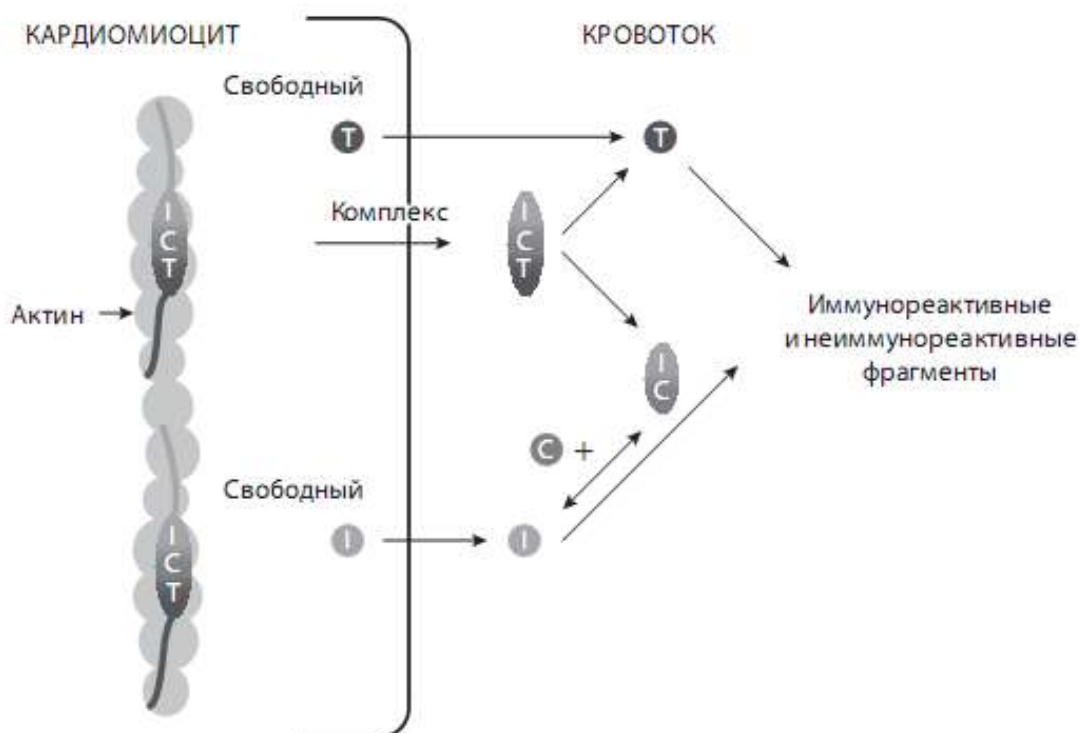


Рисунок 7. – Циркулирующие тропонины С

Сердечный тропонин С идентичен по структуре мышечному тропонину С и не является кардиоспецифичным белком.

Таким образом, тропонины I и T – специфичные для миокарда белки. Их можно отдифференцировать от аналогичных белков скелетных мышц иммунологически. Содержание тропонина I в миокарде человека колеблется от 4 до 6 мг/г влажного веса. Содержание тропонина T в сердце человека составляет около 10 мг/г влажного веса. Большая часть тропонинов находится в связанном виде в составе трехкомпонентного тропонинового комплекса (тропонины I, T и C). Примерно 3-4% тропонина I и 6-8% от всего внутриклеточного тропонина T содержится в цитоплазме кардиомиоцитов и составляет цитозольный пул (цитозольную фракцию) тропонинов. В крови циркулирует смесь свободных тропонинов C (рис. 7).

Согласно результатам проведенных Европейским кардиологическим обществом (ESC) и Американской коллегией кардиологов (ACC) пересмотров диагностических критериев ИМ, верификация диагноза основывается на выявлении динамики уровня сердечных тропонинов T и I в крови при наличии симптомов ишемии миокарда (клинических, электрокардиографических и др.). Таким образом, тропонины T и I являются предпочтительными биохимическими маркерами острого ИМ. Часть проблем при определении концентрации тропонинов связана с многообразием диагностикумов, их неодинаковой чувствительностью и диагностической точностью, разной восприимчивостью к перекрестно реагирующим веществам, т.е. с аналитическими характеристиками тест-систем. Кроме того, повышение уровней данных белков возникает при некрозе миокарда любой этиологии, а иногда и в отсутствие необратимого повреждения кардиомиоцитов.

Таким образом, клиницистам важно помнить, что тропониновый тест сам по себе не является «золотым стандартом» диагностики ИМ, а может стать таковым только у пациентов с высокой предтестовой вероятностью ИБС, т.е. при наличии соответствующих факторов риска (пол, возраст и др.), типичных клинических симптомов, ишемических изменений на электрокардиограмме (ЭКГ) и т.д.

Методы определения тропонинов

Принцип определения тропонинов, применяющийся в современных тест-системах, основан на иммунохимическом методе – «сэндвич»-анализе.

Суть этого метода в следующем: несколько антител, иммобилизованных на твердой фазе, связываются соответствующими участками молекул тропонина (антигеном) из исследуемого образца; одновременно или последовательно (в зависимости от типа теста) происходит реакция антигена с идентифицирующими антителами, меченными каким-либо способом. В результате этих реакций молекулы тропонинов (I или T) оказываются фиксированными между антителами (принцип «сэндвича») (рис. 8).

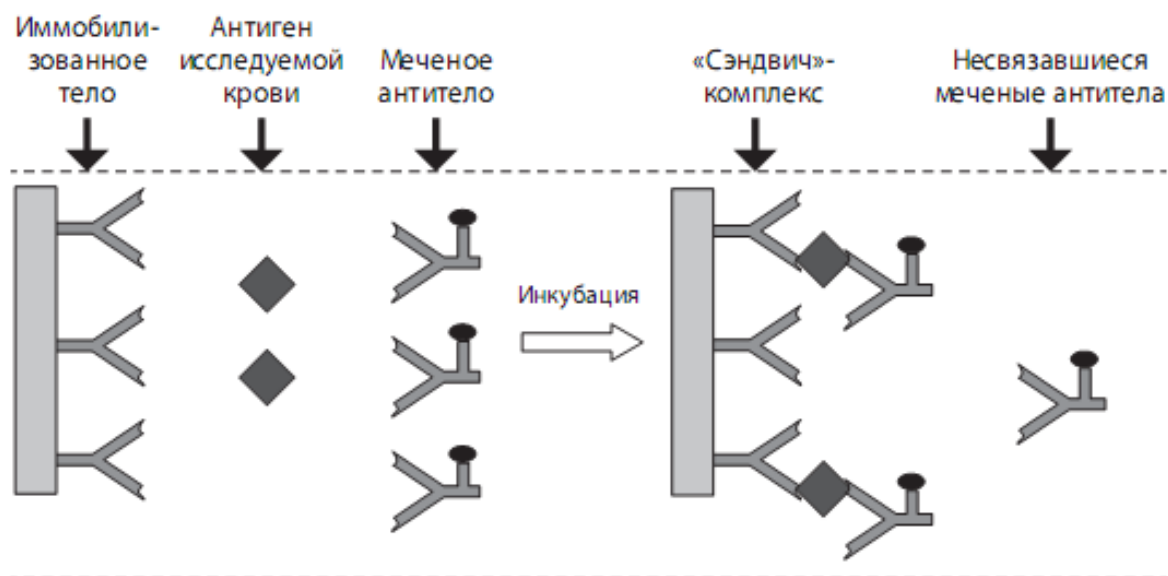


Рисунок 8. – Схема иммунохимического определения тропонинов в крови

Для завершения реакции необходимо некоторое время (период инкубации), по истечении которого производится отмывание образца от несвязавшихся компонентов реакционной смеси. Затем посредством последовательных химических реакций происходит изменение цвета исследуемого раствора. С помощью спектрофотометра измеряют оптическую плотность окрашенного комплекса. Интенсивность окрашивания прямо пропорциональна концентрации тропонина в образце. Все этапы процесса автоматизированы и выполняются при помощи специальных иммунохимических анализаторов (рис. 9).

В настоящее время существует более 20 тест-систем для определения концентрации тропонинов в периферической крови. При этом имеются как количественные, так и качественные методы, особое место среди них занимают *экспресс-тесты*.

Аналитические характеристики наборов по определению уровней тропонинов стандартизированы Международной федерацией клинической химии (International Federation for Clinical Chemistry, IFCC). Для того чтобы решить, какой диагностикум стоит применять в клинической практике, а от использования какого лучше воздержаться, необходимо иметь четкое представление как минимум о двух характеристиках тропониновых тест-систем: аналитической точности и диагностической чувствительности.



Рисунок 9. – Иммунохимические автоанализаторы для определения концентрации тропонинов в крови: а) портативный; б) стационарный

Цистатин С

Цистатин С – белок, относящийся к семейству ингибиторов цистеиновых протеиназ. Он необходим для регуляции физиологических процессов путем торможения активностей протеиназ, которые являются специфическими мишенями его действия. Будучи ингибитором цистеиновых протеиназ, он блокирует их активность, а тем самым – деградацию внеклеточного матрикса, ими осуществляемую, таким образом стимулируя синтез или распад внеклеточных структур, например, в стенках сосудов (атеро-

склероз), или при ремоделировании миокарда (сердечная недостаточность, острый коронарный синдром).

Факторы, определяющие уровень цистатина С в крови:

- ✓ постоянная скорость синтеза, не зависящая от возраста, пола и веса;
- ✓ стабильная скорость выведения из организма;
- ✓ повышение уровня из-за почечной патологии;
- ✓ увеличение синтеза при сердечной недостаточности и острых коронарных синдромах.

Клиническое значение определения цистатина С обусловлено следующим:

1. Данный белок является высокочувствительным эндогенным маркером скорости клубочковой фильтрации (СКФ), по своей чувствительности значительно превосходящий креатинин.

2. Цистатин С позволяет диагностировать ранние изменения СКФ, а также контролировать изменения СКФ при ОПН.

3. Белок является маркером ренальной функции у пожилых пациентов.

4. Цистатин С рассматривается в качестве высокочувствительного маркера сердечно-сосудистой патологии.

5. Данный белок является идеальным маркером СКФ у детей.

6. Повышенные концентрации цистатина С является индикатором преклинических форм заболеваний почек, связанных с риском сердечно-сосудистых заболеваний.

В ряде исследований показано, что повышенные уровни цистатина С связаны с ростом риска летальности и такими сердечно-сосудистыми заболеваниями, как инфаркт миокарда, ишемический инсульт, сердечная недостаточность.

Повышение сердечно-сосудистого риска, связанного с повышением сывороточного цистатина С, особо характерно для лиц пожилого возраста, у которых, как правило, происходит ежегодное снижение СКФ. Причем такое снижение значений СКФ является независимым фактором риска повышенной смертности. Так, установлено, что лица не имевшие признаков ХПН, но с высокими уровнями цистатина С, имели повышенный риск неблагоприят-

ятных исходов сердечно-сосудистых заболеваний (инсульты, сердечная недостаточность, заболевания коронарных артерий).

Особую ценность цистатин С имеет для выявления пациентов с высоким риском сердечно-сосудистых заболеваний среди лиц с нормальными значениями СКФ и креатинина крови.

Существует зависимость между повышением концентрации цистатина С и тяжестью ишемии у пациентов с заболеваниями коронарных артерий. Так, однократное измерение цистатина С в крови существенно улучшает раннюю диагностику у пациентов с подозреваемым или подтвержденным острым коронарным синдромом без подъема ST-сегмента. При этом клиническая значимость определения цистатина С существенно увеличивается при сочетанном применении с тропонинами и высокочувствительным СРБ.

Миоглобин

Миоглобин представляет собой гемопротейн, состоящий из одиночной полипептидной цепи. Его основной функцией является хранение кислорода и облегчение его транспортировки в митохондриях для окислительного фосфорилирования. Он преобладает в поперечно-полосатой мышечной ткани.

Увеличение содержания:

- ✓ вследствие небольшого размера и цитоплазматического местоположения миоглобин – один из первых специфических маркеров, которые высвобождаются при поражении клеток мышечной ткани;

- ✓ уровень миоглобина в крови повышается в течение часа после начала болевых приступов при остром инфаркте миокарда. Частое измерение миоглобина позволяет обнаружить или исключить данное состояние. В то же время миоглобин не является специфическим маркером инфаркта миокарда, поэтому диагноз следует подтверждать более специфичными показателями;

- ✓ повышение концентрации миоглобина наблюдается при повреждении скелетных мышц; определение его уровня в крови имеет важное значение у пациентов с синдромом длительного сдавления, при обширных травмах мышц, наиболее частым осложнением которых выступает острое повреждение почек;

✓ уровень миоглобина в крови увеличивается при тяжелом электрошоке, термических ожогах, вторичной токсической миоглобинурии, повреждении скелетных мышц, артериальной окклюзии с ишемией мышечной массы.

Снижение содержания:

- ✓ наличие циркулирующих антител к миоглобину;
- ✓ ревматоидный артрит.

Натрийуретические пептиды

Натрийуретические пептиды – группа нейроэндокринных гормонов, регулирующих артериальное давление, водно-электролитный обмен, противодействуют активности системы ренин-ангиотензин-альдостерон при управлении внутрисосудистым объемом, вызывая натрийурез и вазодилатацию.

Выделяют три основных натрийуретических пептида:

1. **Натрийуретический пептид А** (предсердный, ANP) секретируется предсердиями.

2. **Натрийуретический пептид В** (мозговой, BNP) вырабатывается желудочками в ответ на увеличение диастолического давления или объема.

3. **Натрийуретический пептид С** (CNP) активно вырабатывается эндотелиальными клетками в ответ на стресс.

ANP и BNP высвобождаются в ответ на растяжение предсердий и желудочков, соответственно, и вызывают расширение сосудов, что приводит к снижению кровяного давления; ингибируют пролиферацию гладкомышечных клеток сосудов и оказывают ингибирующее влияние на симпатическую систему сердца; вызывают торможение секреции альдостерона корой надпочечников и секреции ренина почками; вызывают натрийурез и сокращение внутрисосудистого объема. Коррелируют с тяжестью и функциональным классом хронической сердечной недостаточности. Уровень BNP увеличивается пропорционально угрозе остановки сердца и является прогностическим показателем летального исхода.

Определение BNP прогнозирует риск развития сосудистых осложнений при остром коронарном синдроме. Коррелирует с

риском развития летального исхода. Повышение уровня BNP у пациентов с острым коронарным синдромом увеличивает риск смерти в 4 раза. Используется для мониторинга терапии сердечно-сосудистых заболеваний, для коррекции терапии у пациентов с хронической сердечной недостаточностью. При внезапно возникшей одышке – показатель декомпенсации сердечной недостаточности.

МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ НЕБЕЛКОВЫХ АЗОТСОДЕРЖАЩИХ КОМПОНЕНТОВ В КРОВИ И МОЧЕ

Распад белков и нуклеиновых кислот в организме приводит к образованию группы небелковых азотсодержащих веществ. Избыток азота в организме или азот, образующийся при превращениях и расщеплении аминокислот, выводится из организма в виде аммиака, мочевины и мочевой кислоты. Выведение азота осуществляется через кожу, небольшие его количества выводятся с калом. При нормальном потоотделении через кожу здоровый человек с массой тела 75 кг ежедневно может терять около 2 г азота.

В состав остаточного азота крови входят:

- ✓ Аминокислоты.
- ✓ Аммиак.
- ✓ Мочевая кислота.
- ✓ Мочевина.
- ✓ Креатинин.
- ✓ Креатин, индикан.

Аминокислоты. В организме человека аминокислоты образуют пул, величина которого в физиологических условиях у взрослых является достаточно постоянной. Концентрация аминокислот в плазме крови колеблется в течение суток в пределах 25-30% от всего остаточного азота. Расщепление части аминокислот до мочевины и CO_2 является причиной непрерывного оттока части аминокислот из общего пула. Скорость деградации аминокислот при голодании снижается, но полностью этот процесс не прекращается.

Аммиак образуется главным образом в процессе дезаминирования глутаминовой кислоты при участии фермента глутаматдегидрогеназы. Повышение концентрации аммиака в крови может предшествовать развитию печеночной энцефалопатии. В то же время четкой зависимости между ее наступлением и концентрацией аммиака в крови не прослеживается.

Мочевая кислота образуется при расщеплении пуриновых нуклеотидов.

Мочевина в организме человека является конечным продуктом метаболизма и образуется при участии ферментов орнитинового цикла. Данный цикл представляет собой последовательность ферментативных реакций, в результате которых происходит ассимиляция NH_3 (в виде NH_4^+) и синтез мочевины, которая выводится из организма. Из печени мочевина попадает в кровь, затем в почки и выводится с мочой.

Креатинин образуется в мышечной ткани в процессе фосфорилирования креатина при участии фермента креатинкиназы.

Методы определения остаточного азота в биологических материалах достаточно трудоемки и длительны. В этой связи данный показатель в лабораторной практике в настоящее время имеет достаточно ограниченное применение.

В клинических условиях наиболее распространенными являются методики по определению таких компонентов остаточного азота, как мочевина, креатинин и мочевая кислота.

Методы определения мочевины в крови и моче

Методы определения мочевины в крови и моче можно разделить на две группы – химические и ферментативные. К первой группе следует отнести *титрометрический метод и методы с использованием реакции Несслера или Бертело*.

В титрометрическом методе аммиак определяют титрованием в растворе серной кислоты в присутствии *pH*-индикатора.

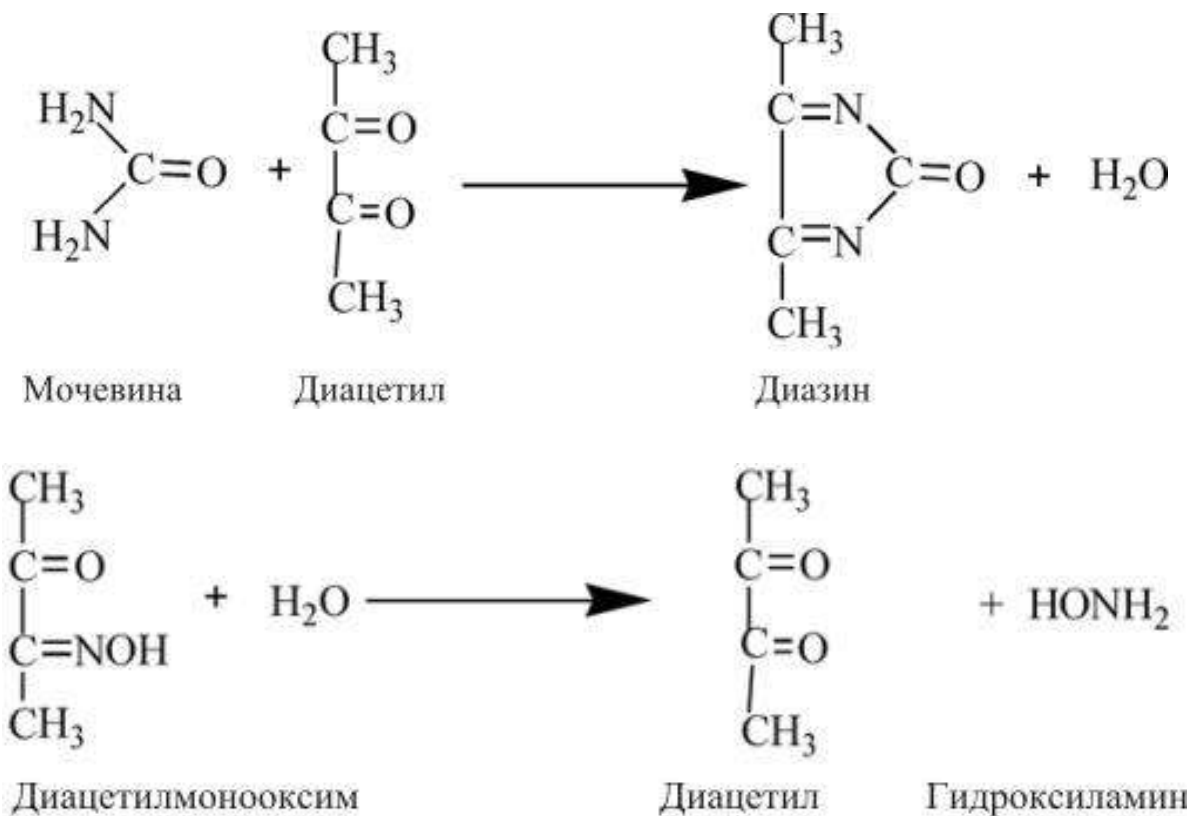
Взаимодействие аммиака с реактивом Несслера в щелочной среде приводит к образованию комплекса желтого цвета. Методы определения мочевины с помощью реакции Несслера редко используются в настоящее время и представляют исторический интерес. Основная причина этого заключается в невозможности автоматизации этих методов и их неспецифичности.

Реакция Бертело между аммиаком и фенолгипохлоритом приводит к образованию синего индофенолового комплекса с максимумом поглощения при длине волны 630 нм.

Поскольку концентрация мочевины в моче достаточно высока, ее образцы необходимо разводить перед исследованием. Концентрацию мочевины в моче рассчитывают по разнице ре-

зультатов определения аммиака до и после обработки образца ферментом уреазой.

Длительное время достаточно распространенными являлись методы определения мочевины *с использованием диацетилмонооксида*. W. Fearon обнаружил, что это вещество реагирует с некоторыми первичными и вторичными аминами, содержащими общую структуру $R_1NH-CO-NHR_2$, где R_1 является или водородом, или алифатической группировкой, а R_2 не содержат ацильную ($-C=O$) группу. Диацетилмонооксид не реагирует с мочевиной непосредственно, вначале он расщепляется до диацетила и гидроксиламина. Диацетил в кислой среде вступает в реакцию с мочевиной с образованием окрашенного комплекса:

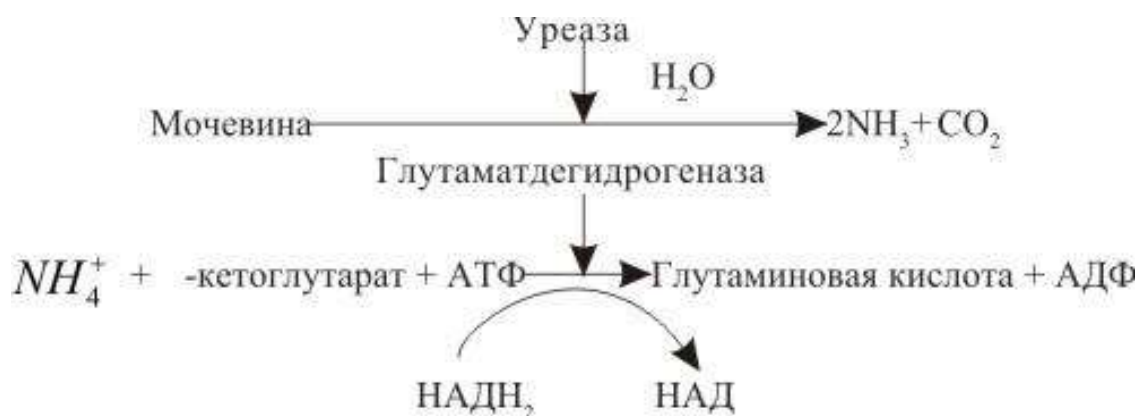


Данную реакцию адаптировали для определения мочевины как в моче, так и в сыворотке крови. Основными недостатками метода являются временная нестабильность окрашенного комплекса, а также токсичность реактивов.

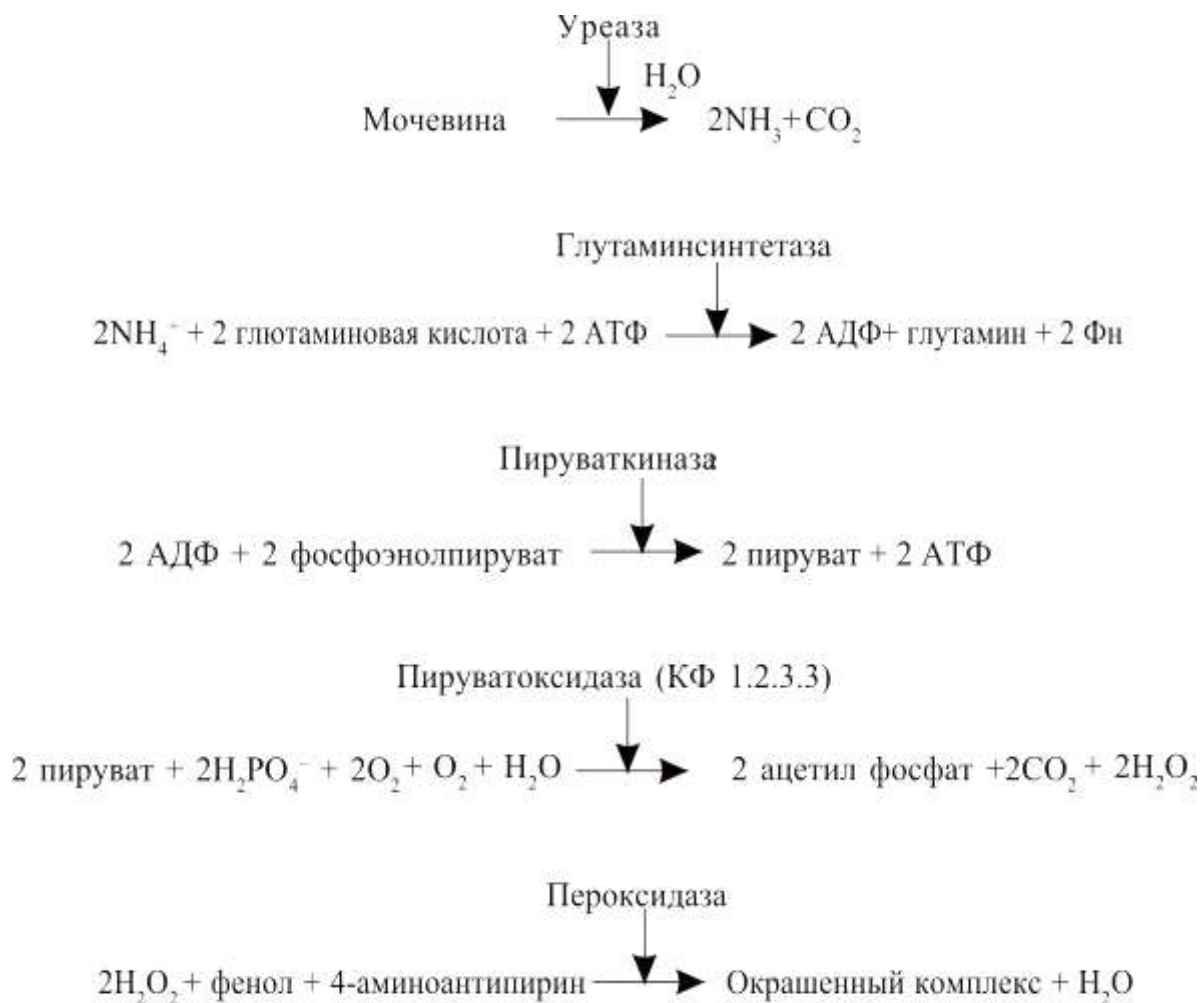
Ферментативные методы

Все современные ферментативные методы определения мочевины основаны на использовании в качестве реактива *уреазы*. При гидролизе мочевины образуется ион аммония, концентрацию которого определяют с использованием сочетанных ферментативных реакций, потенциометрических методов или технологий «сухой химии».

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



В другом варианте ферментативного определения мочевины аммиак, образующийся на первом этапе при участии уреазы, реагирует с глутаматом при участии аденозинтрифосфата (АТФ) в присутствии глутаминсинтетазы. Аденозиндифосфат (АДФ), образующийся в ходе этой реакции, определяют с использованием ферментов пируваткиназы и пируватоксидазы с образованием перекиси водорода. На заключительном этапе в реакции между пероксидом, фенолом и 4-аминоантипирином (индикатор) при участии фермента пероксидазы образуется окрашенный комплекс, величину поглощения которого оценивают фотометрически:



Разработан еще один ферментативный метод определения мочевины, основанный на использовании фермента лейциндегидрогеназы, связывающей ионы NH_4^+ в реакции с образованием *L*-изолейцина после гидролиза мочевины при участии уреазы. Метод проводят в два этапа:

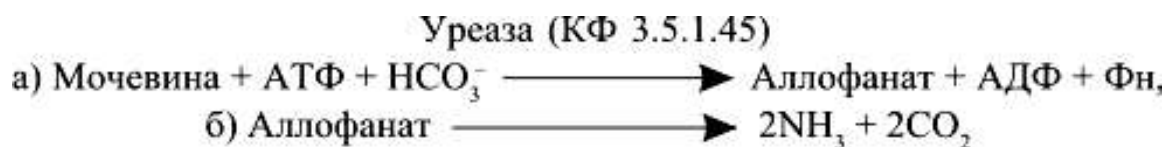
- NH_4^+ , содержащийся в исследуемом образце, реагирует с 2-кетоизокапроновой кислотой в присутствии НАДН_2 и лейциндегидрогеназы с образованием *L*-изолейцина:



- Определение концентрации NH_4^+ проводят с помощью добавления фермента уреазы в среду инкубации:



Для определения небольших количеств мочевины в биологических жидкостях предложен кинетический люминометрический метод. Он основан на использовании уреазы, расщепляющей мочевины в АТФ-зависимой реакции. Данный фермент катализирует две последовательно протекающие реакции: карбоксилирование мочевины (реакция а) и гидролиз аллофаната, образующегося в первой реакции (реакция б). Скорость гидролиза АТФ контролируют с помощью люминометра в люциферин-люциферазной реакции.



Суммарная реакция:



Потенциометрические методы

В этой группе методов скорость реакции оценивают по изменению электропроводности среды в ходе гидролиза мочевины при участии уреазы. Образующийся в ходе реакции CO_2 и аммиак увеличивают электропроводность реакционной смеси. Для регистрации скорости уреазной реакции в ряде анализаторов используют ион-селективные электроды. В потенциометрическом методе используют аммоний-селективный электрод с иммобилизированной уреазой.

Технология «сухой химии»

Данный подход к определению концентрации мочевины в сыворотке крови заключается в использовании реакции между NH_3 и pH -индикатором. Этот метод осуществляется с помощью тест-полосок с последующей визуальной оценкой результатов при использовании отражательной фотометрии. Образующийся аммиак диффундирует через полупроницаемый слой тест-полоски и реагирует с pH -индикатором, вызывая окрашивание сенсорной зоны.

Клиническое значение

Мочевина образуется в печени и является одним из конечных продуктов распада белков. Она не является таким надежным индикатором поражения клубочков почек, как креатинин. Это связано с тем, что помимо клубочковой фильтрации, уровень мочевины определяет потребление белка с пищей, поступление непищевого белка в желудочно-кишечный тракт (при кровотечении), а также образование мочевины из белка в печени. Превращение белка в мочевину возрастает при катаболических состояниях, ацидозе. С другой стороны, синтез мочевины может снижаться при тяжелой печеночной патологии. Реабсорбция мочевины в почечных канальцах усиливается вазопрессином, поэтому при дегидратации или других состояниях с повышением концентрации вазопрессина содержание мочевины повышается независимо от уровня клубочковой фильтрации.

Увеличение концентрации мочевины (гиперазотемия) в крови наблюдается при:

- ✓ сердечной недостаточности;
- ✓ шоке;
- ✓ остром инфаркте миокарда;
- ✓ обструкции мочевыводящих путей;
- ✓ кровотечении в желудочно-кишечный тракт;
- ✓ сахарном диабете с кетоацидозом;
- ✓ избыточном потреблении белка или распаде белков.

Уменьшение содержания мочевины в крови наблюдается:

- ✓ при печеночной недостаточности;
- ✓ при соблюдении диеты с низким содержанием белка;

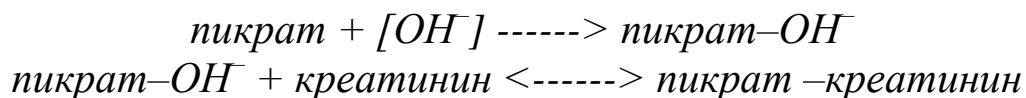
✓ при нарушении всасывания в кишечнике

Референтные значения:

Сыворотка крови – 2,5-8,3 ммоль/л.

Методы определения креатинина

Содержание креатинина в крови является лабораторным параметром, который традиционно используют для оценки функции почек. Определяют креатинин в большинстве случаев с помощью реакции, предложенной М. Яффе в 1886г.:



Скорость образования креатинин-пикратного комплекса постоянная при температуре ниже 30°C. При повышении температуры глюкоза, мочева и аскорбиновая кислоты приобретают способность превращать пикриновую кислоту в пикраминовую, обладающую максимумом поглощения при длине волны 482 нм, что приводит к ложному завышению результатов определения.

Величина *pH* является другим важным фактором, определяющим скорость вышеописанной реакции. Ее значение должно быть постоянным и находиться в интервале 12-12,4 ед. Разница в значениях *pH* реакционной среды, опытной, контрольной проб и стандартного раствора может быть значительной в тех случаях, когда последние готовят на растворах соляной кислоты. Кроме того, важное значение имеет выбор депротеинизирующего вещества и его концентрации. Считается, что наиболее целесообразно осаждать белки теми денатурирующими агентами, при использовании которых *pH* фильтрата или центрифугата находится ниже 2,5 ед.

Поскольку концентрация креатинина в сыворотке крови достаточно низка, реакцию стараются проводить при оптимальных значениях *pH* в интервале 12,3–12,4 ед. Для изменения *pH* раствора с 2,5 до 12,4 ед. используют растворы гидроксида натрия. Скорость образования окрашенного комплекса линейно за-

висит от концентрации OH^- ионов. Она определяет не только активность реакции, но и спектральную кривую поглощения окрашенного комплекса в интервале длин волн 485-520 нм. В большинстве случаев используют концентрацию гидроксида натрия менее 1 моль/л.

Референтные значения в крови:

Мужчины – 60-120 мкмоль/л.

Женщины – 44-97 мкмоль/л.

Клиническое значение

Важное диагностическое значение при многих заболеваниях почек имеют раздельная количественная оценка уровня фильтрации в клубочках, реабсорбции и секреции в канальцах, а также величины почечного плазмотока и кровотока.

Наиболее широко используемый метод оценки скорости клубочковой фильтрации (СКФ) в клинической практике в настоящее время основан на определении суточного клиренса эндогенного креатинина. Этот метод был предложен П. Ребергом в 1926г. Реберг внутривенно-капельно вводил экзогенный креатинин и определял его клиренс. В 1936г. Е. М. Тареев модифицировал метод тем, что предложил использовать концентрацию эндогенного креатинина, поскольку было установлено, что концентрация креатинина в плазме крови в течение суток остается стабильной.

Важным условием достоверности исследования является строгий учет времени, в течение которого собирают мочу. Наиболее достоверные результаты определения КФ получают при минутном диурезе в пределах 1,5-2 мл. Если минутный диурез меньше 1 мл, возможны заниженные, а при показателях больше 2,5 мл – завышенные значения КФ. Суть исследования заключается в сборе суточной мочи, определении концентрации креатинина в крови и моче, расчета величины минутного диуреза и определении клиренса по формуле:

$$C = \frac{\text{Креатинин}_{\text{мочи}}}{\text{Креатинин}_{\text{плазмы}}} \times V \text{ (мл/мин)}$$

Референтные значения: муж. 80-120 мл/мин;
жен. 70-110 мл/мин.

Перерасчет С на поверхность тела:

$$C_{1,73} = (C \times 1,73) / S \text{ м}^2$$

1,73 м² – стандартная поверхность тела;
S м² – площадь поверхности тела исследуемого.

Использование клиренса эндогенного креатинина как показателя, оценивающего СКФ, сопряжено с рядом проблем, главными из которых являются: организация правильного сбора суточной мочи, что особо актуально для амбулаторных пациентов и новорожденных, а также достижение необходимого качества определения креатинина в крови и моче.

Креатинин образуется преимущественно в мышцах в результате метаболизма креатина, а, следовательно, его генерация пропорциональна общей мышечной массе. В результате средняя скорость образования креатинина выше у мужчин, чем у женщин, у молодых, чем у пожилых. Это обстоятельство приводит к различиям в концентрациях креатинина сыворотки в зависимости от возраста и пола.

Мышечное истощение приводит к снижению интенсивности образования креатинина, что в свою очередь ведет к более низкой концентрации креатинина сыворотки по сравнению с ожидаемой (исходя из значений СКФ) у пациентов с белково-энергетической недостаточностью. На генерацию креатинина в определенной степени влияет также употребление мяса, так как в процессе его приготовления часть креатина переходит в креатинин. Поэтому у пациентов на низкобелковой диете креатинин сыворотки ниже, чем можно было бы ожидать, исходя из уровня СКФ. Эти эффекты особо значимо влияют на несоответствие значений креатинина сыворотки и уровня СКФ у пациентов с хроническими заболеваниями почек. Кроме того, хотя у лиц с нормальной функцией почек внепочечная экскреция креатинина минимальна, у пациентов с хроническим заболеванием почек она увеличивается из-за деградации креатинина, вызванной избыточным ростом бактерий

в тонком кишечнике. У пациентов с выраженным нарушением функции почек до двух третей общей суточной экскреции креатинина может происходить за счет его внепочечной элиминации.

Вследствие этого на фоне снижения экскреции креатинина с мочой, активация внепочечных потерь креатинина при хроническом заболевании почек приводит к снижению его уровня в крови и как следствие – к систематическому завышению СКФ, рассчитанному по креатинину сыворотки. Таким образом, увеличение уровня креатинина в сыворотке не является чувствительным показателем уменьшения СКФ. Только у 60% пациентов со сниженной СКФ имеется повышенный креатинин сыворотки. Иначе говоря, 40% лиц со сниженной СКФ имеют уровень креатинина сыворотки в пределах нормы.

Еще одной проблемой применения изолированного измерения креатинина крови для оценки клубочковой фильтрации являются аналитические особенности его определения в лаборатории. Так, у молодых людей нормальный уровень креатинина сыворотки составляет примерно 0,088 ммоль/л. Традиционным методом определения креатинина является реакция Яффе с пикриновой кислотой, который выявляет наряду с ним и ряд некреатининовых хромогенов (примерно 20% от концентрации креатинина в сыворотке). Моча в то же время в норме не содержит некреатининовых хромогенов, но при хроническом заболевании почек данные вещества там появляются. Таким образом, измеряемый клиренс креатинина систематически занижает истинный.

Современные биохимические автоанализаторы используют менее зависимые от уровня некреатининовых хромогенов (например, кинетическая модификация реакции Яффе или методы, основанные на энзиматических реакциях) методы для определения креатинина. Кроме некреатининовых хромогенов, существует целый ряд веществ, способных влиять на результаты определения креатинина сыворотки. К таким веществам относятся кетонные тела и некоторые лекарственные препараты. Присутствие этих субстанций в крови может приводить к ложному повышению концентрации креатинина сыворотки и как следствие, к занижению СКФ.

Таким образом, на уровень креатинина сыворотки, помимо СКФ, оказывают влияние и другие факторы, включающие воз-

раст, пол, расу, площадь поверхности тела, диету, некоторые лекарства, аналитические лабораторные методы (табл. 3).

На основании вышеизложенного правомерен вывод о том, что клиренс креатинина не является точным показателем уровня почечной функции, а сам креатинин не следует использовать для определения стадии хронического заболевания почек.

В 2006 г. Национальной образовательной программой по заболеваниям почек США (NKDEP) совместно с Международной федерацией клинической химии и лабораторной медицины (IFCC) и Конфедерацией клинической химии Европейского сообщества была предложена программа стандартизации измерения креатинина в сыворотке крови. В рамках NKDEP и ряда фондов для пациентов старше 18 лет была разработана так называемая MDRD-формула (Modification of Diet in Renal Disease) для расчета СКФ:

$$\text{СКФ (мл/мин/1,73 м}^2\text{)} = 11,33 \times [\text{креатинин}]_{\text{сыв}} \times (\text{возраст, годы})^{-0,203} \times (0,742 \text{ для женщин}) \times (1,21 \text{ для афро-американцев})$$

Преимущества данной формулы состоят в том, что она выведена на основании следующих данных:

- непосредственно измеренной СКФ методом определения мочевого клиренса ^{125}I -иоталамата;
- изучения большой группы пациентов (более 500) с широким диапазоном заболевания почек;
- включения в исследуемую группу пациентов разных рас.

Таблица 3. – Факторы, влияющие на уровень креатинина в сыворотке

Факторы	Эффект	Механизм эффекта
Патология почек	Повышает	Снижение СКФ, но при этом увеличивается уровень канальцевой секреции креатинина и снижается интенсивность его образования, что уменьшает степень роста креатинина в сыворотке
Уменьшение мышечной массы	Понижает	Снижается образование креатинина (наблюдается у детей, женщин, пожилых и лиц с белково-энергетической недостаточностью)

Факторы	Эффект	Механизм эффекта
Употребление мясной пищи	Повышает	Транзиторное увеличение образования креатинина
Некоторые цефалоспорины	Повышает	Интерференция с аналитическими методами определения креатинина в сыворотке
Кетоацидоз	Повышает	

Эта формула позволяет определить уровни СКФ, стандартизованные по площади поверхности тела. Расчеты выполняются с использованием доступных в Интернете, загружаемых калькуляторов.

Разработан ряд формул для определения СКФ у новорожденных. Наиболее предпочтительной является формула Шварца. Она использует произведение константы и роста ребенка, деленное на креатинин сыворотки:

$$\text{СКФ} = (4,3 \times \text{Рост, м}) / [\text{креатинин, ммоль/л}]$$

Формула Шварца была разработана при измерении клиренса инулина и по креатинину, измеренному модифицированным методом Яффе, который может завышать истинный креатинин. Для формулы Шварца большинство исследований сообщают о средней разности между расчетной и измеренной СКФ. Несмотря на некоторую неточность, формула Шварца для оценки СКФ у детей удобна и практична, она используют рост в расчетах, поскольку он пропорционален мышечной массе.

Скорость клубочковой фильтрации у младенцев количественно отличается от таковой у детей старших возрастных групп и взрослых. В течение первых 12-18 месяцев жизни СКФ увеличивается (табл. 4).

Таблица 4. – СКФ у детей и молодых людей

Возраст (пол)	Средняя СКФ±SD (мл/мин/1,73 м ²)
1 неделя жизни (мальчики и девочки)	40,6±14,8
2-8 недель жизни (мальчики и девочки)	65,8±24,8
>8 недель жизни (мальчики и девочки)	95,7±21,7
2-12 лет (мальчики и девочки)	133,0±27,0
13-21 год (молодые люди)	140,0±30,0
13-21 год (девушки)	126,0±22,0

Примечание: SD – стандартное отклонение

Методы определения мочевой кислоты

Методы, используемые для определения мочевой кислоты (МК) в крови, можно разделить на следующие группы:

1. «Редукционные», основанные на способности МК восстанавливать ряд соединений, в частности фосфорновольфрамную кислоту.
2. Ферментативные (уриказные).
3. Методы прямой фотометрии.

Методы, в которых используется фосфорновольфрамный реактив, основаны на образовании раствора синей окраски в результате его восстановления мочевой кислотой в щелочной среде. В настоящее время существует ряд модификаций данного метода, где мочевую кислоту осаждают путем образования ее солей. В качестве щелочного реактива при этом используют цианид мочевины. В данном подходе не требуется отделения мочевой кислоты от фильтрата. Для удаления белков чаще всего используют вольфрамную, трихлоруксусную или фосфорновольфрамную кислоты.

В 50-х гг. прошлого века *S. Natelson* предложил модифицированный метод *O. Folin* в качестве «стандартного» метода определения МК. Окисление при этом происходило фосфорновольфрамной кислотой в присутствии цианида натрия и мочевины. В 1964г. была предложена еще одна модификация метода *O. Folin*,

в которой растворы карбоната натрия и фосфорновольфрамовой кислоты добавляли к фильтрату после осаждения белков реактивом *Folin-Woo*. В данной группе методов удаление белков является обязательным условием. Кроме того, методы, основанные на восстановлении фосфорновольфрамowego реактива мочевой кислотой, чувствительны ко многим соединениям: глюкозе, аскорбиновой кислоте, цистеину и др.

Ферментативные (уриказные) методы являются наиболее специфичными, поскольку окисление МК протекает под действием фермента уриказы, обладающего высокой субстратной специфичностью. В данных методах не требуется предварительного осаждения белков. Уриказные методы основаны на реакции окисления МК до аллантаина и образовании перекиси водорода. Аллантаин, в отличие от МК, не имеет максимума поглощения при 290-293 нм. Определение величины поглощения при этих длинах волн до и после инкубации мочевой кислоты с уриказой используются для определения МК не только в крови, но и в моче. Данные методы в настоящее время полностью вытеснили неспецифичные «редукционные». Реакция, протекаемая при осуществлении уриказных методов, может проводиться как в режиме непрерывной регистрации, так и с фиксированным временем инкубации.

В методах с использованием сопряженных реакций определяют количество перекиси водорода, образующейся в уриказной реакции. В индикаторных реакциях используют пероксидазу либо каталазу.

Во вспомогательной реакции, катализируемой каталазой, образуется формальдегид, который вступает в реакцию с ацетил-ацетоном и аммиаком. При этом образуется комплекс, окрашенный в желтый цвет.

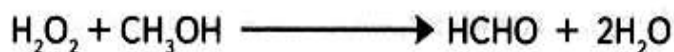
Основная реакция

Уриказа



Вспомогательная реакция

Каталаза



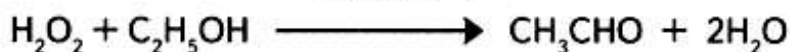
Метанол

Формальдегид

В современных ферментативных методах определения МК в сыворотке используют пероксидазную систему с образованием окрашенного продукта реакции. Перекись водорода, образующуюся при окислении МК под действием уриказы, определяют количественно окислением о-дианизидина. Перекись водорода может реагировать с 3,5-дихлор-2-гидроксибензолсульфоновой кислотой и 4-аминофеназоном с образованием окрашенного в красный цвет комплекса.

Перекись водорода, образующуюся в уриказной реакции, выявляют реакцией окисления этанола до ацетальдегида, запускаемой каталазой, и окисления ацетальдегида до ацетата в присутствии альдегиддегидрогеназы и НАД. Измеряют поглощение при длине волны 340 нм:

Каталаза



Этанол

Ацетальдегид

Альдегиддегидрогеназа



НАД

НАДН₂

Ацетат

Помимо вышеописанных подходов, для определения МК могут быть использованы *методы ВЭЖХ*. Разработан высоко-

чувствительный метод ион-парной хроматографии для одновременного определения в биологических жидкостях мочевой кислоты, гипоксантина и ксантина при длине волны 280 нм. Для определения МК с применением ВЭЖХ используют плазму вместе с внутренним стандартом, поглощение определяют спектрофотометрически при длине волны 254 нм.

Для определения мочевой кислоты в сыворотке крови и моче можно использовать **кулонометрический метод с использованием уриказы**. Он основан на определении общего количества редуцирующих соединений, образующихся при кулонометрическом титровании йодом до и после реакции с уриказой. Разность этих значений отражает уровень МК в образце.

Клиническое значение

Подагра. Гиперурикемия часто носит семейный характер и приблизительно в 25% случаев развивается в результате увеличенного синтеза пуринов. В большинстве проведенных клинических исследований самая высокая частота суставной подагры у мужчин с гиперурикемией наблюдалась среди пациентов с наибольшей концентрацией МК в крови. Важное клиническое значение при постановке диагноза имеет оценка выведения МК с мочой. Величину отношения МК/креатинин в утренних образцах мочи использовали для выявления синдрома *Lesch-Nyhan*, который связан с практически полным отсутствием активности фермента гипоксантин гуанинфосфорибозилтрансферазы. Данный показатель также используется для выявления частичного дефицита этого фермента у взрослых пациентов с подагрой.

Отношение МК/креатинин в моче здоровых людей составляет **от 0,21 до 0,59**, у пациентов с подагрой **от 0,15 до 0,73**, а у пациентов с гиперурикемией при лейкозе или гликогенозе – **от 0,25 до 1,77**. Величина отношения МК/креатинин в случайном образце мочи **выше 1,0** у пациентов с острой почечной недостаточностью, развившейся в результате уратной нефропатии, и **ниже 1,0** у пациентов с острой почечной недостаточностью, развившейся при других заболеваниях.

Референтные значения:

Сыворотка крови	– 200-420 мкмоль/л;
Моча	– 1,5-4,5 ммоль/сут.

ЛАБОРАТОРНЫЕ МЕТОДЫ ОЦЕНКИ ПИГМЕНТНОГО ОБМЕНА

Билирубин представляет собой оранжево-желтый пигмент, образующийся при разрушении стареющих эритроцитов в клетках ретикуло-эндотелиальной системы (селезенка, печень, костный мозг). Он был обнаружен *R. Virchow* в 1849г. и назван желтым пигментом «гематоином». Термин «билирубин» был предложен *Stadeler* в 1864г. В 1942г. *Fisher* и *Plieninger* синтезировали билирубин IX α и расшифровали его структуру. Молекула билирубина состоит из четырех колец пиррола. Основная химическая особенность его молекулы – неспособность растворяться в воде и растворимость во многих неполярных растворителях. Методом рентгеноструктурного анализа была выявлена трехмерная структура молекулы билирубина, стабилизируемая шестью внутримолекулярными водородными связями. Они образуют так называемую Z-Z конфигурацию билирубина и препятствуют его взаимодействию с полярными группами в водной среде. После облучения светом Z-Z конфигурация приобретает E-E конформацию, которая препятствует образованию внутренних водородных связей, характерных для Z-Z конфигурации, молекула становится более растворимой в воде и билирубин легко выводится в желчь.

Конформация билирубина в водном растворе при нейтральном *pH* неизвестна, но образование структуры, стабилизируемой водородными связями, способно объяснить некоторые стороны взаимодействия билирубина с химическими соединениями. Добавление в реакционную среду соединений, разрушающих водородные связи в молекуле билирубина (кофеин, метанол, этанол), необходимо для реакции неконъюгированного билирубина с диазореактивом. В основе их действия лежит нарушение внутренних водородных связей в молекуле билирубина, что позволяет ему реагировать с диазотирующими агентами. Молекула глюкуроновой кислоты препятствует образованию в молекуле билирубина внутренних водородных связей, делает билирубин-моноглюкуронид или диглюкуронид растворимыми в воде.

Билирубин, выделенный из естественных источников, практически полностью (99%) состоит из IX α . Билирубины IX β и IX δ , являясь результатом расщепления β - и δ -метиленовых связей, со-

ставляют менее 0,5% от всего билирубина, выделенного из желчи. Около 80% билирубина в организме образуется из гема разрушающихся в ретикулоэндотелиальных клетках печени, селезенки и костного мозга эритроцитов. Оставшиеся 20% образуются из предшественников эритроцитов, разрушающихся в костном мозге и при расщеплении других гемсодержащих белков (рис. 10). За сутки при разрушении эритроцитов образуется от 200 до 330 мг билирубина. Его клиренс в норме составляет около 5 мг/кг/сут.

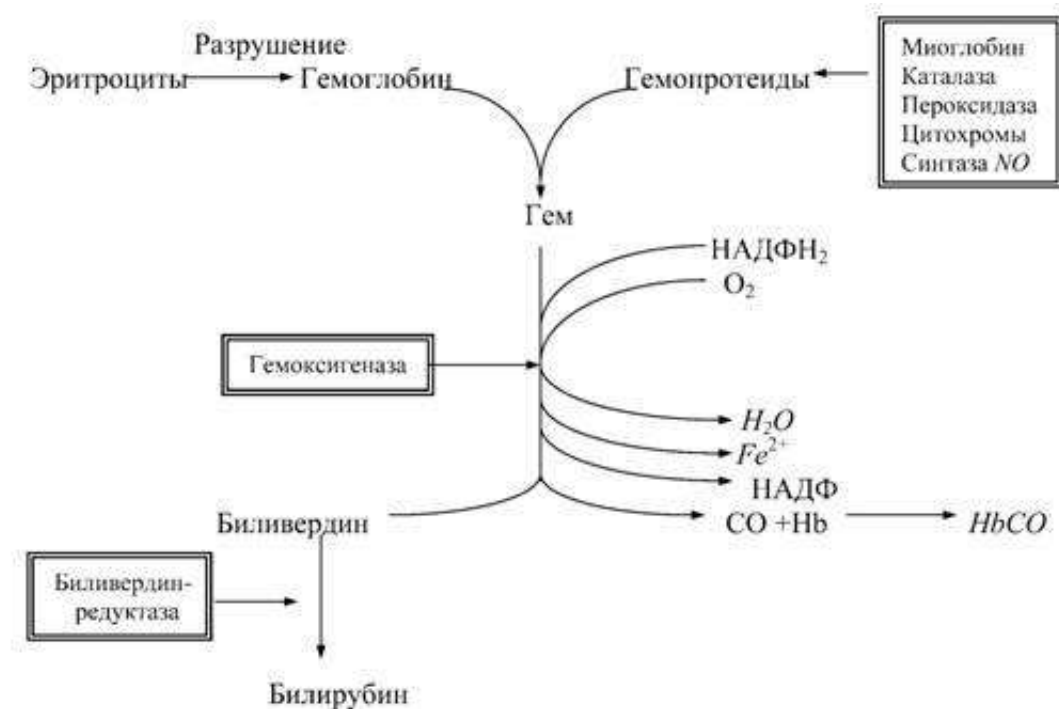


Рисунок 10. – Образование билирубина из гемоглобина и гемопротеидов

Период полужизни неконъюгированного билирубина составляет менее 5 минут. В крови билирубин связывается с альбумином и транспортируется в печень. Билирубин отщепляется от альбумина на синусоидальной мембране гепатоцита и переносится через мембрану. В трансмембранном переносе пигмента принимают участие специфические транспортные белки – лигандин и протеин Z. В гепатоцитах билирубин быстро связывается с глюкуроновой кислотой с образованием моно- и диглюкуронидов, которые экскретируются в желчь. Микросомальный фермент билирубин-УДФ-глюкуронилтрансфераза катализирует образо-

вание глюкуронидов билирубина. У взрослых фактически весь экскретируемый в желчь билирубин находится в форме гликозидных конъюгатов. Глюкурониды составляют 95% от них и глюкозиды и ксилозиды составляют остаток. Из глюкуронидов диглюкуронид есть основная фракция (90%) и моноглюкуронида меньшая часть – 10%. Таким образом, в гепатоцитах происходит образование конъюгированной (связанной, прямой) фракции билирубина. С желчью пигмент попадает сначала в тонкий кишечник, где под действием кишечной микрофлоры происходит образование уробилиногена (мезобилиногена), а затем в толстый, где образуется стеркобилиноген (рис. 11).

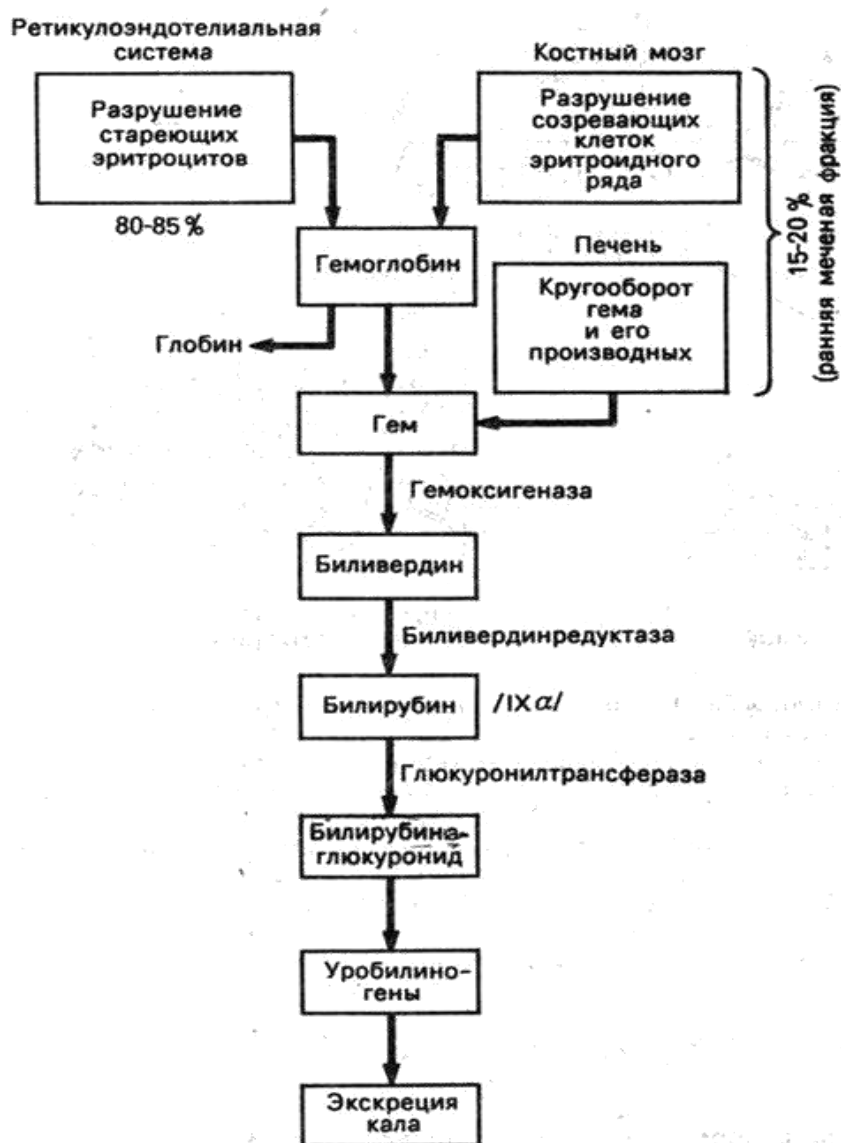


Рисунок 11. – Метаболизм билирубина в организме

Методы определения билирубина в крови

Реакция между билирубином и диазотированной сульфаниловой кислотой была открыта *Эрлихом* в 1883г. Позже она использовалась для определения билирубина в сыворотке и желчи *Bergh* и *Muller*.

Химическая природа «прямого» и «непрямого» билирубина была выяснена в середине 1950-х *Billing*, *Cole* и *Lathe*. С помощью хроматографических методов из сыворотки были выделены 3 фракции билирубина: неконъюгированный, билирубин-моноглюкуронид и диглюкуронид.

Большинство используемых в настоящее время химических методов определения билирубина в крови основаны на диазореакции. В данной реакции диазотированная сульфаниловая кислота реагирует с билирубином с образованием двух азодипирролов (азопигменты) красной окраски при нейтральном *pH* и синей – при высоких значениях *pH*. *Van den Bergh* и *Muller* впервые применили этот метод для определения фракций билирубина в сыворотке.

Среди методов, в которых в качестве акселератора используют метиловый спирт, наиболее распространенным является способ, предложенный *Маллой и Эвелин*. Данный метод в силу определенных методических особенностей в настоящее время практически не используется. Позже в качестве акселераторов было предложено использовать следующие вещества: кофеин, бензоат натрия, мочевины и др. Их применение позволило проводить реакцию между непрямым билирубином и диазореактивом в водной среде путем повышения растворимости или каталитическим путем. Применяя эти вещества, удастся избежать использования спирта при определении общего билирубина и тем самым устранить ошибки, связанные с денатурацией белков. Наиболее часто используемые акселераторы в настоящее время – кофеин, дифиллин и поверхностно активные агенты.

Диазометод, предложенный *L. Jendrassik* и *P. Grof* в 1938г. обеспечивает получение воспроизводимых и надежных результатов. В этой методике в качестве акселераторов используется водный раствор кофеина и бензойнокислого натрия. Механизмом, с помощью которого раствор бензоата и кофеина облегчает взаимодействие билирубина с диазореактивом, является вытеснение

кофеином и бензоатом неконъюгированного билирубина из участков его связывания на альбумине. Это происходит путем образования водородных связей между билирубином и кофеином, что делает данный пигмент водорастворимым. При проведении исследований в клинике билирубин в сыворотке обычно определяют в виде общего и прямого. Путем вычитания прямого из общего количества определяют концентрацию непрямого билирубина.

Определение оксида углерода для оценки скорости образования билирубина. Гемолиз увеличивает образование билирубина, поэтому выраженность желтухи и скорость образования билирубина у новорожденных не всегда коррелируют, а скорость выведения билирубина колеблется. Учитывая то, что оксид углерода и билирубин при расщеплении гема образуются в эквимоллярных количествах, определение оксида углерода в выдыхаемом воздухе используют в качестве индикатора скорости образования билирубина.

Ферментативные методы. Данные методы определения билирубина основаны на реакции его окисления ферментом билирубиноксидазой до биливердина. Это происходит при *pH* реакционной среды около 8 и в присутствии холата и додецилсульфата натрия. Уменьшение поглощения при длине волны 460 нм пропорционально концентрации общего билирубина в сыворотке. Результаты ферментативного метода хорошо согласуются с результатами, полученными в методе *Iendrassik-Grof*.

Неинвазивный метод определения билирубина (транскутанная билирубинометрия). Данный метод для определения концентрации билирубина был предложен *Yamanouchi* и соавторами. Разработаны неинвазивные способы для чрескожного определения билирубина с помощью билирубинометров. Билирубинометр (*icterometer*) представляет собой отражательный фотометр, позволяющий по интенсивности окраски кожных покровов судить о концентрации билирубина в крови. В настоящее время используются анализаторы, обеспечивающие получение результатов, сопоставимых с таковыми при использовании диазометода. При высоких концентрациях билирубина в сыворотке (более 170 мкмоль/л) ряд анализаторов может «недооценивать» концентрацию билирубина. Тем не менее, при массовых исследованиях новорожденных разных расовых и этнических групп данным мето-

дом концентрация билирубина в сыворотке составляла от 30-485 мкмоль/л и результаты достаточно хорошо коррелировали с концентрацией пигмента в сыворотке, установленной с помощью метода *Jendrassik-Grof*.

Использование билирубинометров снижает необходимость в исследовании крови и облегчает наблюдение за новорожденными вне стационара. Вместе с тем данный метод определения билирубина не может полностью вытеснить количественные лабораторные методы, используемые в клинике. Полученные с помощью транскутанной билирубинометрии результаты обеспечивают быстрое получение информации, уменьшают потребность в повторных венепункциях и экономические затраты.

Проведение транскутанной билирубинометрии



Методы «сухой химии». Разработано несколько подходов для определения концентрации билирубина с использованием технологии «сухой химии». С целью уровня общего билирубина используется модификация метода *Jendrassik-Grof*. Конъюгированный и неконъюгированный билирубин при этом определяют после связывания со сложным гидрофобным катионоактивным полимером. Данная реакция приводит к смещению спектра поглощения билирубина, т.к. неконъюгированный билирубин обладает более высокой поглощающей способностью по сравнению с конъюгированным билирубином при 460 нм.

Хроматографический метод. Использование высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) позволяет устранить многие проблемы, связанные с нестабильностью билирубина и его метаболитов. Учитывая высокую чувствительность и специфичность, данный метод может быть использован в качестве референтного, однако высокая стоимость его проведения ограничивает широкое клиническое использование методики.

Клиническое значение

При увеличении концентрации билирубина в крови он становится основным повреждающим фактором:

- ингибирует активность митохондриальных ферментов;
- нарушает синтез ДНК;
- блокирует синтез белка и процессы фосфорилирования;
- замедляет поглощение тирозина, что нарушает процессы синаптической передачи;
- способен блокировать работу ионных каналов;
- ингибирует ионный обмен и транспорт воды в почках.

Повышение уровня конъюгированного билирубина в крови является специфичным признаком заболеваний печени и желчных путей. Данный рост может происходить при нарушении энергозависимого процесса выведения билирубина, что наблюдается при сепсисе, у пациентов, находящихся на длительном парентеральном питании после оперативного вмешательства.

Нарушения обмена билирубина

Механизмы развития

1. Повышенное образование билирубина.
2. Сниженное поглощение билирубина печенью.
3. Сниженное связывание пигмента в печени.
4. Уменьшение поступления билирубина в желчь, обусловленное как внутри- так и внепеченочными факторами.

Выделяют две группы нарушений обмена билирубина в организме:

1. Гипербилирубинемии, обусловленные повышением прямого билирубина:

1. Чрезмерное образование билирубина:

- ✓ гемолиз (внутри- и внесосудистый);
- ✓ неэффективный эритропоэз.

2. Сниженное поглощение пигмента печенью:

- ✓ лекарственные препараты;
- ✓ длительное голодание;
- ✓ сепсис.

3. Сниженное связывание билирубина (снижение активности глюкуронилтрансферазы):

- ✓ синдром Жильбера;
- ✓ синдром Криглера-Найяра (умеренное снижение глюкуронилтрансферазы) – врожденная негемолитическая желтуха II типа;
- ✓ синдром Криглера-Найяра (отсутствие глюкуронилтрансферазы) – врожденная негемолитическая желтуха I типа;
- ✓ желтуха новорожденных;
- ✓ застойная сердечная недостаточность и др.

II. Гипербилирубинемии, обусловленные увеличением прямого билирубина:

1. Семейные или наследственные заболевания:

- ✓ синдром Дабина-Джонсона;
- ✓ синдром Ротора;
- ✓ рецидивирующий (доброкачественный) внутрипеченочный холестаз.

2. Повреждение внутрипеченочных желчных протоков:

- ✓ первичный билиарный цирроз;
- ✓ первичный склерозирующий холангит;
- ✓ отторжение печеночного трансплантата;
- ✓ опухоли.

3. Повреждения внепеченочных желчных протоков:

- ✓ холедохолитиаз;
- ✓ опухоли;
- ✓ первичный склерозирующий холангит;
- ✓ стриктуры желчных протоков.

Определение билирубина в моче

Присутствие билирубина в моче указывает на конъюгированную гипербилирубинемия. Для определения пигмента при этом используют **методы «сухой химии»**. С их помощью удастся обнаружить концентрацию билирубина ниже 0,5 мг/100 мл. Для проведения исследования необходим свежий образец мочи, поскольку билирубин нестабилен при освещении и комнатной температуре и может окисляться до биливердина (который не вступает в диазореакцию) при кислых значениях *pH* мочи. Если определение билирубина отсрочено, образец следует защитить от света и хранить при температуре от 2 до 8°C не более 24 ч. Использование диагностических тест-полосок для определения билирубина в моче представляет собой высокоспецифичный тест с низким числом ложноположительных результатов. Ряд лекарственных препаратов, окрашивающих мочу в красный цвет или меняющих окраску мочи при низких значениях *pH*, могут привести к ложноположительным результатам.

Референтные значения:

Кровь – 8,25-20,5 мкмоль/л;

Моча – <0,34 мкмоль/л.

ЭНЗИМОДИАГНОСТИКА

Энзимодиагностика является одной из областей энзимологии и в настоящее время развивается по двум путям: первый – использование ферментов в качестве реагентов для количественного определения нормальных или патологических химических веществ в сыворотке крови, моче, желудочном соке и др.; второй путь – количественное определение активности самих ферментов в биологических жидкостях при патологии.

Ферменты сыворотки крови можно разделить на 3 группы:

1. Клеточные ферменты поступают в кровь из органов и тканей. Уровень их сывороточной активности зависит от содержания энзимов в тканях, молекулярной массы. Клеточные ферменты принято делить на неспецифические и органоспецифические.

2. Секреторные ферменты синтезируются клетками, поступают в кровь и выполняют специфические функции в кровяном русле, поэтому их называют собственно ферментами крови. Это ферменты свертывающей системы и фибринолиза, каллекриин-кининовой системы, холинэстераза и др.

3. Экскреторные ферменты образуются пищеварительными железами и из их секретов поступают в кровь (амилаза, липаза и др.). Процессы синтеза, функционирования и распада ферментов идут непрерывно и одновременно обеспечивают определенный уровень их активности в тканях.

Поскольку ферменты локализуются в разных клеточных компартментах, таких как цитозоль, лизосомы, клеточная мембрана или митохондрии, то появление определенной группы ферментов может свидетельствовать о степени и тяжести повреждения клеток.

В последнее время особое внимание уделяется исследованию не отдельных ферментативных реакций, а их сочетаний в комплексах (так называемых констелляционных типов), которые наиболее информативно отражают существо тех или иных патобиохимических нарушений. В настоящее время такие ферментативные констелляции систематизированы для разных видов патологии печени, мышечной ткани, воспалительных процессов, злокачественных новообразований и др. В результате комплексных исследований можно говорить об

определенных биохимических синдромах, характеризующих отдельные заболевания, а также о надежности лабораторных методов, помогающих врачу в объективной оценке патологии.

Для уточнения диагноза желательно определение изоферментного спектра того или иного фермента, выявление изменения функционирования пато- и органоспецифичных изоферментов, а также сопоставление активности обнаруженных в крови ферментов с их активностью в органах и тканях в норме.

Особое значение в трактовке биохимических тестов приобретают сопоставления их с особенностями клиники. В некоторых случаях при энзимодиагностике для суждения об активности фермента необязательно непосредственное его исследование, можно ограничиться определением легкодоступных метаболитов в крови и моче, изменение которых может отражать функцию той или иной ферментной системы. При этом необходимо знание механизма действия ферментов, его регуляции и взаимосвязи ферментативных процессов.

При трактовке данных энзимодиагностики рекомендуется учитывать особенности функционирования биокаталитических систем, среди которых особое значение имеет биологическая индивидуальность. В настоящее время четко показано, что здоровым людям присущ генетически обусловленный полиморфизм белкового спектра, не связанный с развитием каких-либо патологических состояний. Такой полиморфизм обнаружен и в отношении ферментов. В перспективе станет возможным объединение людей в группы в зависимости от особенностей генетического полиморфизма, характеризующегося разными ферментными профилями. При оценке результатов энзимодиагностики необходимо учитывать также суточные колебания ферментативной активности и другие биоритмы. Изменение активности фермента может быть вызвано качеством и количеством питания или приемом определенных фармакологических средств, которые могут выступать в качестве индуктора ферментсинтезирующей системы (или, наоборот, ингибировать ее отдельные звенья). Хорошо известно, что почти любой лекарственный препарат оказывает влияние на состояние многих ферментных систем.

В клинико-диагностических лабораториях измерения активности ферментов обычно проводят в сыворотке крови, но ферменты можно определять и в других жидкостях организма: моче, панкреатическом соке, ликворе, слезной жидкости, где изменение их активности также имеет существенное клинико-диагностическое значение.

Гипоферментемия встречается относительно редко и касается в основном секреторных ферментов. В подавляющем большинстве случаев она связана с генетически детерминированными нарушениями синтеза определенных энзимов, реже – с ингибированием, усиленной деградацией или экскрецией.

Дисферментемия обусловлена появлением в крови органоспецифических ферментов.

Гиперферментемия свидетельствует о некрозе или лизисе клеток, либо о нарушении проницаемости клеточных мембран. Развитию гиперферментемии способствует клеточная пролиферация, усиление синтеза энзимов клетками, повышение концентрации активаторов в кровяном русле.

Основной трудностью использования определения активности ферментов в диагностических целях является отсутствие специфичности повышения ферментативной активности при повреждении определенной ткани или органа. Поскольку многие ферменты присутствуют в разных тканях и органах, то повышение их активности в сыворотке может быть связано с повреждением любого из этих органов. Задача дифференциальной диагностики может быть решена одним из следующих способов:

✓ Определение более чем одного фермента. Разные ткани содержат ферменты в разных количествах. Так, АлАТ и АсАТ содержатся в гепатоцитах и кардиомиоцитах, но АлАТ существенно больше в печени, а АсАТ в сердце. Поэтому при повреждении печени относительно больше повышается АлАТ, при повреждении сердца – АсАТ.

✓ Определение спектра изоферментов. Данный подход основан на том, что отдельные изоформы характерны для разных тканей.

✓ Определение активности ферментов в динамике. Скорость изменения активности фермента в сыворотке определяется разницей между скоростью его повышения в сыворотке и скоростью удаления из системы циркуляции. При инфаркте органа и некрозе поврежденных клеток в сыворотке крови происходит повышение активности внутриклеточных ферментов, специфичных для данной ткани, затем после выхода всего фермента его активность снижается.

Необходимо помнить, что не всегда активность фермента в сыворотке отражает тяжесть заболевания. Так, острое повреждение клеток при вирусном гепатите может сопровождаться очень высоким подъемом активности ферментов, которая будет падать по мере выздоровления. В то же время при циррозе печень может быть сильнее вовлечена в патологический процесс, но скорость повреждения клеток ниже и активность ферментов в сыворотке будет повышена незначительно или даже находиться в пределах референтных значений. Этот пример подчеркивает, что любые результаты по исследованию активности ферментов в сыворотке должны быть обязательно сопоставлены с другими лабораторными исследованиями и клиническими проявлениями заболевания.

Перед постановкой окончательного диагноза необходимо исключить возможность неспецифического повышения активности ферментов в сыворотке. Так, относительно невысокое повышение в сыворотке активности аминотрансфераз (АлАТ и АсАТ) характерно для многих неспецифических патологических процессов. Тяжелая физическая работа, массивные внутримышечные инъекции могут привести к повышению активности креатинкиназы (КК) в сыворотке. Некоторые лекарственные средства, в частности фенитоин, а также фенobarбитал могут индуцировать синтез микросомального фермента гамма-глутамилтранспептидазы (ГГТП). Активность таких ферментов сыворотки, как ЛДГ, ЩФ и КК, может меняться в результате их агрегации и образования комплексов с иммуноглобулинами.

Основные правила работы с ферментами

Ферменты, как все белки, являются относительно неустойчивыми веществами. Они легко подвергаются денатурации и инактивации. Работая с ферментами в КДЛ, следует соблюдать следующие правила:

1. Нельзя сильно встряхивать растворы ферментов и допускать образование пены при их перемешивании.

2. Растворенные реагенты, контрольные материалы и сыворотки, содержащие ферменты, перед использованием необходимо выдержать при комнатной температуре в течение времени, указанного в инструкции, чтобы фермент пришел в конформационно активное состояние.

3. Время начала и окончания ферментативной реакции следует фиксировать. Началом реакции считается момент добавления сыворотки в реакционную смесь, а также окрашивающего реагента, если реакция двухстадийная. Для кинетических методов, когда анализ в нескольких пробах проводят последовательно, время начала реакции и равные промежутки времени между фотометрированиями следует точно фиксировать для каждой отдельной пробы. По истечении времени реакции следует с таким же интервалом останавливать реакцию в параллельных пробах. Таким образом, время реакции будет фиксировано для каждой отдельной пробы.

4. Перед проведением ферментативной реакции температуру рабочего реагента необходимо довести до значения, указанного в инструкции.

5. Нельзя изменять соотношение рабочий реагент/сыворотка. Его уменьшение в целях экономии может привести к сужению линейной области определения и в конечном итоге – к получению заниженных результатов. При увеличении соотношения рабочий реагент/сыворотка снижается чувствительность метода.

6. Нельзя разбавлять рабочий реагент в целях экономии, т.к. при этом условия реакции (концентрация буфера, активаторов и т.д.) отклонятся от оптимальных, что приведет к занижению результатов анализа как в случае определения активности ферментов, так и в случае определения аналитов ферментативными методами.

7. Если концентрация фермента или другого аналита в биологической жидкости превышает верхнюю границу линейности набора, исследуемую пробу необходимо разбавить строго в соответствии с рекомендациями, изложенными в инструкции к набору. Для получения точных и воспроизводимых результатов пробу вообще лучше не разбавлять, тем более что активность некоторых ферментов непропорционально уменьшается при разбавлении.

8. Исследование необходимо проводить в указанном в инструкции диапазоне длин волн, отклонение может существенно снизить чувствительность метода. В случае расчета концентрации аналита или активности фермента по коэффициенту экстинкции длина волны должна точно соответствовать указанной в инструкции.

9. Длина оптического пути кюветы для фотометрирования должна соответствовать указанной в инструкции.

10. При построении калибровочных графиков необходимо делать не менее 3-4 параллельных определений холостой пробы и стандарта. Строить калибровочный график необходимо как для каждой серии набора, так и при смене фотометра.

11. Калибровочную пробу необходимо ставить для каждой серии анализов в четырех параллелях.

12. Необходимо тщательно мыть лабораторную посуду и инструментарий. Особо тщательно надо отмывать перекись водорода, используемую для обеззараживания пробирок и наконечников, т.к. она является одним из продуктов сопряженных ферментативных реакций.

13. Необходимо контролировать качество дистиллированной воды, используемой в процессе анализа. Избыток некоторых ионов, входящих в ее состав, может ингибировать некоторые ферментативные реакции.

14. При работе с ферментативными наборами обязательно следует пользоваться проверенными автоматическими дозаторами. Наконечники к ним лучше повторно не использовать, особенно те, которыми проводили отбор сыворотки и затем обеззараживали перекисью водорода.

15. Для получения достоверных результатов крайне важен преаналитический этап лабораторного исследования. На

внелабораторной части этого этапа большое значение имеет процедура взятия крови у пациента, транспортировка в лабораторию, а также пробоподготовка и хранение пробы до анализа уже в лаборатории (внутрилабораторная часть). Так, длительный венозостаз приводит к гипоксии и увеличению проницаемости мембран клеток крови, что влияет на активность ряда ферментов. При длительном стоянии крови может развиваться гемолиз, приводящий к появлению активных радикалов кислорода и дефициту субстратов. Данный фактор может менять активность ЛДГ, АсАТ, АлАТ, а также КФ в сыворотке. Длительное хранение крови приводит к активации протеолиза, потери четвертичной структуры вследствие негативного влияния на SH-группы, что сказывается на активности ферментов.

16. Необходимо строго соблюдать условия хранения ферментативных наборов и их компонентов, указанные в инструкции. Хранение их при более высокой температуре может привести к быстрой инактивации ферментов. Многие ферменты можно хранить в замороженном состоянии и в виде лиофилизатов без потери активности, однако некоторые из них чувствительны к процедуре замораживания, их можно замораживать только после добавления стабилизаторов, сохраняющих их структуру. Это связано с тем, что вода при кристаллизации вызывает необратимые изменения в водородных связях белка. Не допускается при хранении несколько раз замораживать и размораживать пробы.

17. Необходимо регулярно проверять правильность и воспроизводимость результатов анализа по контрольным сывороткам, аттестованным соответствующими методами.

Способы выражения ферментативной активности

Каталитическая активность фермента – это способность фермента превращать большое количество молекул субстрата, в то время как сам он к концу реакции остается неизменным. Ее выражают в единицах активности.

Международная единица активности (МЕ) – это количество фермента, которое катализирует превращение 1 мкмоль субстрата в 1 мин. в оптимальных условиях. Единица

активности в системе СИ (*катал*) – соответствует количеству фермента, которое катализирует превращение 1 моля субстрата в 1 сек. в оптимальных условиях.

Удельная активность фермента – это активность, выраженная в единицах активности на 1 мг (или 1 г) белка или 1 мг (1 г) препарата фермента.

Клинические аспекты определения активности ферментов в биологических материалах

Альфа-амилаза

Высокая активность фермента обнаруживается в печени, скелетных мышцах, в микроворсинках энтероцитов, слезной жидкости, секрете молочных желез. Наиболее богаты амилазой поджелудочная и слюнные железы.

Плазма крови человека содержит альфа-амилазу двух типов: *панкреатическую (P-тип)*, вырабатываемую поджелудочной железой, и *слюнную (S-тип)*, продуцируемую слюнными железами. В физиологических условиях амилаза сыворотки крови состоит на 40% из панкреатической амилазы и на 60% – из слюнной.

Определение активности альфа-амилазы имеет большое значение в диагностике заболеваний поджелудочной железы. Повышение активности альфа-амилазы в сыворотке крови в 2 и более раз должно расцениваться как симптом поражения этого органа. При остром панкреатите активность амилазы крови и мочи увеличивается в 10-30 раз. Гиперамилаземия наступает в начале заболевания (уже через 4-6 ч), достигает максимума через 12-24 ч, затем быстро снижается и приходит к норме на 2-6-й день.

Патогенетически гиперамилаземия развивается в результате блокады отечной интерстициальной тканью выводных протоков поджелудочной железы, что характерно для жирового панкреонекроза. При геморрагическом панкреонекрозе отмечают резкое повышение активности альфа-амилазы в крови с последующим быстрым ее снижением, что отражает прогрессирование некроза в поджелудочной железе.

Острые панкреатиты могут протекать и без повышения активности амилазы (в частности при панкреонекрозе). Более точную информацию при этом получают при исследовании активности амилазы в суточном объеме мочи. Важное значение для распознавания рецидивирующей формы острого панкреатита имеет повторное повышение активности амилазы крови и мочи во время повторяющихся рецидивов болевого синдрома. Данный признак имеет исключительно большое значение для распознавания легких форм рецидивирующего острого панкреатита. Поэтому важно подчеркнуть необходимость повторных исследований активности альфа-амилазы мочи на протяжении первых двух суток заболевания.

При разных формах острого панкреатита динамика повышения альфа-амилазы в крови и моче носит определенный характер:

- ✓ для abortивного (отечного) панкреатита характерна кратковременная гиперاميлаземия на 1-3-и сутки заболевания;
- ✓ для жирового панкреонекроза характерна высокая и длительная гиперاميлаземия;
- ✓ геморрагический панкреонекроз характеризуется кратковременным повышением активности фермента на 3-и сутки заболевания.

Выявление гиперاميлаземии и гиперамилазурии является важным, но не специфическим диагностическим критерием острого панкреатита. Для повышения информативности полученных результатов исследования важно определить активность амилазы крови и мочи и сочетание результатов с параллельным определением концентрации креатинина в моче и сыворотке крови. Данный показатель называется **амилазо-креатининовый клиренс** и рассчитывается по формуле:

$$\text{АКИ} = \text{АМ} \cdot \text{КрС} \cdot 100 (\text{КрМ} \cdot \text{АС})$$

АМ – амилаза мочи;

АС – амилаза сыворотки;

КрМ – креатинин мочи;

КрС – креатинин сыворотки.

В норме амилазо-креатининовый индекс – *до 3*.

Повышение данного показателя является признаком панкреатита, т.к. при этом возрастает уровень истинно панкреатической амилазы, и ее клиренс осуществляется на 80% быстрее клиренса амилазы слюны. У здоровых людей амилаза сыворотки вначале фильтруется в почечных клубочках, а затем реабсорбируется канальцевым эпителием. При остром панкреатите механизм канальцевой реабсорбции подавляется вследствие избыточной экскреции Р- и S-амилазы.

Оценка результатов исследования активности амилазы в крови и моче затруднена тем, что фермент также содержится в слюнных железах, толстом кишечнике, скелетных мышцах, почках, легких, яичниках, маточных трубах, предстательной железе и др. В этой связи уровень амилазы может быть повышен при целом ряде заболеваний, имеющих сходную картину с острым панкреатитом: острым аппендиците, перитоните, язве желудка и двенадцатиперстной кишки, кишечной непроходимости, холецистите, тромбозе брыжеечных сосудов, феохромоцитоме, диабетическом ацидозе, после операций по поводу пороков сердца, после резекции печени, приеме больших доз этанола и др.

Методы определения активности

Ранние методы определения активности альфа-амилазы в биологических жидкостях были основаны на титровании йода и изменении оптической плотности в наибольшем разведении комплекса между йодом и крахмалом, расщепляемым альфа-амилазой. Некоторые методы основывались на продукции НАДФ пропорционально активности альфа-амилазы.

Большинство современных методов основано на продукции р-нитрофенола из насыщенного олигосахаридного субстрата с блокирующими группами, присоединенными к концам молекулы сахара. Позже в этих методах использовались различные расщепляющие ферменты для гидролиза образующихся коротких цепей олигосахаридов с образованием р-нитрофенола.

На сегодняшний день унифицированным методом определения активности альфа-амилазы является *метод Каравея*. Он основан на том, что под действием фермента крахмал

гидролизуются с образованием продуктов, не дающих цветной реакции с йодом. Интенсивность уменьшения окраски йод-крахмального комплекса в единицу времени пропорциональна активности фермента в биологическом материале.

Для определения изоферментов амилазы используется метод электрофореза. На электрофореграммах каждый из изоферментов выявляется в виде двух основных фракций. Изоферменты слюнных желез имеют более низкую изоэлектрическую точку (ИЭТ) и при электрофорезе мигрируют быстрее. Определение содержания каждого изофермента амилазы можно произвести с помощью иммунологических методов. При этом используют моноклональные антитела к изоферментам слюнных желез, которые избирательно ингибируют активность слюнной амилазы. Активность, измеренная после ингибирования, соответствует активности панкреатического изофермента. Вычитая из общей активности амилазы активность панкреатической амилазы, можно получить значение активности изофермента слюны.

Аминотрансферазы (АлАТ и АсАТ)

Аминотрансферазы катализируют процессы трансаминирования, они распределены по всем органам и тканям. Аспаратаминотрансфераза (АсАТ) в высоких концентрациях присутствует в клетках сердечной и скелетных мышц, печени, почках, поджелудочной железе и эритроцитах. Поражение любого из этих органов и тканей может привести к существенному повышению АсАТ в сыворотке крови. Наиболее резкие изменения активности АсАТ наблюдаются при поражении сердечной мышцы. Так, при инфаркте миокарда активность АсАТ в сыворотке крови может повышаться в 4-5 раз. Повышение активности АсАТ характерно также для печеночных патологий. Так, значительное повышение активности фермента имеет место при остром вирусном и токсических гепатитах. Умеренное повышение может иметь место при циррозе печени (в 2-3 раза), механической желтухе, метастазах опухоли в печень. Снижение активности АсАТ наблюдается при почечной недостаточности, беременности.

Аланинаминотрансфераза (АлАТ) в высоких концентрациях присутствует в клетках печени и в меньшей степени – в скелетных мышцах, почках и сердце. Повышение активности АлАТ наиболее часто отмечается при острых заболеваниях печени и желчных путей. Активность АлАТ резко повышается у пациентов с острыми вирусными гепатитами в ранние сроки болезни: приблизительно у 50% пациентов она увеличивается за 5 дней до появления желтухи и гепатомегалии, а у 90% – за 2 дня до появления этих симптомов.

Отношение АсАТ/АлАТ называется коэффициентом *де Ритиса*. В норме он составляет 1-1,3. При заболеваниях печени он снижается, а при поражениях сердца – растет. В дифференциально-диагностическом отношении также имеет значение то, что при алкогольных поражениях печени в противоположность вирусным характерно преимущественное повышение активности АсАТ и коэффициента де Ритиса более 2. Значение данного коэффициента выше нормы часто наблюдается при обтурационных желтухах, холециститах, циррозах.

Методы определения активности

В качестве унифицированного способа определения активности аминотрансфераз используется метод ***Райтмана-Френкеля***, в котором оксалоацетат, образованный при переаминировании L-аспартата и α -кетоглутаровой кислоты, в щелочной среде превращается в пируват, образующий в реакции с 2,4-ДНФГ гидразон пирувата, оптическую плотность которого измеряют при длине волны 540 нм.

Наиболее распространенный спектрофотометрический метод предложен ***Кармен***. В нем образовавшийся в результате переаминирования оксалоацетат восстанавливают в малат с одновременным окислением НАДН при действии малатдегидрогеназы и измеряют кинетику оптической плотности НАДН при длине волны 340 нм (оптический тест Варбурга). Специфические субстраты АсАТ – L-аспартат или L-глутамат. Специфический ингибитор АСТ – аналог аспартата (винилглицин).

Щелочная фосфатаза (ЩФ)

Фермент широко распространен в тканях человека, особенно в слизистой оболочке кишечника, остеобластах, стенках желчных протоков печени, плаценте и лактирующей молочной железе. Фермент расположен на клеточной мембране и принимает участие в транспорте фосфора.

В сыворотке крови определяют несколько изоферментов ЩФ:

1. Костная ЩФ. В костях ЩФ секретируется остеобластами. Предполагают, что она участвует в созревании матрикса и его минерализации. Значительное увеличение ее активности в сыворотке крови наблюдается при повышенной деятельности остеобластов: рост костей, возобновлении движений после длительного постельного режима, переломах, деформирующем остите, рахите.

2. Печеночная ЩФ. Представлена двумя изоферментами. Первый повышается в сыворотке крови при застое в печени и сниженной элиминации фермента с желчью, его повышение происходит также во второй половине беременности. Это основной фермент при патологии гепатобилиарного тракта. Вторым изоферментом повышается при гепатоцеллюлярной патологии – вирусные гепатиты, желтая дистрофия печени, циррозы. Повышение активности ЩФ наблюдается у 20% пациентов, страдающих первичным раком печени и при метастазах в печень.

3. Кишечная ЩФ. Синтезируется энтероцитами, поступает в просвет тонкого кишечника и частично всасывается в кровь. Вклад ее в общую активность ЩФ невелик. Ее активность может быть увеличена у лиц с I или III группой крови, особенно после приема пищи, при заболеваниях кишечника, сопровождающихся диареей.

4. Плацентарная ЩФ. Появляется в сыворотке крови при беременности. Самое большое ее содержание отмечается в третьем триместре. Низкая активность ЩФ у беременных говорит о недостаточности развития плаценты.

Методы определения активности

Одним из наиболее распространенных методов является *кинетический*, основанный на том, что щелочная фосфатаза определяется путем измерения скорости гидролиза эфира фосфорной кислоты – п-нитрофенилфосфата.

Разделить изоферменты ЩФ, пользуясь температурной инактивацией, не удастся. Однако для дифференциальной диагностики обтурационных желтух и желтух при биллиарном циррозе можно пользоваться избирательной тепловой денатурацией: определяют активность ЩФ в нативной сыворотке крови и в прогретой при 56°C в течение 15 мин. Затем вычисляют коэффициент, в числителе которого активность ЩФ в нативном материале, а в знаменателе – активность в прогретой сыворотке. У пациентов с биллиарным циррозом среднее значение этого коэффициента составляет 1,8, а с обтурационной желтухой – 3,8.

Хорошие результаты разделения изоферментов ЩФ получаются при электрофорезе на пленках из ацетата целлюлозы, но лучшим методом разделения следует считать электрофорез в геле. Наиболее подвижными при электрофорезе является печеночный изофермент, затем следуют костная, плацентарная и кишечная фракции ЩФ.

Кислая фосфатаза (КФ)

Кислая фосфатаза – фермент с широкой субстратной специфичностью, катализирующий расщепление сложноэфирных связей с образованием свободного ортофосфата, по спектру активности близкий к щелочной фосфатазе, от которой отличается иным действием на серосодержащие эфиры, оптимумом рН (4,7-6,0; у ЩФ – 8,4-9,4) и другими свойствами.

Под термином «кислая фосфатаза» подразумевают все фосфатазы, проявляющие оптимальную активность при рН <7,0. Это ферменты, которые находятся в клетках различных тканей в лизосомах и вне их. Самая высокая концентрация кислой фосфатазы отмечается в предстательной железе (простатический изофермент). Фермент присутствует в клетках печени, селезенки, эритроцитах, тромбоцитах, костном мозге. Высокая активность кислой фосфатазы отмечается также в макрофагах и остеокластах. Активность кислой фосфатазы сыворотки крови,

низкая в нормальных условиях, у мужчин примерно наполовину состоит из активности простатической фосфатазы, остальная активность связана с ферментом, происходящим из печени и разрушенных тромбоцитов и эритроцитов. У женщин кислая фосфатаза сыворотки происходит преимущественно из печени, эритроцитов и тромбоцитов.

Определение кислой фосфатазы в сыворотке обычно используют для выявления или мониторинга карциномы простаты у мужчин. Активность этого фермента в сыворотке увеличена у 60% пациентов с локализацией карциномы в простате, особенно при наличии костных метастазов – фермент продуцируется неопластическими клетками. Уровень активности кислой фосфатазы в последнем случае может возрасти до 40-50 раз от верхней границы референтных значений. Если карцинома остается локализованной в предстательной железе, активность кислой фосфатазы может быть лишь слабо увеличенной или находиться в пределах референтных значений, таким образом, нормальный уровень сывороточной активности кислой фосфатазы не исключает рака простаты. Временное увеличение активности кислой фосфатазы в сыворотке крови могут вызывать диагностические или лечебные манипуляции на предстательной железе (пальпация, биопсия и т.п.).

Доброкачественная гипертрофия простаты не сопровождается ростом активности фермента в сыворотке. Активность кислой фосфатазы сыворотки может повышаться также при гиперпаратиреозе, болезни Педжета, некоторых формах рака молочной железы и злокачественных метастазах в костную ткань этих опухолей. В последнем случае источником фермента предположительно являются остеокласты. Увеличенные концентрации кислой фосфатазы наблюдаются при миелоцитарной лейкемии и при некоторых других гематологических заболеваниях.

Тартрат-резистентная кислая фосфатаза (TRACP) – фермент, секретируемый исключительно остеокластами и попадающий в повышенном количестве в кровоток при увеличении количества и возрастании активности остеокластов. TRACP представлена двумя формами – 5a и 5b, из которых только форма 5b продуцируется остеокластами. Определение уровня тартрат-

резистентной кислой фосфатазы 5b может быть использовано в качестве маркера метастатического поражения скелета, так как данный процесс сопровождается увеличением интенсивности остеолиза и повышением в сыворотке крови активности TRACP в результате ее выхода в циркуляторное русло. Определение этого маркера у онкологических пациентов способствует повышению точности ранней диагностики метастазов в кости, оценки степени метастатического поражения скелета. Исследование данного показателя важно при мониторинге лечения остеопороза, болезни Педжета, онкологических заболеваний с метастазами в кости различными препаратами, подавляющими резорбцию костной ткани (бисфосфонатами, эстрогенами и другими).

Активность TRACP 5b в сыворотке крови не зависит от функционального состояния печени и почек и отражает интенсивность костной резорбции за последние сутки.

Методы определения активности

Определение активности кислой фосфатазы в сыворотке крови основано на гидролизе субстрата β -глицерофосфата ферментом, находящимся в исследуемом растворе, с последующей его инактивацией трихлоруксусной кислотой и количественном определении неорганического фосфата, освободившегося в ходе гидролиза.

Гамма-глутамилтранспептидаза (ГГТП)

Гамма-глутамилтранспептидаза катализирует перенос гамма-глутамилового остатка с гамма-глутамилового пептида на аминокислоту, другой пептид или иной субстрат. В организме фермент участвует в метаболизме глутатиона – пептида, состоящего из остатков глутаминовой кислоты, цистеина, глицина, который играет важную роль во многих обменных процессах.

Наиболее высокая активность ГГТП обнаружена в почках. Содержание ГГТП в сыворотке крови здорового человека обычно незначительно и связано с ее экскрецией из клеток печени, где активность фермента в 200-500 раз выше. Кроме того, ГГТП содержится в клетках поджелудочной железы.

Незначительная активность фермента регистрируется в кишечнике, головном мозге, сердце, селезенке, простате и

скелетных мышцах. Активность ГГТП в сыворотке крови повышается при любых патологиях печени и желчных путей, и, напротив, при нормальной активности фермента вероятность заболевания печени очень мала. Существенное увеличение активности ГГТП наблюдается при холестазах, и лишь незначительное – при повреждении паренхимы печени (некрозе гепатоцитов). Активность ГГТП возрастает на ранних сроках заболеваний и удерживается на повышенных уровнях длительное время.

Определение активности ГГТП используется для диагностики алкогольного поражения печени, а также для контроля лечения алкоголизма. Алкоголь усиливает продукцию ГГТП в печени и способствует ее выходу из клеточных мембран, что приводит к повышению активности фермента в сыворотке крови даже при отсутствии патологии печени.

Сравнительно новой областью применения данного теста является лабораторная диагностика заболеваний почек. Показано, что при пиелонефрите, гломерулонефрите, почечнокаменной болезни активность ГГТП в моче существенно возрастает. Определение активности фермента в моче позволяет диагностировать начальные стадии патологии почек, сопровождающиеся поражением проксимальных канальцев.

Методы определения активности

Определение активности ГГТП основано на измерении скорости ферментативной реакции переноса гамма-глутаминовой группы с субстрата-донора на субстрат-акцептор. В первых методах определения активности фермента был использован его природный субстрат глутатион. Однако эти методы достаточно трудоемки, поэтому в клинической биохимии широкого распространения не получили.

Современные лабораторные методы определения активности ГГТП основаны на применении *синтетических хромогенных субстратов-доноров*. Активность фермента при этом определяется по скорости расщепления хромогенного субстрата с образованием р-нитроанилина, интенсивность окраски которого при длине волны 405 нм пропорциональна активности фермента в анализируемой пробе. Широкое

применение данного метода на практике и в научных исследованиях позволило установить нормальные значения активности ГГТП в сыворотке крови пациентов разного возраста и пола, а также величин, соответствующих различным патологическим состояниям, на которые ориентируются и в настоящее время.

Международная федерация клинической химии (IFCC) рекомендует в качестве референтного метода определения активности ГГТП *колориметрический кинетический метод*. Однако для рутинного анализа в лабораториях чаще применяют *модифицированный метод Зейца*. Результаты определения активности ГГТП, получаемые при этом, ниже (приблизительно на 7%), чем по методу IFCC, однако они полностью совпадают со значениями активности фермента, определенными с применением гамма-глутамил-р-нитроанилида в качестве субстрата.

Креатинкиназа (КК)

Креатинкиназа катализирует обратимую реакцию фосфорилирования креатинина с участием АТФ в результате чего образуются креатинфосфат и АДФ. КК является димером состоящим из двух субъединиц: В (от brain – мозговая) и М (от muscle – мышечная).

Фермент существует в виде трех изоформ:

1. КК-ВВ (КК-1) – мозговая;
2. КК-МВ (КК-2) – сердечная;
3. КК-ММ (КК-3) – мышечная.

КК-ВВ присутствует в значительных количествах в головном мозге, простате, желудке, легких, мочевом пузыре, уретре, плаценте, щитовидной железе.

КК-МВ в основном находится в сердечной мышце (25-46% от общей активности КК кардиомиоцита) и в небольшом количестве в скелетных мышцах (менее 5% общей активности).

КК-ММ присутствует в основном в клетках скелетных мышц. Активность КК-ММ в сыворотке составляет 94-96% от общей активности КК, КК-МВ – 4-6%, КК-ВВ – следы или активность не определяются.

Общая КК повышается при многих заболеваниях и состояниях: травмы, операции, инфаркт миокарда, уменьшение кровоснабжения мышц, миопатии, дерматомиозит, мышечные дистрофии, миокардиты, отравления, сопровождающиеся комой, гипотериоз, инфекционные заболевания.

Активность КК (КК-МВ) является достоверным маркером инфаркта миокарда, начиная с 6-12 ч после начала болевого приступа. Максимальный уровень ее достигается в течение 24 ч, и даже при обширном инфаркте активность КК может возвратиться к норме в течение последующих трех суток. Относительное повышение активности КК при инфаркте миокарда выше, чем других ферментов. Наиболее информативно исследование активности КК в динамике – каждые 4-6 ч в течение суток.

КК-ММ увеличивается в сыворотке при тех же состояниях, что и общая КК.

КК-ВВ в сыворотке крови незначительно повышается при некоторых формах рака (легкого, кишечника, мочевого пузыря, предстательной железы), травмах сердечной мышцы, заболеваниях соединительной ткани. При родах КК-ВВ может увеличиваться в сыворотке до 6 раз (источником являются матка и плацента). У новорожденных активность КК-ВВ увеличивается при родовой травме мозга.

Методы определения активности

Унифицированным методом определения активности креатинфосфокиназы в крови является *метод с использованием креатина в качестве субстрата*. Активность фермента пропорциональна количеству неорганического фосфора, образующегося в результате кислотного гидролиза продукта креатинкиназной реакции – креатинфосфата. Неорганический фосфор определяется по цветной реакции с молибдатом аммония.

Другим способом определения активности креатинкиназы является *метод с использованием креатинфосфата в качестве субстрата*. Активность фермента пропорциональна количеству креатина, образующегося в результате ферментативной реакции. Креатин определяется по цветной реакции с α -нафтолом.

Существует три общепризнанных методических подхода для разделения *изоферментов КК*: электрофорез, хроматографические и иммунологические методы.

Электрофоретическим методом (на агаре, агарозе или ацетатцеллюлозе) можно разделить все фракции КК. Визуализация электрофоретических полос изоферментов проводится, как правило, с использованием НАДФН флуоресценции в ультрафиолетовой области спектра (360 нм). Поэтому эта процедура достаточно трудоемкая.

При ионообменной или абсорбционной хроматографии изоферменты КК, как правило, абсорбируются на геле, с которого затем элюируются буферами. Выпускаются специальные миниколонки: метод простой и быстрый, основная трудность – разделение фракций при большом повышении количества КК-ММ в патологических случаях.

Иммунологические методы основаны на измерении активности КК в присутствии специфической антисыворотки, содержащей моноклональные или поликлональные антитела против М или В субъединиц. Наборы, основанные на технике преципитации, позволяют выявлять КК-МВ при существенном ее повышении. Выпускаются наборы для фотометрического определения КК-МВ, основанные на определении активности КК при ингибировании М-субъединицы.

Лактатдегидрогеназа (ЛДГ)

Лактатдегидрогеназа катализирует обратимое восстановление пирувата до лактата. ЛДГ состоит из двух субъединиц – М (muscle – мышечная) и Н (heart – сердечная). В сыворотке крови присутствуют 5 изоферментов, различающихся составом субъединиц. В порядке снижения их электрофоретической подвижности их обозначают как ЛДГ-1 (H_4), ЛДГ-2 (H_3M_1), ЛДГ-3 (H_2M_2), ЛДГ-4 (H_1M_3), ЛДГ-5 (M_4).

ЛДГ присутствует практически во всех клетках организма и является цитозольным ферментом. В печени, сердце, почках, скелетной мускулатуре и эритроцитах активность ЛДГ более чем в 500 раз выше, чем в сыворотке. Повышение активности фермента имеет место при некрозе тканей, особенно при остром

повреждении миокарда, эритроцитов, почек, скелетных мышц, печени, легких.

Нормальное соотношение изоферментов ЛДГ в сыворотке составляет: ЛДГ-1 – 15-30%; ЛДГ-2 – 22-50%; ЛДГ-3 – 15-30%; ЛДГ-4 – 0-15%; ЛДГ-5 – 0-15%. При диагностике инфаркта миокарда увеличение активности ЛДГ является достоверным тестом в сроки от 12 до 32 ч после болевого приступа. Она остается повышенной в течение 8-10 суток. У части пациентов наблюдается корреляция между уровнем ЛДГ и обширностью инфаркта миокарда.

В ряде случаев дополнительную информацию дает коэффициент ЛДГ1/ЛДГ2, который в норме составляет до 0,75. При остром инфаркте миокарда он становится выше 1,0 и возвращается к норме через 2-3 недели. Повышение ЛДГ-1 (гидроксibuтиратдегидрогеназы) отмечается также при опухолях репродуктивных органов (тератома, семинома яичка).

ЛДГ-2, ЛДГ-3 и ЛДГ-4 обладают промежуточными свойствами. Активность этих изоферментов повышается при массивном разрушении тромбоцитов (эмболия легочной артерии, массивные гемотрансфузии) и вовлечении лимфатической системы в патологический процесс. При нелимфоцитарных лейкозах увеличивается активность ЛДГ-3 и ЛДГ-4. Увеличение ЛДГ-3 иногда наблюдается при острых панкреатитах.

Активность ЛДГ-4 возрастает при поражении печени вирусного, токсического или травматического характера и обострении хронических гепатитов, в активную фазу ревматизма, при кардиосклерозе с нарушением гемодинамики, острым нефрите.

Наибольшее содержание ЛДГ-5 характерно для скелетных мышц, печени, кожи, слизистых оболочек, а также клеток некоторых злокачественных опухолей. Значительное увеличение содержания ЛДГ-5 отмечается при травмах, воспалительных и дегенеративных заболеваниях мышц и многих болезнях печени (гепатиты, циррозы и др.). Онкологические заболевания (например лимфолейкозы) также сопровождаются увеличением активности ЛДГ-5.

Методы определения активности

Лактатдегидрогеназа катализирует обратимое превращение лактата в пируват при одновременном восстановлении НАД в НАДН, который далее восстанавливает в присутствии N-метилфеназонийметилсульфата йоднитротетразолиевый фиолетовый в красный формазан (340 нм):



Одновременно с определением общей каталитической активности лактатдегидрогеназы можно определять и долю фермента, устойчивого к действию мочевины, что характерно главным образом для сердечного изофермента.

Альдолаза

Альдолаза – фермент, относящийся к лиазам, катализирующий превращение фруктозо-1,6-дифосфата в дигидроксиацетонфосфат и глицеральдегид-3-фосфат в процессе гликолиза. Фермент играет важнейшую роль в энергетическом обмене. Альдолаза присутствует практически во всех тканях организма. Генетически обусловленная неполноценность альдолазы является причиной наследственной непереносимости фруктозы.

Активность альдолазы в крови служит дополнительным диагностическим признаком ряда заболеваний. В тканях злокачественных опухолей фермент в несколько раз активнее, чем в нормальных, в эритроцитах активность фермента почти в 100 раз выше, чем в сыворотке крови, гемолиз существенно искажает результаты анализа. При ряде заболеваний (прогрессирующая мышечная дистрофия, инфаркт миокарда, активный ревматизм, рак, поражения печени и др.) активность альдолазы в крови повышается, причем степень повышения коррелирует с тяжестью заболевания.

Методы определения активности

В качестве унифицированного метода определения альдолазы принят способ, основанный на том, что продукты расщепления фруктозо-1,6-фосфата альдолазой при реакции с 2,4-динитрофенилгидразином образуют гидразоны, окрашенные в

щелочной среде. Интенсивность окраски при этом пропорциональна активности фермента.

Липаза

Липаза – фермент, катализирующий расщепление глицеридов на глицерин и жирные кислоты. Этот энзим в организме человека вырабатывается рядом органов и тканей, что позволяет различать липазу желудочного происхождения, поджелудочной железы, легких, кишечного сока, лейкоцитов и др.

Наиболее важной, с клинической точки зрения, является липаза поджелудочной железы. Она играет главную роль в переваривании жиров. Поскольку основным источником липазы является поджелудочная железа, при ее заболеваниях происходит значительный выброс фермента в циркулирующую кровь. Определение активности липазы в крови – информативный критерий диагностики острого панкреатита.

Одновременное определение уровня альфа-амилазы и липазы является основой диагностики острого панкреатита. Повышение обоих или одного из ферментов выявляется у 96% пациентов с острым панкреатитом. В отличие от альфа-амилазы, активность липазы не повышается при паротите, внематочной беременности и раке легких.

Отечная форма острого панкреатита, как правило, не сопровождается повышением активности липазы. Жировой панкреонекроз характеризуется выраженным повышением активности липазы, сохраняемым до 2 недель, а геморрагический – лишь кратковременным повышением активности липазы в 3-4 раза по сравнению с нормальным уровнем на 3-5 сутки заболевания.

Активность липазы в крови повышается при инфаркте кишечника, перитоните, желчной колике, разрушении жировой ткани, ранении мягких тканей, после операций, при раке молочной железы.

Методы определения активности

Методы определения активности липазы, применяемые в клинике, основаны либо на нефелометрической регистрации убыли субстрата в ходе реакции, либо на количественном опре-

делении образующихся продуктов гидролиза (спирта или неэтерифицированных жирных кислот).

Нефелометрические методы, основанные на измерении просветления жировой эмульсии под действием фермента, удобны и просты, однако недостаточны точны. Поэтому они пригодны только для быстрого получения качественных и сравнительных данных. К этим методам относится *способ Боргстрема*, предложенный для быстрого определения активности панкреатической липазы в дуоденальном содержимом. Он основан на фотометрическом измерении снижения оптической плотности (мутности) эмульсии триолеина под действием содержимого тонкого кишечника.

Большинство методов определения активности липазы основано на *титриметрическом определении количества жирных кислот*, образовавшихся в результате гидролиза субстрата. Одним из наиболее оптимальных методов является способ микротитрования, включающий экстрагирование жирных кислот из реакционной смеси органическими растворителями при кислом значении pH.

Холинэстераза (ХЭ)

В тканях человека обнаружены два разных фермента этого типа:

1. *Ацетилхолинэстераза* («истинная» холинэстераза), которая преимущественно находится в нервной ткани, скелетных мышцах и в эритроцитах.

2. *Сывороточная, или псевдохолинэстераза*, которая присутствует в печени, поджелудочной железе, секретируется печенью в кровь. Она является ферментом, катализирующим реакцию гидролиза ацетилхолина.

Определение активности ХЭ в сыворотке представляет наибольший клинический интерес для диагностики отравлений фосфорорганическими отравляющими веществами и инсектицидами, а также как показатель состояния белково-синтезирующей функции печени и для обнаружения атипичных вариантов фермента. Отравления фосфорорганическими веществами и инсектицидами сопровождаются выраженным снижением активности холинэсте-

разы. Активность ХЭ резко снижается при тяжелых хронических заболеваниях печени, особенно при циррозе.

При инфаркте миокарда резкое падение активности холинэстеразы наблюдается к концу первых суток заболевания и обусловлено шоком, приводящим к тяжелому повреждению печени.

При нефротическом синдроме активность холинэстеразы повышается. Это связано с усилением синтеза альбуминов печенью из-за быстрой потери мелкодисперсной фракции белков с мочой. Повышение активности холинэстеразы наблюдается также при ожирении и экссудативной энтеропатии. Активность фермента незначительно возрастает при артериальной гипертензии, сахарном диабете, столбняке, маниакально-депрессивном психозе, депрессивных неврозах, тревоге.

Показания к исследованию активности ХЭ:

- ✓ диагностика отравления фосфорорганическими инсектицидами;
- ✓ оценка функций печени при печеночной патологии (диагностика и мониторинг);
- ✓ выявление атипичных форм фермента для оценки риска осложнений при хирургических вмешательствах с применением миорелаксантов.

Увеличение активности фермента наблюдается при гиперлипотеинемии IV типа (классификация Фредрексона), нефротической и смешанной формах гломерулонефрита (потеря белка с мочой), ожирении (в том числе при сахарном диабете), психозе, раке молочной железы.

Снижение активности происходит при печеночных патологиях: цирроз, гепатит, метастатический рак печени, застойная печень при сердечной недостаточности, а также при острой или хронической интоксикациях фосфорорганическими инсектицидами (хлорофос, дихлофос), инфаркте миокарда, легочной эмболии, онкологических заболеваниях (раковая кахексия), на поздних сроках беременности и при синдроме мальабсорбции.

Методы определения активности

В настоящее время наиболее распространенными являются *колориметрические методы*, для которых характерны простота постановки анализа, высокая скорость и чувствительность.

Энзиматический метод предусматривает использование субстрата – бензоилхолина и ферментной системы ХЭ-ХО-ПО (холинэстераза-холиноксидаза-пероксидаза) с хромогенным комплексом фенол – 4-аминоантипирин. Данный метод включает три стадии:

1. Холинэстераза катализирует гидролиз бензоилхолина до холина и бензойной кислоты.

2. Холин окисляется кислородом воздуха в присутствии холиноксидазы с образованием перекиси водорода.

3. При разрушении перекиси водорода под влиянием пероксидазы происходит конденсация фенола и 4-аминоантипирина в окрашенное соединение, которое определяется фотометрически при длине волны 500 нм.

В клинической лабораторной диагностике широкое распространение получили *неферментные колориметрические методы* определения активности ХЭ, которые в качестве субстратов используют тиохолиновые эфиры карбоновых кислот – ацетилтиохолин, бутирилтиохолин, пропионилтиохолин, бензоилтиохолин и другие, а также их производные. Под действием ХЭ тиохолиновые эфиры гидролизуются до тиохолина и соответствующей карбоновой кислоты. Тиохолин взаимодействует с хромогеном, образуя окрашенное соединение. В качестве хромогена используются реактив Элмана – 5,5-дитио-бис-(2-нитро-бензойная кислота) (ДТНБ) или гексацианоферрат калия (красная кровяная соль). Наиболее распространенными субстратами являются ацетилтиохолин (АсТХ) и особенно бутирил-тиохолин (БуТХ), более специфичный для фермента (сродство ХЭ к БуТХ в 2 раза больше, чем к АсТХ) и менее подверженный самораспаду под действием щелочных рН и повышенной температуры.

Эластаза

Эластаза-1 (панкреатическая) является протеолитическим ферментом, синтезируется в ацинарных клетках поджелудочной железы и экскретируется в просвет двенадцатиперстной кишки вместе с другими ферментами в виде предшественника – проэластазы, которая активируется трипсином.

Эластаза специфична для поджелудочной железы. В сыворотке крови содержатся высокоактивные ингибиторы эластазы:

альфа-1-антитрипсин и альфа-2-макроглобулин. Они регулируют активность фермента в соответствии с физиологическими потребностями. В крови здоровых людей активность панкреатической эластазы 1 почти не определяется или очень низкая. Сывороточная эластаза вследствие воспалительных процессов поджелудочной железы попадает в общий кровоток через поврежденные клеточные мембраны. Подобно другим панкреатическим ферментам (амилаза, липаза) активность эластазы увеличивается в крови в острый период панкреатита. Она начинает возрастать уже через 6 ч от начала заболевания, а через 48 ч достигает максимума.

Панкреатическая эластаза-1 не разрушается при прохождении по кишечнику. Ее определение в кале – тест для оценки экзокринной функции поджелудочной железы. Скрининг эндокринной панкреатической недостаточности показан, когда подозревают наличие хронического панкреатита или кистозного фиброза, а также при длительном мониторинге уже выявленной недостаточности поджелудочной железы при хроническом панкреатите. Ориентируясь на уровень эластазы-1 в кале, можно более точно назначать ферментные препараты и делать прогноз заболевания. На результаты определения панкреатической эластазы-1 в кале не влияет проведение заместительной терапии препаратами ферментов поджелудочной железы. Уровень эластазы-1 в кале определяется *иммуноферментным методом с использованием моноклональных антител*. Определение эластазы-1 в кале показано во всех случаях, когда имеется подозрение на экзокринную недостаточность поджелудочной железы и обсуждается вопрос о применении препаратов панкреатических ферментов, так как использование этого метода позволяет избежать их необоснованного назначения. Снижение активности панкреатической эластазы-1 в кале выявляют у пациентов с хроническим панкреатитом, раком поджелудочной железы, сахарным диабетом, а также у детей с муковисцидозом.

Методы определения активности

Для определения активности эластазы в сыворотке крови в настоящее время используются различные иммунохимические методы.

ЛАБОРАТОРНАЯ ОЦЕНКА УГЛЕВОДНОГО ОБМЕНА

Одним из наиболее распространенных показателей, используемых для оценки углеводного обмена, является уровень глюкозы.

Референтные значения глюкозы (ВОЗ)

- ✓ Цельная кровь – **3,3-5,5 ммоль/л.**
- ✓ Плазма (сыворотка) – **4,0-6,1 ммоль/л.**
- ✓ Ликвор – **60% от уровня плазмы.**
- ✓ Моча – **не определяется распространенными методами (0,06-0,08 ммоль/л).**

Чаще всего содержание глюкозы с диагностической целью определяют в крови. Факторами, которые оказывают влияние на уровень гликемии, являются:

1. Вид крови, используемый для исследования (цельная или плазма, капиллярная или венозная). В капиллярной крови уровень гликемии на 10-15% выше, чем в венозной.

2. При определении уровня глюкозы в цельной крови необходимо учитывать величину гематокрита (Ht). При Ht менее 35% уровень гликемии будет несколько завышен, а при Ht более 55% – занижен.

3. У лиц старше 60 лет каждые десять лет уровень глюкозы в крови растет на 0,56 ммоль/л.

4. Прием лекарственных препаратов (гормональных) оказывает влияние как на метаболизм глюкозы в организме, так и на ее уровень в крови.

Методы определения глюкозы в биологических жидкостях

Используемые в настоящее время методы определения глюкозы в крови и моче представляют собой достаточно простые аналитические процедуры. Эти методы подробно изучены и оценены с точки зрения надежности, чувствительности и воспроизводимости. В настоящее время в клинико-диагностических лабо-

раториях практически повсеместно используют ферментативные методы.

Ферментативные методы

1. Гексокиназный метод

Глюкоза под действием гексокиназы (ГК) при участии АТФ превращается в глюкозо-6-фосфат (Г-6-Ф), из которого под действием глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназы (Г-6-ФДГ) образуется 6-фосфоглюконо-d-лактон. Количество НАДФН₂, образовавшегося в ходе данной реакции, пропорционально количеству глюкозы в среде инкубации и может быть определено по изменению поглощения. При использовании дрожжевой Г-6-ФДГ коферментом служит НАДФ. НАД в качестве кофермента применяют при использовании бактериальной Г-6-ФДГ.

Данный метод рассматривается в качестве референтного.

2. Глюкозооксидазный метод

Фермент глюкозооксидаза катализирует окисление глюкозы до глюконовой кислоты и образование перекиси водорода. Пероксидаза в присутствии перекиси водорода окисляет хромогенный краситель типа о-дианизидина, что приводит к образованию окрашенного продукта, интенсивность окраски которого пропорциональна содержанию глюкозы.

Реакция протекает в два этапа:

1. На первом происходит окисление глюкозы до глюконовой кислоты при участии глюкозооксидазы. Глюкозооксидаза высокоспецифична по отношению к β -D-глюкозе. В водных растворах глюкоза находится в λ -форме (36%) и β -форме (64%). Ее окисление при участии глюкозооксидазы требует превращения λ - в β -форму, которое ускоряется под влиянием фермента мутаротазы. Некоторые образцы глюкозооксидазы содержат фермент мутаротазу, обеспечивающий превращение этих форм. В противном случае требуется увеличение времени инкубации, что способствует самопроизвольному переходу λ -формы в β -форму.

2. Второй этап, включающий пероксидазную реакцию, является менее специфичным по сравнению с глюкозооксидазной реакцией.

Глюкозооксидазный метод пригоден для определения глюкозы в спинномозговой жидкости. В моче содержатся высокие

концентрации веществ, способных вмешиваться в пероксидазную реакцию, в частности мочева кислота, что способствует получению ложноотрицательных результатов. В связи с этим глюкозо-оксидазный метод следует с осторожностью использовать для определения глюкозы в моче. Данная процедура адаптирована ко всем автоанализаторам, включая и те, в которых используют технологию «сухой химии».

Нарушения углеводного обмена

Основными нарушениями углеводного обмена являются гипогликемия (табл. 5-6) и гипергликемия.

Основными причинами гипогликемий являются:

1. Нарушения переваривания и всасывания углеводов:

✓ отсутствие выработки или сниженная активность ферментов переваривания дисахаридов в тонком кишечнике – сахаразы, мальтазы, лактазы;

✓ болезни поджелудочной железы с нарушением экскреторной функции (снижение выработки амилазы, нарушение переваривания сложных углеводов, недостаточное всасывание моносахаридов);

✓ тяжелый лямблиоз, приводящий к нарушению переваривания и всасывания углеводов;

✓ болезни кишечника (энтероколиты, тяжелые поносы любой этиологии).

2. Болезни эндокринной системы

✓ гиперинсулинизм (аденома, инсулинома, рак поджелудочной железы);

✓ уменьшение выработки контраинсулярных гормонов.

3. Болезни печени и почек:

✓ дистрофия, цирроз, действие гепатотропных ядов, нарушение синтеза гликогена;

✓ почечный диабет (глюкозурия при патологии почечных канальцев).

4. Наследственные нарушения метаболизма моносахаридов (фруктоземия, галактоземия):

✓ врожденное отсутствие фермента фруктокиназы приводит к блоку метаболических превращений фруктозы;

✓ врожденная нехватка галактозо-1-фосфатуридилтрансферазы – ключевого фермента превращения галактозы в глюкозу и ее метаболиты – сопровождается гипогликемией и возрастанием концентрации в крови и тканях галактозо-1-фосфата.

5. Нарушения обмена гликогена – гликогенозы (болезни накопления):

✓ нарушение ферментативного распада гликогена печени и мышц из-за врожденного дефицита или отсутствия ферментов гликогенолиза: при болезни Гирке – глюкозо-6-фосфатазы, болезни Помпе – гамма-амилазы, болезни Кори – лимитдекстриназы, болезни Мак-Ардля – мышечной фосфорилазы.

Таблица 5. – Виды гипогликемий

Реактивная гипогликемия	<ul style="list-style-type: none"> • Вызванная приемом лекарств: инсулин, пр-ты сульфонилмочевины • После приема пищи: алиментарная, идиопатическая • Вызванная алкоголем • При наследственных нарушениях обмена веществ
Гипогликемия голодания	<ul style="list-style-type: none"> • При заболеваниях печени, почек • При эндокринной патологии • При гиперинсулизме (инсулинома)

Таблица 6. – Диагностика гипогликемий

Клинические признаки	<ul style="list-style-type: none"> • Острые: усталость, чувство голода, головокружение, затуманенное зрение и др. • Хронические (нейрогипогликемия): изменения личности, потеря памяти, психозы
Лабораторные данные (определение гликемии)	<p>Симптомы нейрогипогликемии появляются:</p> <ul style="list-style-type: none"> • У взросл. – <2,2 ммоль/л • У новорожд. – <1,5 ммоль/л
Введение глюкозы	Купирование симптомов

Гипергликемии

Сахарный диабет

Сахарный диабет (СД) – это группа метаболических (обменных) заболеваний, характеризующихся гипергликемией, которая является результатом дефектов секреции инсулина, действия инсулина или обоих этих факторов (ВОЗ, 1999).

Классификация СД (ВОЗ):

Сахарный диабет типа 1. Деструкция β -клеток поджелудочной железы, обычно приводящая к абсолютной инсулиновой недостаточности.

Сахарный диабет типа 2. С преимущественной инсулинрезистентностью и относительной инсулиновой недостаточностью или с преимущественным дефектом секреции инсулина с инсулинрезистентностью или без нее.

Другие типы СД. Генетические дефекты функции β -клеток. Болезни экзокринной части pancreas. Эндокринопатии. Диабет, индуцированный лекарствами. Инфекции.

Гестационный СД. Возникает во время беременности.

Таблица 7. – Различия СД I и II типа

Признаки	СД I типа	СД II типа
Возраст начала	До 30 лет	После 40 лет
Инсулиновая недостаточность	Абсолютная	Относительная
Масса тела	Дефицит	Избыток
Начало болезни	Острое	Постепенное
Кетоацидоз	Выражен	Не характерен
Течение	Лабильное	Стабильное

Лабораторные критерии постановки диагноза СД:

Гипергликемия натощак:

Цельная кровь – $\geq 6,1$ ммоль/л

Плазма (сыворотка) – $\geq 7,0$ ммоль/л

Через два часа после нагрузки глюкозой (ПГТТ):

Цельная венозная кровь – $\geq 10,0$ ммоль/л

Цельная капиллярная кровь – $\geq 11,1$ ммоль/л

Плазма (сыворотка) – $\geq 11,1$ ммоль/л

Пероральный глюкозотолерантный тест (ПГТТ)

Проводится в случае сомнительных значений гликемии для уточнения диагноза. При этом гликемия определяется перед и через 2 ч после пероральной нагрузки глюкозой.

Методика выполнения ПГТТ:

Нагрузка глюкозой соответствует:

- для взрослых – 75 г глюкозы, растворенной в 300 мл воды, выпить за 3-5 минут;
- для детей – 1,75 г глюкозы на кг массы тела (но не более 75 г), выпить за 3-5 минут.

Нарушенная толерантность к глюкозе (ВОЗ)

Через два часа после нагрузки глюкозой (ПГТТ):

- Цельная венозная кровь – $6,7-10,0$ ммоль/л;
- Цельная капилл. кровь – $7,8-11,1$ ммоль/л;
- Плазма (сыворотка) – $7,8-11,1$ ммоль/л.

Нарушенная гликемия натощак (ВОЗ)

- Цельная венозная кровь – $5,6-6,1$ ммоль/л;
- Цельная капилл. кровь – $5,6-6,1$ ммоль/л;
- Плазма (сыворотка) – $6,1-7,0$ ммоль/л.

Понятия и определения, используемые при оценке гликемии

- **Гликемия натощак** – уровень глюкозы крови утром перед завтраком после предварительного голодания в течение минимум 8 ч.

- **Постпрандиальная гликемия** – уровень глюкозы крови через 2 ч после приема пищи.
- **Гликемический профиль** – исследование уровня глюкозы в течение суток через 3-4 ч.
- **Случайно выявленная гипергликемия** – гипергликемия, выявленная в любое время дня вне зависимости от приема пищи.

Таблица 8. – Мониторинг СД

Показатель	Частота обследования	
	СД I типа	СД II типа
Самоконтроль гликемии	При декомпенсации – ежедневно	
HbA1c	1 раз в 3 месяца	
Микроальбуминурия (МАУ)	1 раз в год ч/з 5 лет от начала заболевания	Ежегодно, 2 раза в год
ОАК, ОАМ, БАК	1 раз в год	
Контроль АД, ЭКГ	При каждом посещении врача	
Осмотр стоп	При каждом посещении врача	
Консультации офтальмолога, нефролога, невропатолога, кардиолога	1 раз в год ч/з 5 лет от начала заболевания	

Гликированный гемоглобин

Гликированный гемоглобин (HbA1) – это соединение гемоглобина с глюкозой, которое образуется в результате неферментативной химической реакции гемоглобина А, содержащегося в эритроцитах, с глюкозой крови. Скорость и объем этой реакции зависят от среднего уровня глюкозы крови на протяжении жизни эритроцита.

Гликированный гемоглобин отражает гликемию, имевшую место на протяжении периода жизни эритроцитов (до 120 суток). Эритроциты, циркулирующие в крови, имеют разный возраст, поэтому для усредненной характеристики уровня глюкозы ориентируются на полупериод жизни эритроцитов – 60 суток. Таким

образом, по содержанию гликированного гемоглобина можно судить о том, какой была концентрация глюкозы в предшествующие исследованию 4-8 недель. В связи с этим пациентам с сахарным диабетом рекомендуется проводить исследование уровня гликированного гемоглобина раз в квартал для контроля терапии диабета и через 4-6 недель после изменения тактики лечения.

Существует несколько форм гликированных гемоглобинов: HbA1a, HbA1b, HbA1c. Последняя форма количественно преобладает и дает более тесную корреляцию со степенью выраженности гипергликемии. Целевые уровни гликированного гемоглобина (HbA1c) – уровни, при которых риск осложнений СД существенно снижается.

Таблица 9. – Критерии компенсации СД

Критерии компенсации нарушений углеводного обмена и целевые значения HbA1c при сахарном диабете [12]			
Целевые значения гликированного гемоглобина при сахарном диабете 1 типа			
Показатель	Норма (нет диабета)	Эффективная терапия	Неэффективная терапия
Hb A1c, %	<6,1	6,1–7,5	>7,5
Критерии компенсации нарушений углеводного обмена при сахарном диабете 1 типа			
Показатель	Компенсация	Субкомпенсация	Декомпенсация
HbA1c, %	<7,0	7,1–7,5	>7,5
Целевые значения гликированного гемоглобина при сахарном диабете 2 типа			
Показатель	Низкий риск ангиопатий	Риск макроангиопатий	Риск микроангиопатий
Hb A1c, %	≤6,5	>6,5	>7,5
Критерии компенсации нарушений углеводного обмена при сахарном диабете 2 типа			
Показатель	Компенсация	Субкомпенсация	Декомпенсация
Hb A1c, %	<7,0	7,1–7,5	>7,5

В настоящее время существует несколько методов определения гликированного гемоглобина. В табл. 10 представлены наиболее часто встречаемые на практике анализаторы и методики для определения HbA1c.

Таблица 10. – Методы определения гликированного гемоглобина

Основные лабораторные методы определения гликированного гемоглобина			
Используемый метод	Анализатор (диагностический набор)	Назначение	Особенности
Ионообменная хроматография высокого давления (ВЭЖХ)	Анализаторы D10 (Bio-Rad) Variant II (Bio-Rad)	Централизованные лаборатории (лаборатории областных и городских больниц, диагностические центры, центры диабета)	Достоинства: сертифицированный метод, полностью автоматический, высокая воспроизводимость, результаты не требуют подтверждения. Недостатки: необходимость использования специализированного оборудования
Аффинная хроматография	Анализаторы In2it (Bio-Rad) NycoCard (Axis-Shield)	Кабинет врача	Достоинства: сертифицированный метод, возможность выполнения единичных исследований в кабинете врача. Недостатки: высокая стоимость расходных материалов, не прямое определение фракции HbA1c
Иммунотурбидиметрия	Диагностические наборы для автоматических биохимических анализаторов (Bayer, Beckman Coulter, Olympus, Roche и т.д.)	Биохимическая лаборатория со средним и низким потоком анализов	Достоинства: сертифицированный метод, возможность выполнения анализа на биохимическом анализаторе, установленном в лаборатории. Недостатки: необходимость ручной пробоподготовки. Клинически значимая интерференция в присутствии гемоглобинов F (>10%), C и S [14]
Ионообменная хроматография низкого давления	Анализаторы DiaStat (Bio-Rad) DS5 (Drew)	Биохимическая лаборатория с низким потоком анализов	Достоинства: хорошая корреляция с методом ВЭЖХ. Недостатки: необходимость пробоподготовки, низкая производительность, интерференция в присутствии HbF
Аффинная хроматография с использованием микроколонок	Диагностический набор «Диабет-тест» Фосфосорб	Биохимическая лаборатория с низким потоком анализов	Достоинства: относительно низкая стоимость теста. Недостатки: не отвечает требованиям NGSP, высокие трудозатраты

Референтные значения HbA1c – 4,0-6,5% от общего Hb.

Фруктозамин

Фруктозамин (ФА) представляет собой гликозилированный белок, отражающий уровень глюкозы в крови на протяжении предшествующих 2-3 недель до исследования. В сыворотке крови представлен главным образом гликированным альбумином (60-70%), образующимся в результате неферментативного присоединения глюкозы к альбумину.

Уровень фруктозамина крови ретроспективно отражает степень постоянного или транзиторного повышения уровня глюкозы за 2-3 недели, предшествующие исследованию, соответственно периоду его полувыведения из крови (в отличие от 1-3 мес. в случае исследования гликированного гемоглобина). Определение фруктозамина проводят при необходимости промежуточного контроля гипергликемии за период менее 2 месяцев, а также в случаях, когда тестирование гликированного гемоглобина может

давать ложные результаты (кровотечение, гемолиз, железодефицитная анемия). При декомпенсации сахарного диабета уровень фруктозамина превышает 370 мкмоль/л.

Определение концентрации ФА в сыворотке крови основано на его способности разлагать хлорид нитросинего тетразолия (NBT). Изменение окраски прямо пропорционально концентрации фруктозамина.

Референтные значения ФА – <285 мкмоль/л.

Осложнения СД

Ранние:

1. Диабетический кетоацидоз.
2. Комы: кетоацидотическая, лактаcidотическая, гиперосмолярная некетонная, гипогликемическая.

Поздние:

1. Микроангиопатии: нейропатия, нефропатия, ретинопатия.
2. Макроангиопатии: ИБС, цереброваскулярные заболевания, периферические ангиопатии.

Ранние осложнения СД

Диабетический кетоацидоз

Основная причина – *абсолютная инсулиновая недостаточность*.

Таблица 11. – Диагностика диабетического кетоацидоза

Клинические данные	Клинические признаки СД + запах ацетона в выдыхаемом воздухе
Общий анализ мочи	Глюкозурия Кетонурия
Биохимический анализ крови	Гипергликемия Гиперкетонемия
КОС	Метаболический ацидоз с увеличенным АП

Таблица 12. – Контроль лечения диабетического кетоацидоза

Гликемия	1 раз в час до снижения до 14 ммоль/л, затем 1 раз в 3 часа
Анализ мочи на ацетон	1 раз в сутки
Общий анализ крови и мочи	Исходно
Биохимический анализ крови	Исходно
КОС	1-2 раза в сутки
Диурез	Почасовой контроль

Гиперосмолярная некетонная кома

Основная причина – относительная инсулиновая недостаточность + резкая дегидратация

Таблица 13. – Диагностика гиперосмолярной некетонной комы

Клинические данные	Признаки СД
Биохимический анализ крови	Гипергликемия (>50 ммоль/л) Отсутствие кетонемии и ацидоза Гипернатриемия
Осмоляльность плазмы	Повышена
Общий анализ мочи	Глюкозурия

Поздние осложнения СД

Диабетическая нефропатия

Диабетическая нефропатия (ДН) – специфическое поражение сосудов почек при сахарном диабете, сопровождающееся формированием узелкового или диффузного гломерулосклероза, терминальная стадия которого характеризуется развитием хронической почечной недостаточности (ХПН).

Стадии:

- Микроальбуминурии.
- Протеинурии (>0,5 г/сут).
- ХПН.

Некоторые углеводсодержащие компоненты крови

Сиаловые кислоты

Сиаловые кислоты представляют собой N-ацетил- и

N-глицилпроизводные нейраминовой кислоты. Эти соединения рассматриваются как нормальные компоненты всех тканей и биологических жидкостей организма человека и животных и являются важной составной частью углевод-белковых (гликопротеинов) и углеводлипидных (гликолипидов) комплексов, в которых занимают обычно краевое положение. После отщепления от гликопротеидов свободные сиаловые кислоты инактивируют многие бактериальные и вирусные болезнетворные агенты. Поэтому увеличение содержания в крови сиалогликопротеинов может быть проявлением компенсаторной, защитной воспалительной реакции. В свободном виде производные нейраминовой кислоты присутствуют в крови, слизистой оболочке желудка, щитовидной железе и др.

Для определения концентрации сиаловых кислот в сыворотке крови обычно используется колориметрический метод Гесса. При этом безбелковый фильтрат сыворотки крови подвергают гидролизу, в результате чего из состава сиалогликопротеидов выделяются сиаловые кислоты, которые взаимодействуя с уксусной и серной кислотами в условиях повышенной температуры, создаваемой в кипящей водяной бане, дают окрашенные соединения, изменяющие цвет раствора в буровато-розовый или красно-фиолетовый. При этом интенсивность окрашивания зависит от концентрации сиаловых кислот.

Серомукоиды

Серомукоиды входят в состав соединительной ткани организма. В случаях повреждения, разрушения её серомукоиды попадают в плазму крови. Самые разнообразные воспалительные процессы (пневмонии, плеврит, острый ревматизм, туберкулез, диабет, инфаркт миокарда, гломерулонефрит, подагра) приводят к увеличению гексоз, связанных с серомукоидом сыворотки.

Наибольшее диагностическое значение имеет определение серомукоидов для выявления вялотекущих воспалительных процессов, повышение этого показателя свидетельствует об актива-

ции процесса, даже если клинические симптомы еще не проявились. Чаще всего серомукоиды исследуют ревматологи.

Серомукоиды (серогликоиды; гексозы, связанные с серомукоидом) относятся к группе сывороточных гликопротеинов (сложных белков, в составе которых имеется углеводный компонент). Серомукоиды обладают выраженными кислыми свойствами, растворимы в хлорной, трихлоруксусной и сульфосалициловой кислотах. Эта фракция, составляя 1% всех белков сыворотки, включает 12% всех углеводов плазмы.

Повышение концентрации:

- ✓ воспалительные и некробиотические процессы: желтушный синдром, злокачественные образования, обострение хронического холецистита, деструктивная форма туберкулеза легких, ревматизм, инфаркт миокарда, инсульт (мозговой).

Снижение уровня:

- ✓ нарушение протеосинтетической функции печени: инфекционный гепатит, гепатоцеллюлярная дистрофия, гепатоцеребральная дистрофия, цирроз, в том числе алкогольный; эндокринные патологии;

- ✓ бесплодие;

- ✓ рассеянный склероз.

МЕТОДЫ ОЦЕНКИ ЛИПИДНОГО ОБМЕНА

Липиды плазмы крови

Основными липидами плазмы крови являются свободные жирные кислоты (ЖК), триглицериды (ТГ), фосфолипиды и холестерол (ХС). Большая часть жирных кислот образуется в печени из углеводных предшественников.

Свободные жирные кислоты (СЖК)

Свободные жирные кислоты циркулируют в крови в соединении с альбумином. Они поступают в кровь из пищи или из жировой ткани, где содержатся в виде ТГ и мобилизуются с помощью липопротеинлипазы. Окисление свободных жирных кислот – важный источник энергии, в частности в сердечной мышце. Скорость их обмена очень высока – каждую минуту утилизируется около 20-40% количества ЖК в плазме крови. Они играют важную роль в липидном обмене, этерифицируя ХС и глицерин.

Выделяют насыщенные (пальмитиновая, стеариновая), мононенасыщенные (олеиновая) и полиненасыщенные жирные кислоты (линолевая, арахидоновая, эйкозапентаеновая, докозагексаеновая). Насыщенность зависит от числа двойных связей в составе ЖК. Незаменимые ЖК не синтезируются в организме человека и должны поступать в составе пищевых продуктов. Насыщенные ЖК преобладают в жирах животного происхождения, мононенасыщенные и полиненасыщенные ЖК – в растительных маслах и рыбьем жире.

Холестерол

Холестерол (холестерин, ХС) относится к группе стероидов, так как содержит в своем составе циклические структуры. ХС находится в организме в виде свободного стерина и в виде его эфиров. Эфиры ХС представлены соединением ХС с одной из жирных кислот.

Функции ХС обусловлены тем, что он, наряду с фосфолипидами, входит в состав клеточных мембран, регулируя их проницаемость и активность мембранных ферментов, а также является предшественником некоторых биологически активных веществ (стероидных гормонов, витамина D и желчных кислот). ХС час-

точно поступает с пищей в составе ХМ (20-30%), но в основном синтезируется *de novo* (70-80%) в организме человека (рис. 12). Способностью синтезировать ХС обладает большинство клеток, но основной процесс осуществляется в печени, где формируются и основные метаболиты ХС – желчные кислоты. ХС, поступивший в просвет тонкого кишечника в составе желчных кислот, подвергается обратному всасыванию и снова поступает в печень (внутрипеченочный путь обмена ХС).

Свободный ХС метаболически активен, в то время как эфиры ХС являются его формой, которая транспортируется и депонируется. Этерифицированный ХС преобладает в составе коры надпочечников, в плазме крови, в атеросклеротических бляшках. В составе клеточных мембран ХС находится в свободном состоянии.

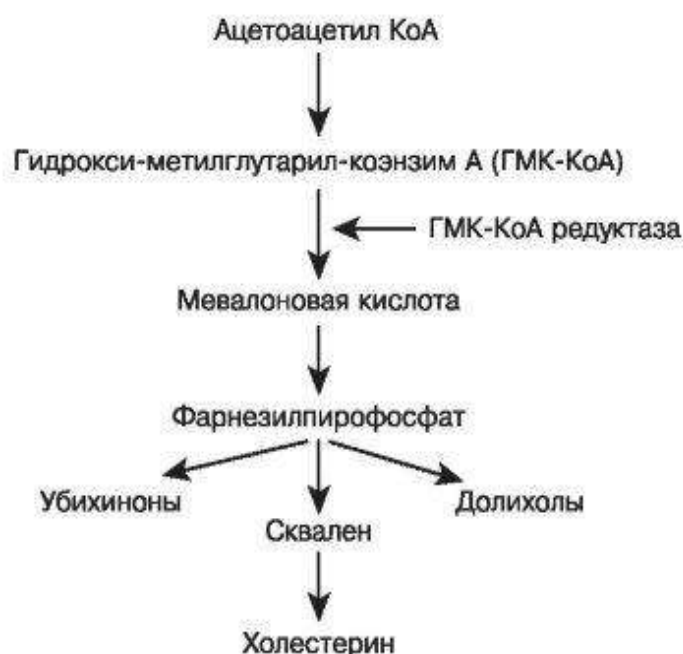


Рисунок 12. – Схема синтеза холестерина

Триглицериды

Триглицериды (ТГ) или триацилглицерины (ТАГ) – это комплексы эфиров ЖК и глицерина, который является многоатомным спиртом. Экзогенные ТГ ресинтезируются в клетках тонкой кишки из моноглицеридов и поступают в кровь в виде хиломикронов (ХМ). Эндогенные ТГ синтезируются главным обра-

зом в печени из свободных жирных кислот, откуда транспортируются кровью преимущественно в составе ЛПОНП.

После приема жирной пищи концентрация ТГ в крови быстро повышается, но в норме уже через 12 ч возвращается к исходному уровню. У пациентов с сахарным диабетом, метаболическим синдромом, а также с ожирением концентрация ТГ длительное время не возвращается к норме. Это состояние обозначается термином «постпрандиальная дислипидемия».

Фосфолипиды

Фосфолипиды – это сложные липиды, состоящие из глицерина, жирных кислот, фосфорной кислоты и азотсодержащих соединений. Синтезируются практически во всех тканях, больше всего в печени. Как и ХС, являются составляющими клеточных мембран, в плазме крови играют важную роль в обеспечении растворимости липопротеиновых частиц.

Липопротеиды крови (ЛП)

В плазме крови ХС и ТГ находятся в соединении с белками, образуя липопротеиды (рис. 13).

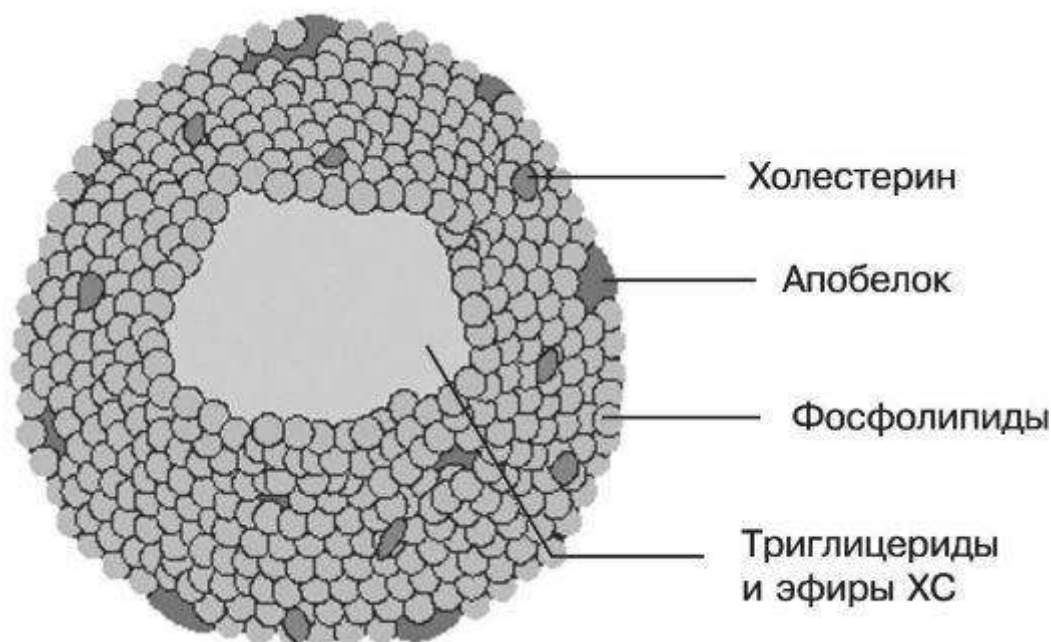


Рисунок 13. – Схема липопротеида

ЛП обеспечивают их транспорт и представляют собой сферические частицы разного размера, состоящие из свободного и этерифицированного ХС, ТГ, фосфолипидов и белков, количество которых варьирует. Внутри находится гидрофобное ядро из плотно расположенных молекул ТГ и эфиров ХС. Снаружи ядро покрыто слоем из фосфолипидов, обеспечивающих стабилизацию липопротеиновой частицы в растворенном состоянии, а также небольшим количеством свободного ХС и белков – апопротеинов или апо-белков. Апо-белки выполняют структурную и транспортную функции. Благодаря высокоспецифическому взаимодействию между апо-белками липопротеинов и белками-рецепторами на клеточной мембране осуществляется рецепторопосредованное связывание липопротеинов с клетками. Полярные части молекул апо-белков, фосфолипидов и свободного ХС создают внешний, гидрофильный слой липопротеиновых частиц, в то время как эфиры ХС и ТГ составляют их гидрофобное ядро.

Основными липопротеинами, в зависимости от их плотности, размеров и состава липидов (табл. 14), а также апо-белков, являются ХМ, ЛПОНП, ЛППП, ЛПНП, ЛПВП.

Таблица 14. – Характеристика основных классов ЛП

Признак	ХМ	ЛПОНП	ЛППП	ЛПНП	ЛПВП
Физические свойства:					
плотность, г/мл	0,95	1,006	1,006-1,019	1,019-1,063	1,063-1,210
средний диаметр, нм	100-1000	43	27	22	9,5-6,5
электрофоретическая подвижность	Не двигаются	Пре-в	в	*	а
Состав, %					
ТГ	90	65	28	10	2
ХС	5	13	38	43	18
Фосфолипиды	4	12	20	22	30
Белок	1	10	14	25	50
Основные липиды ядра	ТГ липи	Эндогенные ТГ	Эфиры ХС, ТГ	Эфиры ХС	эфиры ХС
Основные апопротеины	AI, AII, B, CI, CII, CIII	B, CI, CII, CIII, E	B, CIII, E	B	AI, AII

Хиломикроны (ХМ)

Экзогенные липиды – ТГ и ХС – попадают внутрь эпителиальных клеток кишечника, где они всасываются, инкорпорируясь в большие липопротеиновые частицы – ХМ, наибольшие по размерам и наиболее легкие липопротеиновые частицы. Их плотность составляет 0,95 г/мл. ХМ синтезируются в эпителиальных клетках тонкого кишечника из липидов экзогенного (пищевого) происхождения; через систему лимфатических сосудов ХМ поступают в грудной лимфатический проток и оттуда в кровь, где подвергаются липолизу под действием липопротеинлипазы плазмы крови.

В состав ХМ входят ТГ, в меньшем количестве эфиры ХС, фосфолипиды и апо-белки. В результате липолиза ХМ теряют значительную часть ТГ и превращаются в ремнанты (остатки) ХМ. Основными белками ремнант ХМ являются следующие апо-белки: апо-В-48, апо-Е и апо-С. Благодаря апо-Е, ремнанты связываются с рецепторами печени. Изолированную гиперхиломикронемия выявляют редко, последняя обычно свидетельствует о наследственном дефекте липопротеинлипазы.

Гиперхиломикронемия не является биохимическим маркером атеросклероза, но сопутствующая ей гипертриглицеридемия может спровоцировать развитие острого панкреатита. Основной функцией ХМ является транспорт пищевых ТГ, из которых они состоят почти на 90%, и ХС через лимфу в плазму крови. Попадая в капилляры жировой ткани и мышц, ХМ взаимодействуют с липопротеинлипазой, которая связана с гликозаминогликанами на внешней поверхности эндотелия капилляров. В результате гидролиза ХМ освобождаются свободные жирные кислоты и моноглицериды, которые поступают в адипоциты и мышечные клетки, где метаболизируют, а ХМ превращаются в ремнанты, относительно бедные ТГ и богатые эфирами ХС. Ремнанты захватываются рецепторами печени, которые распознают апо-Е и поступают внутрь гепатоцита.

Таким образом, в результате транспорта ХМ пищевые ТГ доставляются в жировую ткань, а ХС – в печень. В физиологических условиях ХМ присутствуют в крови только после приема пищи, содержащей жиры.

Липопротеиды очень низкой плотности (ЛПОНП)

Основные структурно-функциональные белки ЛПОНП – апо-В-100, апо-Е и апо-С-I, С-II, С-III. ЛПОНП – в основном состоят из эндогенных ТГ и в меньшей степени из эфиров ХС, поэтому их повышенное содержание в плазме крови проявляется гипертриглицеридемией и часто диагностируется у пациентов с инсулиннезависимым сахарным диабетом, гипотиреозом, а также с ожирением. Гипертриглицеридемия в сочетании с низким уровнем ЛПВП является фактором риска развития атеросклероза.

В капиллярах жировой и мышечной ткани под влиянием липопроотеинлипазы происходит гидролиз ТГ с отделением жирных кислот, которые поступают в ткани и используются для ресинтеза ТГ. В результате этого богатые ТГ ЛПОНП аналогично ХМ превращаются в богатые этерифицированные ХС их ремнанты – ЛППП.

Липопротеиды промежуточной плотности (ЛППП)

Основные транспортные и функциональные белки ЛППП – апо-В-100 и апо-Е. Благодаря этим белкам ЛППП связываются с соответствующими рецепторами печени. Плотность ЛППП составляет 1,006-1,019 г/мл. Повышенная концентрация в крови ЛППП определяется при гиперхолестеролемии и гипертриглицеридемии. Довольно редко в клинической практике отмечают изолированное повышение ЛППП, что связано с наследственным дефектом печеночной липопроотеинлипазы и сопровождается прогрессирующим атеросклерозом. В норме ЛППП частично катаболизуются в печени путем рецептор-опосредованного эндоцитоза с распознаванием апо-Е и апо-В, частично с помощью печеночной липазы превращаются в ЛПНП в результате изъятия из них большей части ТГ с увеличением относительного содержания эфиров ХС. При этом теряется большая часть апопротеинов.

Липопротеиды низкой плотности (ЛПНП)

Ядро ЛПНП состоит преимущественно из эфиров ХС, оболочка содержит апо-В-100 и апо-Е. Поскольку в этих липопротеидах содержится порядка 70% ХС плазмы крови, их основной функцией является транспорт ХС внепеченочным клеткам организма.

Повышенное содержание в плазме крови ЛПНП четко связано с развитием атеросклероза коронарных и периферических сосудов. Однако для того, чтобы ЛПНП стали атерогенными, они должны модифицироваться. Причиной модификации чаще всего служит процесс перекисного окисления ЛПНП. Окисленные ЛПНП изменяют свои свойства в двух направлениях: сначала повышается их взаимодействие с рецепторами печени, затем они становятся активными раздражителями для моноцитов. Активированные моноциты крови проникают в субэндотелиальное пространство сосудов, превращаясь в макрофаги, которые фагоцитируют модифицированные ЛПНП и превращаются в «пенистые» клетки. Активированные макрофаги и пенистые клетки освобождают биологически активные вещества: факторы роста, противовоспалительные цитокины, молекулы адгезии. В результате в большей степени усиливаются процессы проницаемости эндотелия и роста атеросклеротической бляшки, что в конечном итоге ведет к сужению просвета сосуда и разрыву бляшки с образованием внутрисосудистого тромба.

Катаболизм ЛПНП осуществляется тремя путями (поглощением):

1. Внепеченочными паренхиматозными клетками (основной путь).
2. Системой фагоцитирующих клеток (клетками-скэвэнджерами или «мусорщиками»).
3. Печенью.

В лизосомах периферических клеток из ЛПНП освобождается свободный ХС, который по механизму обратной связи регулирует синтез ХС внутри клетки путем ингибирования фермента ГМГ-КоА-редуктазы.

В патологических условиях атерогенные липопротеиды, богатые ХС (ЛПНП, ЛППП, ЛПОНП), инициируют механизмы формирования атеросклеротической бляшки в артериальной стенке.

Липопротеиды высокой плотности (ЛПВП)

ЛПВП считаются антиатерогенным фактором. Низкие концентрации ХС ЛПВП могут быть связаны не только с ранним

развитием атеросклероза, но также с ухудшением прогноза для лиц, имеющих сердечно-сосудистые заболевания (ССЗ). Низкие концентрации ЛПВП метаболически связаны с высокими концентрациями ЛППП и ЛПОНП. Участие ХС ЛПВП в транспорте ХС от других органов к печени или «обратный транспорт ХС» – основной механизм, благодаря которому ХС ЛПВП может защитить стенку артерии. Существуют также многочисленные механизмы, объясняющие его прямой защитный эффект: стимуляция простаглицлина, блокада синтеза фактора активации тромбоцитов в эндотелиальных клетках, стимуляция антиоксидантной активности, ингибирование адгезии моноцитов к эндотелиальным клеткам на ранних стадиях атеросклеротического процесса и др.

Комбинацию умеренно повышенного уровня ТГ и низких концентраций ХС ЛПВП обычно отмечают у пациентов с ранним манифестированием атеросклеротического поражения. Выделяют так называемую «атерогенную дислипидемию», или «атерогенную триаду», которая включает повышение суммарной концентрации ХС ЛППП и ХС ЛПОНП, наличие маленьких плотных частиц ХС ЛПНП и низкую концентрацию ХС ЛПВП. Комбинация высокого уровня ТГ и низкого уровня ХС ЛПВП характерна не только для пациентов с сахарным диабетом II типа, но также и для пациентов с абдоминальным ожирением и ассоциируется с высоким риском сердечно-сосудистой патологии.

Излишек свободного ХС, который накопился в периферических клетках, ЛПВП удаляют путем связывания апо-А со специфическими рецепторами. «Нагруженные» ХС ЛПВП частично транспортируют его назад из тканей в печень, где он катаболизируется с образованием желчных кислот, частично передают ХС ЛПОНП, в результате чего последние превращаются в ЛППП, а потом в ЛПНП.

Выделяют два подкласса ЛПВП: ЛПВП-2 и ЛПВП-3. ЛПВП-3 имеют дисковидную форму, и именно они начинают активный захват ХС из периферических клеток и макрофагов, превращая в ЛПВП-2 сферические частицы, богатые эфирами ХС и фосфолипидами. Апо-белки – апо-А1 и апо-А2 – представляют собой основные белки ЛПВП, с помощью которых последние связываются с рецепторами печени и клетками сосудистой стенки. Уровень ХС ЛПВП в плазме крови находится в обратной за-

висимости от развития атеросклероза: чем ниже содержание ХС ЛПВП, тем выше вероятность развития атеросклероза.

Апопротеины (апо-белки)

В настоящее время выделяют 5 классов апопротеинов – А, В, С, D и Е, их основные функции представлены в табл. 15.

Апопротеин А (апо-А) – главный компонент белковой части ЛПВП. Низкие концентрации его субчастицы апо-А1, подобно низким концентрациям ХС ЛПВП, связаны с ухудшением прогноза ССЗ.

Апопротеин В (апо-В) – главный компонент белка ЛПНП, ЛППП, ЛПОНП и ХМ. Однако ХМ обычно не присутствуют в плазме крови натошак, и почти весь апо-В находится в атерогенных липопротеинах. Концентрация апо-В может служить маркером атерогенности липопротеинов плазмы крови, особенно у пациентов с гипертриглицеридемией и у людей с нормальными концентрациями ХС ЛПНП, так как отмечено, что уровни апо-В >150 мг/дл тесно связаны с повышенным сердечно-сосудистым риском.

Таблица 15. – Функции апопротеинов

Функции основных апопротеинов	
■ А-I	Кофактор ЛХАТ, Структурная (в ЛПВП)
■ А-II	Активатор липазы печени, структурная в (ЛПВП)
■ В-100	Структурная (ЛПНП и ЛПОНП), связывание с рецепторами клеток
■ В-48	Структурная (в ХМ)
■ С-I	Кофактор ЛХАТ
■ С-II	Активатор липопротеидлипазы
■ С-III	Ингибитор липопротеидлипазы
■ Е	Связывание с рецепторами

Апо-Е – один из ключевых регуляторов уровня липидов плазмы. Активность апо-Е-рецепторов печени, в частности, определяет степень катаболизма богатых ТГ частиц или ремнантов

ЛПОНП и ЛППП. Большое клиническое значение в липидном обмене играют разные изоформы апо-Е. Изоформа апо-Е3 считается «нормальной». Наоборот, гомозиготность по аллели апо-Е2/апо-Е2 является причиной развития редкого типа гиперлипидемии – III типа.

К основным ферментам обмена ЛП относятся:

- ✓ *липопротеидлипаза (ЛПЛ)*: гидролизует ТГ ХМ и ЛПОНП;
- ✓ *печеночная триглицеридлипаза (П-ТГЛ)*: катализирует гидролиз ТГ в ЛППП, в результате чего образуются ЛПНП;
- ✓ *лецитин-холестерил-ацилтрансфераза (ЛХАТ)*: катализирует эстерификацию ХС путем переноса к его гидроксильной группе жирно-кислотного ацила лецитина.

Липопротеид (а)

Описано участие в процессах атерогенеза липопротеида (а), который по физико-химическим свойствам похож на ЛПНП, но в дополнение имеет Апо-а и в свою очередь имеет структурное сродство с молекулой плазминогена.

Липопротеид (а) имеет атерогенные и тромбогенные свойства, увеличение его уровня в плазме крови >30 мг/дл тесно коррелирует с развитием и прогрессированием атеросклероза коронарных и каротидных артерий.

Липопротеид (а) – это атерогенная липопротеидная частица с плотностью 1,051-1,082 г/мл, со средним диаметром около 26 нм, похожа на ЛПНП. Основным различием между ними служит наличие в составе липопротеида (а) молекулы уникального апо-белка – Апо-а, ковалентно связанного с молекулой Апо-В-100. Показано, что первичная структура активных участков Апо-а имеет 98% гомологии с молекулой плазминогена. Это структурное сходство обеспечивает участие липопротеида (а) в процессах атеротромбогенеза путем прикрепления тромба на участках сосудистой стенки, богатых липопротеином (а). Концентрация липопротеида (а) в крови человека прямо зависит от степени атеросклеротических поражений коронарных, каротидных и периферических артерий. В настоящее время липопротеид (а) рассматривают как независимый биохимический маркер атеросклероза.

Нарушения липидного обмена (гиперлипидемии)

К нарушениям липидного обмена относят *первичные и вторичные гиперлипидемии (дислипидемии)*.

Первичные нарушения обмена липидов в организме представляют собой врожденные состояния, их классификация и краткая характеристика приведена в табл. 16.

Таблица 16. – Первичные дислипидемии

Первичные дислипидемии.

	Фактор риска	Холестерин плазмы	Триглицериды плазмы	Фенотип липо-протеинемического спектра	Проявления
Общая ("гомогенная") гиперлипидемия	ИБС	↑	норма	IIa	Корнеальные дуги, ксантелазма
Семейная комбинированная гиперлипидемия	ИБС	↑ или норма	↑ или норма	IIa, IIb или IV	Корнеальные дуги, ксантелазма
Семейная гиперхолестеринемия	ИБС	↑↑↑	↑ или норма	IIa или IIb	Корнеальные дуги, ксантелазма
Ремнантная гиперлипидемия	ИБС	↑↑↑	↑↑	III	узловатые ксантомы, сухожильные ксантомы
Синдром хиломикронемии	панкреатит	↑↑↑	↑↑↑	I или IV	Эруптивные ксантомы гепатоспленомегалия,
Семейная гипертриглицеридемия	ИБС	↑↑	↑↑	IV или V	Эруптивные ксантомы гепатоспленомегалия,

Вторичные гиперлипидемии – приобретенные состояния, причинами которых могут выступать:

- ✓ заболевания печени (цирроз, холестаз) и алкогольное поражение печени;
- ✓ панкреатит;
- ✓ заболевания почек (уремия, нефротический синдром);
- ✓ сахарный диабет (I и II типы);
- ✓ гипо- и гипертиреоз.

Нарушения обмена липопротеидов

Одним из видов нарушений обмена ЛП относятся *гиперлиппротеинемии (ГЛП)*, представляющие собой состояния, сопровождающиеся нарушением образования, транспорта или утилизации одного или нескольких классов ЛП, при этом наблюдается увеличение сывороточной концентрации холестерина и ТГ.

В настоящее время используется классификация ГЛП по Фридриксону, рекомендованная ВОЗ, в основе которой лежит электрофоретическое разделение ЛП-фракций сыворотки крови (рис. 14).

ГЛП I типа. Гиперхиломикронемия.

ГЛП II а типа. Гипер-бета-липопротеинемия.

Семейная гиперхолестеринемия.

ГЛП II в типа.

Гипер-бета и гипер-пре-бета-липопротеинемия.

ГЛП III типа. Дис-бета-липопротеинемия. Болезнь широкой полосы.

ГЛП IV типа.

Гипер-пре-бета-липопротеинемия.

ГЛП V типа. Гиперхиломикронемия и гипер-пре-бета-липопротеинемия

Рисунок 14. – Классификация гиперлиппротеинемий по Фридриксону (ВОЗ)

Определение типа ГЛП имеет важное клиническое значение, используется при проведении целенаправленной терапии нарушений обмена липидов и ЛП.

Кроме того, выделяют такое состояние, как *дислиппротеинемия*, представляющее собой изменения в обмене ЛП, сопровождающиеся увеличением, снижением либо полным отсутствием одного или двух классов ЛП. К ним относятся:

- ✓ абетабета-липопротеинемия;
- ✓ гипобета-липопротеинемия;
- ✓ анальфа-липопротеинемия;

- ✓ семейная наследственная недостаточность ЛХАТ;
- ✓ гиперальфалипотеинемия.

Связь нарушений обмена липидов и ЛП с риском развития ССЗ

Атерогенность липопротеидов зависит не только от их концентрации в крови, но и от их размеров. Наименьшими из липопротеидов являются ЛПВП, они легко могут проникать в стенку артерий и покидать ее, не вызывая развития атеросклероза (антиатерогенные ЛП).

ЛПНП, ЛППП и малые ЛПОНП (атерогенные) также имеют небольшие размеры, что позволяет им проникнуть в стенку артерии, но при этом, будучи модифицированными в результате окисления, могут там задерживаться и постепенно инициировать атеросклеротический процесс. Наибольшие липопротеиды – ХМ и большие ЛПОНП не являются собственно атерогенными, однако высокие концентрации этих больших богатых ТГ липопротеидов могут вызвать заболевания поджелудочной железы.

Установлено, что большинство ХС в плазме крови обычно находится в виде ХС ЛПНП. Выявлена положительная связь между уровнем общего ХС, а также ХС ЛПНП и риском развития ССЗ. Это относится как к пациентам без кардиальной патологии, так и к пациентам с установленной коронарной болезнью. В то же время общий сердечно-сосудистый риск, согласно рекомендациям Европейского общества кардиологов, зависит не только от уровня ХС, но и от целого ряда других факторов риска:

- ✓ возраста;
- ✓ пола;
- ✓ курения;
- ✓ АГ.

Гипертриглицеридемия, низкий уровень ХС ЛПВП и сахарный диабет значительно ухудшают эффекты ХС ЛПНП даже при умеренно повышенных их концентрациях. Вместе с тем коронарную болезнь сердца выявляют довольно редко в популяциях с уровнем общего ХС <3-4 ммоль/л, даже в присутствии других

факторов риска. Напротив, коронарная болезнь сердца неминуема у пациентов, которым не проводилась терапия, с тяжелыми формами семейной гиперхолестеролемии даже при отсутствии других факторов риска, что подтверждает ведущую роль дислипидемий в атерогенезе.

ЛПНП представляют собой неоднородные частицы. Наиболее атерогенны маленькие, плотные ЛПНП. Они появляются в крови при концентрации ТГ $>1,4$ ммоль/л и связаны с ранним развитием коронарной болезни у лиц молодого возраста. Атерогенность ХС ЛПНП подтверждена результатами многочисленных эпидемиологических и клинических исследований. Снижение ХС ЛПНП должно быть основной задачей как первичной, так и вторичной профилактики ССЗ.

У большинства пациентов с умеренной гиперлипидемией (дислипидемией) внешние признаки нарушений липидного обмена отсутствуют. Появление внешних признаков нарушения липидного обмена в виде ксантелазм на веках, липоидной дуги роговицы, сухожильных ксантом на участках кожи кистей рук, локтевых и коленных суставов, ахилловых сухожилий чаще отмечают у пациентов с семейной гиперхолестеролемией или другими наследственными нарушениями липидного обмена.



Ксантома век



Ксантома голеней

При обследовании пациента важно выявить сопутствующие, нелипидные факторы развития ССЗ. Сочетание нескольких факторов риска существенно увеличивает опасность развития сердечно-сосудистых осложнений у пациентов с дислипидемиями. При этом выделяют модифицируемые и немодифицируемые факторы риска. К первым относят курение, АГ, избыточную массу

тела, низкую физическую активность. Немодифицируемыми факторами риска являются возраст, пол, отягощенная наследственность, то есть развитие клинических проявлений ИБС среди ближайших родственников у мужчин <55 лет, у женщин <65 лет.

Важным аспектом диагностики нарушений липидного обмена в плане их участия в формировании признаков сердечно-сосудистой патологии является выполнение лабораторных исследований, позволяющих выделить группы риска. Существующие методы определения липопротеидов учитывают главным образом те или другие физико-химические характеристики, позволяющие идентифицировать отдельные их классы, имеющие определенный состав и специфические пути метаболизма. При прямом их определении в лабораторной практике применяют две методики. Одна из них основана на особенностях, выявляющихся при проведении электрофореза. Другая методика учитывает характер разделения липопротеидов при ультрацентрифугировании.

Прогностически значимый ХС ЛПНП может быть рассчитан по формуле *Friedewald*:

$$\text{ХС ЛПНП} = \text{общий ХС} - \text{ХС ЛПВП} - (0,45 \times \text{уровень ТГ})$$

Необходимо также учитывать, что дислипидемия может быть вторичной по отношению к другим состояниям, и по очевидным причинам они должны быть устранены перед началом исследования и терапии. Они включают злоупотребление алкоголем, диабет, гипотиреоз, болезни печени и почек и прием некоторых лекарственных средств. Пациенты, у которых предполагается генетическое заболевание типа семейной гиперхолестеринемии, должны консультироваться специалистами, включая проведение молекулярно-генетического исследования.

Пациенты с установленными ССЗ являются группой высокого риска развития сердечно-сосудистых осложнений. Им необходимы мероприятия по модификации образа жизни, при наличии показаний – назначение медикаментозной терапии. В группах с бессимптомным течением, то есть у относительно «здоровых» пациентов, профилактические мероприятия необходимо проводить согласно уровню общего риска развития ССЗ.

Предложены разные модели для подсчета риска ССЗ у пациентов с бессимптомным течением заболеваний. Эти модели используют мультифакториальный анализ разных комбинаций факторов риска в популяциях для определения дальнейшего прогноза.

В частности, предлагается использовать модель определения общего риска, основанного на *системе SCORE (Systematic Coronary Risk Evaluation – систематическая оценка коронарного риска)*, впервые представленной в Рекомендациях Европейского общества кардиологов в 2003г. Система SCORE базируется на данных ряда последних проспективных европейских многоцентровых исследований и учитывает все варианты фатальных атеросклеротических конечных точек, то есть фатальных сердечно-сосудистых событий за 10-летний период.

В системе SCORE использованы следующие факторы риска:

- ✓ пол;
- ✓ возраст;
- ✓ курение;
- ✓ АД;
- ✓ общий ХС или соотношение ХС и ЛПВП.

Система SCORE позволяет определить общий прогнозируемый сердечно-сосудистый риск до 60-летнего возраста. Определение этого риска особо важно для долгосрочного прогноза у пациентов молодого возраста (20-30 лет) при низком абсолютном риске, но уже с неблагоприятным профилем факторов риска. Это позволяет отнести таких пациентов к категории более высокого риска, который с возрастом будет повышаться.

К категориям высокого общего риска развития фатальных сердечно-сосудистых событий относятся:

1. Пациенты с установленным ССЗ (пациенты с любыми клиническими проявлениями ИБС, периферическим атеросклерозом, атеросклерозом мозговых артерий, аневризмой брюшного отдела аорты).

2. Пациенты с бессимптомным течением, имеющие:

- ✓ множественные факторы риска;

✓ значительно повышенные уровни единичного фактора риска: общего ХС >8 ммоль/л; ХС ЛПНП >6 ммоль/л; АД >180/110 мм. рт. ст.;

✓ сахарный диабет II типа или диабет I типа с микроальбуминурией.

3. Ближайшие родственники пациентов с ранним началом ССЗ.

Методы определения общего холестерина в крови

Из колориметрических методов наиболее распространенными являются *реакция Либермана-Бурхарда (метод Илька) и Калиани-Златкиса-Зака*.

Реакция Либермана-Бурхарда основана на взаимодействии ХС с уксусным ангидридом, уксусной и концентрированной серной кислотами, что дает изумрудно-зеленое окрашивание раствора.

Реакция Калиани-Златкиса-Зака основана на следующем принципе: при взаимодействии ХС с хлорным железом, уксусной и серной кислотами образуется комплекс красного цвета.

Эта реакция в 4-5 раз чувствительнее, чем метод Илька, но менее специфична, т.к. широкий круг веществ дает такое же окрашивание.

Колориметрические методы подразделяются на прямые и не прямые. В прямых методах определения предварительно ХС не экстрагируется, а цветная реакция осуществляется непосредственно с сывороткой крови, а в не прямых методах липиды сыворотки крови вначале экстрагируются органическими растворителями, а после упаривания выполняют реакцию Либермана-Бурхарда. Существенным недостатком химических (неферментативных) методов определения концентрации холестерина является использование агрессивных, токсичных реактивов. В настоящее время эти методы не используются в КДЛ.

Ферментативные методы определения ХС являются наиболее специфичными, отличаются хорошей воспроизводимостью результатов, быстротой и простотой выполнения анализа. Большим их достоинством является то, что для проведения реакции

необходим небольшой объем сыворотки крови и не требуются агрессивные жидкости.

Принцип энзиматического метода определения концентрации общего ХС основан на следующем:

✓ при гидролизе эфиров ХС *холестеролэстеразой* образуется свободный холестерол, который окисляется кислородом воздуха под действием *холестеролоксидазы* с образованием эквимолярного количества пероксида водорода;

✓ под действием *пероксидазы* пероксид водорода окисляет хромогенные субстраты с образованием окрашенного продукта; интенсивность окраски пропорциональна концентрации ХС в пробе.

Рекомендованный уровень ХС в сыворотке:	<5,2 ммоль/л;
Пограничный уровень:	5,2-6,5 ммоль/л;
Высокий уровень:	>6,5 ммоль/л.

Методы определения триглицеридов в сыворотке крови

Триглицериды ферментативно гидролизуются до глицерола в соответствии со следующей схемой реакции:

1. Триглицериды \leftrightarrow глицерол + ЖК.
2. Глицерол + АТФ \leftrightarrow глицерол-3-Ф + АДФ.
3. Глицерол-3-Ф + O_2 \leftrightarrow фосфоглицероальдегид + H_2O_2 .
4. H_2O_2 + 4-аминоантипирин + *n*-хлорфенол \leftrightarrow H_2O_2 + хинонимин.

Образующаяся в ходе ферментативной реакции окраска пропорциональна содержанию ТГ в сыворотке крови.

Кроме того, существует *метод определения содержания триглицеридов в сыворотке крови с ацетилацетоном*. Его принцип основан на том, что ТГ экстрагируются из сыворотки крови. Освобожденный в результате щелочного гидролиза глицерин окисляют до формальдегида. Образовавшийся формальдегид образует с ацетилацетоном в слабом уксусном растворе окрашен-

ный комплекс, интенсивность окраски которого пропорциональна содержанию триглицеридов.

Рекомендованный уровень ТГ в сыворотке: <1,5 ммоль/л.

Пограничный уровень: 1,5-2,3 ммоль/л.

Высокий уровень: >2,3 ммоль/л.

Определение ХС ЛПВП (α -холестерола)

Метод основан на способности ЛПНП и ЛПОНП, в противоположность ЛПВП, образовывать нерастворимые комплексы с гепарином в присутствии ионов марганца. После центрифугирования в надосадочной жидкости определяют содержание холестерина ЛПВП.

Референтный уровень: 0,9-1,9 ммоль/л.

Для оценки риска развития атеросклероза рассчитывают индекс (ИА) или коэффициент атерогенности (КА):

$$КА = (ОХС - \alpha\text{-ХС}) / \alpha\text{-ХС}$$

ОХС – общий холестерол;

α -ХС – ХС ЛПВП;

Референтный уровень – 2-3.

ЛАБОРАТОРНАЯ ОЦЕНКА КИСЛОТНО-ОСНОВНОГО СОСТОЯНИЯ И ГАЗОВОГО СОСТАВА КРОВИ

КОС (кисотно-основное состояние) – важнейший показатель гомеостаза организма, а его оценка – одна из основных лабораторных процедур, выполняемых для пациентов отделений реанимации и интенсивной терапии. Оценивая динамику показателей КОС, можно судить о тяжести патологии и об эффективности терапевтических мероприятий.

Сдвиги КОС в клетках приводят к изменению активности многих ферментов, что ведет к нарушениям метаболизма, снижению выработки энергии и развитию клеточного энергодефицита, и в конечном итоге – к нарушению жизнедеятельности клеток, тканей, органов, систем и организма в целом.

По рекомендациям международных экспертов, результаты анализов КОС являются более значимыми для оценки состояния и выбора тактики лечения пациента, находящегося в критическом состоянии, чем любой другой вид исследования.

Основными понятиями КОС являются кислоты и основания.

Кислоты – соединения, обладающие свойством диссоциировать с образованием свободных ионов водорода:



Основания – соединения, обладающие свойством присоединять свободные ионы водорода.

Для протекания многих метаболических процессов в организме необходим постоянный баланс между кислотами и основаниями. От концентрации свободных ионов водорода ($[H^+]$) зависит реакция среды любого раствора. Показатель pH – это показатель реальной концентрации ионов водорода, и равен её отрицательному десятичному логарифму:

$$pH = -\lg [H^+]$$

Показатель pH отражает также соотношение CO_2 , содержание которого регулируется легкими и иона бикарбоната $[HCO_3^-]$,

основания, обмен которого происходит в почках. CO_2 растворяется с образованием угольной кислоты (H_2CO_3), которая является основным кислым компонентом внутренней среды организма. Так как концентрацию H_2CO_3 достаточно трудно измерить, кислый компонент выражают через содержание углекислого газа.

В норме соотношение $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ в организме составляет примерно 1/20. Если баланс нарушается и нарастает содержание кислоты, развивается ацидоз, если основания – алкалоз.

Существует ряд механизмов поддержания КОС. Они достаточно чувствительны к малейшим изменениям pH и позволяют организму длительное время удерживать баланс без внешних вмешательств.

Механизмы регуляции КОС

- ✓ Буферные системы крови.
- ✓ Клеточная регуляция.
- ✓ Органная регуляция.

Буферные системы крови

Этот механизм характеризуется высокой динамичностью и включается практически мгновенно. Все буферные системы работают взаимозависимо, т.е. изменения в одной из систем неизбежно приводят к изменению всех остальных.

Буфер состоит из слабой кислоты и соли слабой кислоты, образованной сильным основанием. Основной ролью буферных систем является способность поддерживать относительное постоянство концентрации ионов водорода в среде.

Выделяют следующие буферы, принимающие участие в регуляции КОС (табл. 17):

1. **Бикарбонатный буфер:** наиболее важный внеклеточный буфер крови, образуется в почках и обладает большей из всех буферов емкостью.

2. **Гемоглобиновый буфер:** основной внутриклеточный буфер крови.

3. **Белковый буфер:** наряду с бикарбонатным является внеклеточным буфером, представлен белками плазмы крови.

4. **Фосфатный буфер:** участвует в экскреции водорода в канальцах почек, емкость в крови невелика.

Таблица 17. – Основные буферные системы крови

Буферная система	Емкость (%)
Бикарбонатная	53
Гемоглобиновая	35
Белковая	7
Фосфатная	5

Бикарбонатная буферная система

Ее емкость составляет 53% всей буферной емкости крови (бикарбонат плазмы – 35%, бикарбонат эритроцитов – 18% буферной емкости). Состоит из слабой кислоты и соли сильного основания, их соотношение строго регламентировано:



Именно соотношение $\text{HCO}_3^-/\text{H}_2\text{CO}_3$ характеризуется высокой чувствительностью и динамичностью. Ценность бикарбонатного буфера повышается тем обстоятельством, что CO_2 и H_2O при избытке быстро выводятся легкими и почками, соответственно.

Гемоглобиновая буферная система

Образование CO_2 в эритроцитах происходит в небольшом количестве в реакциях пентозофосфатного пути. В соответствии с градиентом концентрации в эритроциты диффундирует CO_2 , где карбоангидраза обеспечивает образование угольной кислоты с последующей диссоциацией ее до $[\text{H}^+]$ и HCO_3^- . Освобождающийся ион $[\text{H}^+]$ образует соединение с гемоглобином. Ион HCO_3^- накапливается и диффундирует по градиенту концентрации в плазму крови. Электрохимическая нейтральность поддерживается за счет перемещения в эритроциты ионов хлора (хлоридный сдвиг). 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 pH.

Гемоглобин обладает амфотерными свойствами. 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 $[H^+]$. 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 тканях гемоглобин может образовывать соединения с CO_2 – карбоксигемоглобин ($HbCO_2$).

Белковая буферная система

Функционирует в зависимости от рН среды, то есть благодаря амфотерным свойствам в щелочной среде белки диссоциируют с освобождением иона $[H^+]$, а в кислой среде выполняют роль акцепторов ионов $[H^+]$.

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 двухосновным Na_2HPO_4 (слабое основание).

Клеточная регуляция КОС

Изменение рН крови приводит к включению клеточных механизмов (рис. 15) поддержания постоянства концентрации ионов водорода во внеклеточной жидкости:

- ✓ при увеличении рН ионы водорода переходят во внеклеточное пространство в обмен на входящие в клетку ионы калия;
- ✓ при уменьшении рН водород входит в клетку в обмен на поступающие во внеклеточное пространство ионы калия.

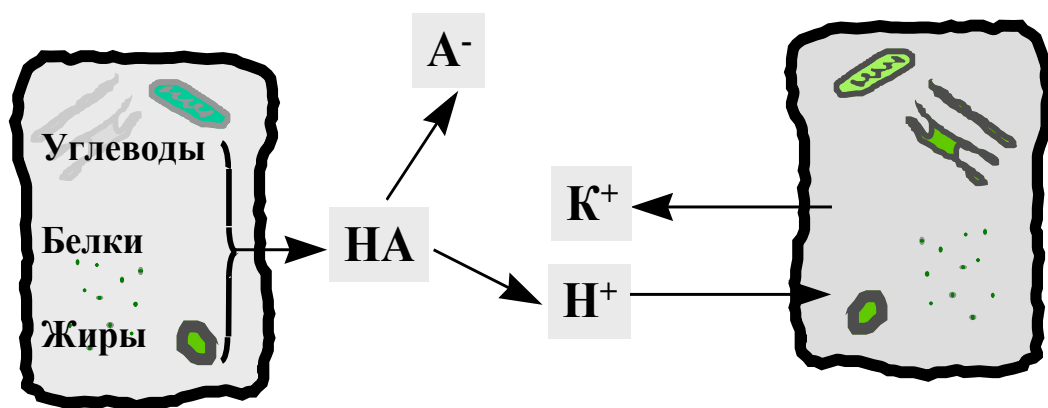


Рисунок 15. – Клеточная регуляция КОС

Органная регуляция КОС

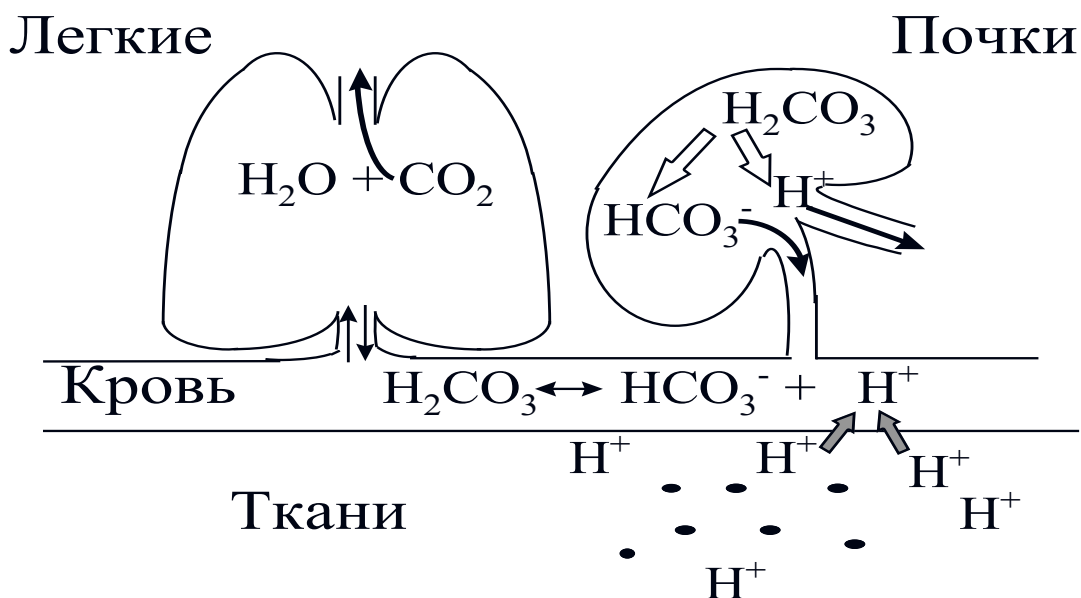


Рисунок 16. – Участие легких и почек в регуляции КОС

В данной регуляции основная роль принадлежит легким и почкам (рис. 16).

Дыхательные механизмы

Содержание CO_2 в плазме зависит от легочной вентиляции. Компенсаторные реакции, сопряженные с изменением минутного объема дыхания, зависят от реакции хеморецепторов в стволе мозга на изменение рН.

При ацидозе альвеолярная вентиляция возрастает, $P_a\text{CO}_2$ снижается и pH возвращается к норме. Процесс происходит достаточно быстро, но для стабилизации состояния необходимо от 12 до 24 часов.

При алкалозе альвеолярная вентиляция, наоборот, снижается, вызывая рост $P_a\text{CO}_2$ и закисление среды.

Почечные механизмы

Являются наиболее сложными и эффективными. Почечная компенсация нарушений КОС включает три основных механизма:

1. Реабсорбция ионов бикаarbonата в проксимальных канальцах.
2. Регенерация ионов бикаarbonата в дистальных канальцах.
3. Экскреция ионов водорода с мочой.

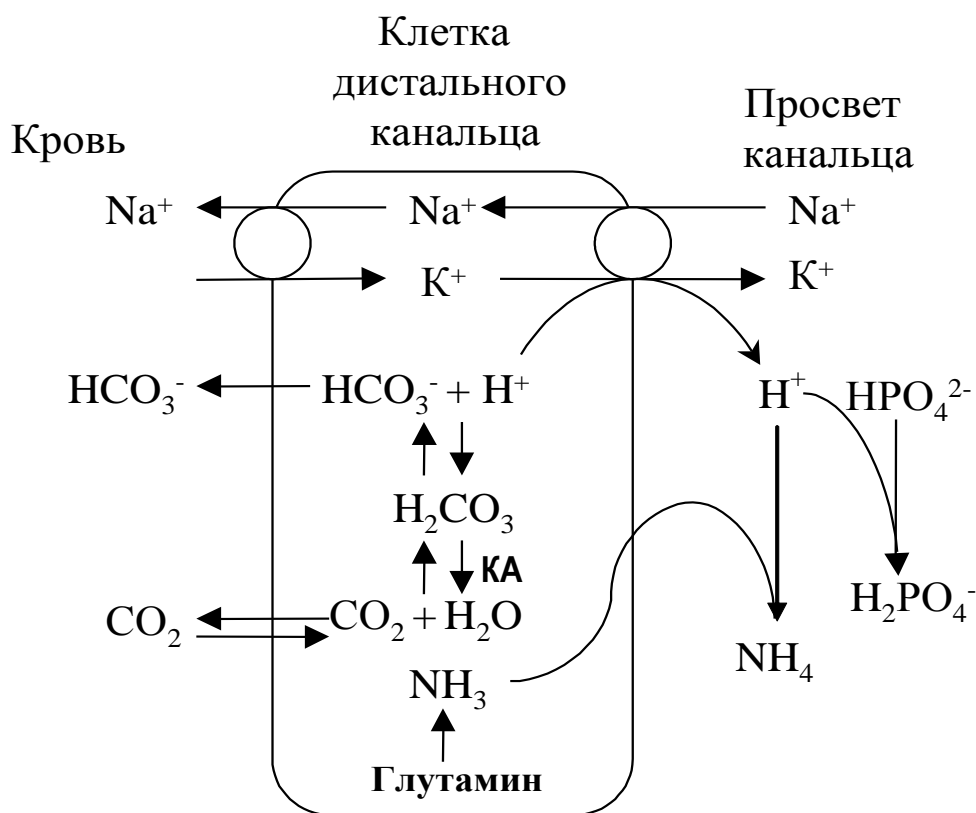


Рисунок 17. – Почечная регуляция КОС

В клетках почечных канальцев CO_2 соединяется с водой в присутствии фермента карбоангидразы (КА). Образующаяся при этом угольная кислота диссоциирует на H^+ и HCO_3^- . Последний всасывается в кровь, а H^+ секретируется в просвет канальца, где вступает в реакцию с гидрокарбонатом мочи, образуя угольную кислоту. В дальнейшем она диссоциирует на углекислый газ и воду (рис. 17).

Помимо легких и почек определенную роль в поддержании КОС организма играет печень и ЖКТ.

Печень

Регуляция КОС происходит путем окисления органических кислот, образующихся в цикле Кребса, окисления молочной кислоты (метаболизируется 45%), синтеза мочевины ($\text{CO}(\text{NH}_2)_2$) из аммиака, секреции в составе желчи бикарбоната натрия, экскреции через желчный шунт в кишечник продуктов метаболизма.

Желудочно-кишечный тракт

Поддержание КОС обеспечивается путем регуляции количества и качества абсорбируемых и экскретируемых электролитов и воды. В желудке секретируются ионы H^+ и Cl^- . Параллельно с усилением их секреции после приема пищи во внеклеточной жидкости увеличивается содержание HCO_3^- – феномен «щелочного прилива». В норме это явление быстро корректируется путем секреции бикарбоната в просвет кишечника и реабсорбцией ионов хлора. В кишечнике функционирует механизм предпочтительной реабсорбции ионов хлора. Этим объясняется развитие гиперхлоремического ацидоза после трансплантации мочеточников в подвздошную или толстую кишку.

Показатели, оценивающие КОС

Таблица 18. – Основные показатели КОС

Показатель	Референтные значения (для артериальной крови)
pH	7,35-7,45 ед.
pCO ₂	35-45 мм рт. ст.
HCO ₃	21-27 ммоль/л
BE (избыток или недостаток буферных оснований)	0±2,5 ммоль/л

$$BE = BB - NBB$$

BB – актуальные буферные основания;

NBB – должные буферные основания ($pH=7,4$ ед., $pCO_2=40$ мм рт. ст., $t \text{ тела}=37^\circ$)

Дополнительные показатели КОС

1. Анионный промежуток (АП):

$$АП = ([Na^+] + [K^+]) - ([Cl^-] + [HCO_3^-])$$

Референтный уровень – 8-16 ммоль/л

Анионный промежуток представляет собой сумму анионов органических и неорганических кислот, а также белка, не поддающихся прямому измерению в сыворотке крови. В состав АП входят: фосфаты, сульфаты, пируват, лактат, кетокислоты и др.

2. Показатели газового состава крови (PaO_2 , $ctHb$, SO_2 , PvO_2 , лактат и др.).

3. Показатели в моче:

✓ pH (4,5-7,5 ед.);

✓ **титруемая кислотность (ТК)** (10-30 ммоль/л);

✓ $[NH_4^+]$ (30-50 ммоль/л).

- **$[H^+]$ нетто** – суммарное количество ионов водорода, выделяющееся с мочой (30-80 ммоль/сут):

$$[H^+] \text{ нетто} = ([NH_4^+] + ТК) - [HCO_3^-]$$

Нарушения КОС

Выделяют ряд классификаций нарушений КОС (табл. 19).

Ацидоз – патологическое состояние, характеризующееся избыточным образованием или задержкой кислот в организме либо чрезмерной утратой оснований:

- **Метаболический (МАц)** (увеличение содержания в организме нелетучих кислот или утрата оснований).
- **Дыхательный (ДАц)** (патологическая задержка угольной кислоты в организме (в виде CO_2)).

Таблица 19. – Нарушения КОС

Параметр	Вид нарушения
pH крови	Ацидоз Алкалоз
Характер первичного изменения	Дыхательные Метаболические Смешанные Комбинированные
Степень компенсации	Компенсированные Субкомпенсированные Декомпенсированные

Алкалоз – патологическое состояние, характеризующееся увеличением содержания оснований или избыточной потерей кислот из организма:

- **Метаболический (МАл)** (увеличение содержания в организме оснований или утрата нелетучих кислот).
- **Дыхательный (ДАл)** (избыточное выведение из организма угольной кислоты в виде CO_2).

Компенсация нарушений КОС

Компенсация нарушений КОС – это процессы, направленные на нормализацию отношения pCO_2 и $[\text{HCO}_3^-]$ во внеклеточной жидкости. Так, если при патологическом процессе первично изменяется величина метаболической компоненты (концентрация гидрокарбоната плазмы), компенсаторно должна изменяться, причем в том же направлении, дыхательная компонента (pCO_2) и наоборот (табл. 20).

Таблица 20. – Компенсация нарушений КОС

Тип нарушения	$[\text{H}^+]$	pH	Первичное нарушение	Компенсация
МАц	↑	↓	↓ $[\text{HCO}_3^-]$	↓ pCO_2
МАл	↓	↑	↑ $[\text{HCO}_3^-]$	↑ pCO_2
ДАц	↑	↓	↑ pCO_2	↑ $[\text{HCO}_3^-]$
ДАл	↓	↑	↓ pCO_2	↓ $[\text{HCO}_3^-]$

Дыхательный алкалоз

Дыхательный алкалоз является следствием избыточного выведения диоксида углерода, по отношению к его продукции в тканях, через легкие в результате альвеолярной гипервентиляции.

В зависимости от степени компенсации дыхательные ацидозы делятся на острые и хронические:

Острый:

$$p\text{CO}_2 - \downarrow; [\text{HCO}_3^-] - \text{норма}; \text{pH} - \uparrow$$

Хронический:

$$p\text{CO}_2 - \downarrow; [\text{HCO}_3^-] - \downarrow; \text{pH} - \uparrow \text{ или норма}$$

Причины развития:

- Повреждения ЦНС (травмы, опухоли, инсульт, инфекции).
- Тканевая гипоксия (анемии, шок, сепсис).
- Лекарственные (передозировка салицилатов).
- Гиперкомпенсация метаболического ацидоза.

Дыхательный ацидоз

Данное нарушение КОС является следствием легочной гиповентиляции.

Так же как и дыхательный алкалоз, это нарушение бывает острым и хроническим:

Острый:

$$p\text{CO}_2 - \uparrow; [\text{HCO}_3^-] - \text{норма}; \text{pH} - \downarrow.$$

Хронический:

$$p\text{CO}_2 - \uparrow; [\text{HCO}_3^-] - \uparrow; \text{pH} - \downarrow \text{ или норма.}$$

Наиболее частыми причинами дыхательных ацидозов являются:

- депрессия дыхательного центра (ЧМТ, инфекции, лек. средства);
- нейромышечные (нейропатии, миопатии);
- торакальные (пневно- и гидроторакс, бронхиальная астма, эмфизема, пневмосклероз).

Метаболический алкалоз

Метаболическим алкалозом называется нарушение КОС, при котором наблюдается первичное увеличение концентрации гидрокарбоната крови (>27 ммоль/л), следствием чего является увеличение рН выше 7,45 ед.

Клиническое значение имеет классификация метаболических алкалозов на хлорчувствительные и хлоррезистентные, в основе которой лежит концентрация хлора в моче:

Хлорчувствительный (СІ в моче <20 ммоль/л):

- Потеря ионов водорода через ЖКТ.
- Потеря ионов водорода с мочой.
- Избыточное экзогенное поступление оснований.

Хлоррезистентный (СІ >20 ммоль/л):

- Первичный гиперальдостеронизм.
- Синдром Кушинга.
- Адреногенитальный синдром.
- Терапия минералокортикоидами.

Метаболический ацидоз

Первичным изменением в крови при данном нарушении КОС является гипобикарбонатемия.

Основные причины метаболических ацидозов:

- Нарушение функции почек.
- Увеличение в организме образования эндогенных органических кислот (активация кетогенеза, лактоацидоз).
- Экзогенное введение кислот или их предшественников.
- Потеря бикарбоната через желудочно-кишечный тракт (синдром диареи, интенсивное дренирование желудочно-кишечного тракта).

В качестве лабораторно-диагностического приема используют классификацию метаболического ацидоза с учетом величины анионного промежутка (АП):

Ацидоз с увеличенным АП:

- почечная недостаточность;

- кетоацидоз, лактоацидоз;
- отравление этанолом, метанолом, салицилатами, этиленгликолем.

Ацидоз с нормальным АП:

- диарея;
- почечный канальцевый ацидоз (дистальный);
- ингибиторы карбоангидразы.

Лабораторная оценка газового состава крови

Основные функции газообмена в организме:

1. Выведение из организма диоксида углерода, образующегося в результате катаболизма.
2. Обеспечение тканей и органов в достаточном количестве кислородом, который является главным акцептором электронов цепи дыхательных переносчиков в митохондриях.

Ниже приводятся лабораторные показатели, используемые для оценки основных этапов (компонентов) транспорта кислорода в организме.

Дыхательный компонент транспорта кислорода

- P_{aO_2} – давление кислорода в артериальной крови (80-107 мм рт. ст.);
- % *интратрульмонального шунтирования (Shunt)* (до 5%);
- $D (A-a)pO_2$ – альвеоло-артериальная разница по кислороду (5-15 мм рт. ст.)

Гемический компонент транспорта кислорода

- $ctHb$ – общая концентрация гемоглобина:

$$ctHb = cH^+-Hb + cO_2-Hb + cCO-Hb + cMet-Hb$$
(муж. – 130-160 г/л; жен. – 120-140 г/л);
- SO_2 – степень насыщения Hb кислородом (95-98%);
- $[2,3-ДФГ]$ – концентрация 2,3-дифосфоглицериновой кислоты в эритроцитах (4,1-5,6 ммоль/л);
- $ctO_2 (tO_2)$ – общая концентрация кислорода в крови (муж. – 8,4-9,9 ммоль/л; жен. – 7,1-8,9 ммоль/л);

- p_{50} – парциальное давление кислорода в крови, при котором происходит 50% насыщение им гемоглобина в стандартных условиях (25-29 мм рт. ст.).

Тканевой компонент транспорта кислорода

- $D(a-v)O_2$ – артерио-венозная разница по кислороду (1,9-3,2 ммоль/л);
- PvO_2 – парциальное давление O_2 в смешанной венозной крови (35-45 мм рт. ст.);
- P_x – давление извлечения (экстракции) кислорода (38 мм рт. ст.);
- Cx – концентрация извлекаемого кислорода (количество O_2 которое может быть извлечено из 1л крови при давлении кислорода в смешанной венозной крови, равном 38 мм рт. ст. при постоянных рН и pCO_2) (2,3 ммоль/л);
- *Концентрация лактата в крови* (0,5-2,2 ммоль/л).

Методы оценки КОС

Особенности преаналитического этапа

Анализ КОС относится к категории экспресс-тестов, поскольку его параметры быстро изменяются при любых сдвигах состояния пациента (показателей дыхания, температуры тела, физической активности, функции почек и т.д.). Общее время выполнения исследования и выдачи результатов анализа КОС не должно превышать 45 минут.

Хотя параметры КОС можно определять в крови любого типа, для анализа референтным биологическим материалом считается артериальная кровь из-за большей стабильности ее газового состава и метаболических параметров. Так называемая артериоризированная капиллярная кровь, забираемая у взрослых из пальца или у маленьких детей из боковой поверхности пятки, по составу близка к артериальной, но только при условии хорошего кровотока в конечности. В венозной крови содержатся продукты метаболизма, выходящие из тканей, ее газовый состав гораздо менее постоянен, в значительной степени зависит от периферического кровотока.

При исследовании и расчете показателей КОС кроме измерения рН определяются также газы крови. Современные анализаторы неотложных состояний способны в одной пробе крови определять и другие жизненно важные параметры: концентрацию электролитов, некоторых метаболитов (глюкоза, лактат, мочевины, креатинин), гемоглобина, а также гематокрит. Однако наиболее «строгие» требования к подготовке пациента, взятию биоматериала и первичной обработке пробы предъявляются именно при оценке КОС.

Ключевое значение для обеспечения надежности данных имеет преаналитический этап лабораторных исследований, который при анализе КОС имеет следующие важные условия:

1. Состояние пациента должно было стабильным в течение 20-30 мин. (особенно после окончания или прерывания лечебных и диагностических процедур), а параметры дыхания оставаться неизменными в течение хотя бы 5-7 мин. до взятия крови.

2. Перед взятием крови из лучевой артерии нужно убедиться в наличии кровотока по параллельно идущей локтевой артерии. Это даст уверенность в сохранении кровоснабжения кисти руки даже при временной закупорке лучевой артерии в месте пункции.

3. При выполнении артериальной пункции важно следить за тем, чтобы игла попала именно в артерию, а не в находящуюся по-соседству вену. Примесь венозной крови в шприце может изменить показатели газового состава в отношении CO_2 (завышение) и O_2 (занижение). В случае ошибочной пункции вены, непопадания в артерию или сквозного прокола сосуда и остановки тока крови в шприц не следует «искать» артерию движениями иглы, так как это причинит сильную боль пациенту. Лучше наложить давящую повязку и повторить взятие крови в другом месте.

4. Если кровь берется из артериального катетера или артериовенозного шунта, необходимо предварительно удалить остатки вводившихся через них растворов. Для этого из них выпускают и отбрасывают кровь в количестве не менее 3-6 объемов катетера (обычно 2-5 мл). При взятии крови важно соблюдать герметичность и не допустить попадания воздуха в шприц, а также предотвратить образование сгустков.

5. Перед взятием капиллярной крови нужно убедиться в хорошем кровотоке в конечности, которая у пациента должна быть

теплой и розовой. При необходимости артериализация крови достигается легким массажем и согреванием конечности в течение 5-7 мин. Часто практикуемое в такой ситуации «выдавливание» крови из пальца приводит к ее смешиванию с тканевой жидкостью, развитию гемолиза и активации процессов свертывания, что ведет к существенным изменениям определяемых параметров.

6. Исследование должно быть выполнено как можно быстрее, учитывая лабильность показателей КОС, связанную с продолжающимся метаболизмом в клетках крови (поглощение кислорода и глюкозы, накопление углекислоты и лактата со сдвигом рН, возрастание уровня ионизированного кальция и др.) Показатели изменяются быстрее при лейкоцитозе, лейкозах и лейкомоидных реакциях, поэтому рекомендуется выполнение анализа не позднее 15-20 мин. после взятия крови. Если это невозможно и требуется транспортировка пробы, ее нужно быстро охладить до $+4^{\circ}\text{C}$, в таких условиях проба остается пригодной для исследования до одного часа. Перед анализом необходимо согревание пробы до комнатной температуры.

7. Взятая кровь не должна смешиваться с воздухом во избежание изменений газового состава и искажения результатов исследования. Оставленный в шприце пузырек воздуха (в зависимости от размеров и времени инкубации до анализа) способен исказить результаты определения O_2 и CO_2 на 10-20%. При взятии капиллярной крови избежать контакта с воздухом практически невозможно. Важным условием является как можно более быстрое взятие пробы после прокола пальца, заполнение капилляра и закрытие колпачками его обоих концов, вплоть до момента исследования.

8. Непосредственно перед анализом необходимо тщательное перемешивание пробы, так как некоторые параметры (Hb, Hct, pO_2 , tO_2 , BE и др.) могут быть искажены.

9. Во взятой крови не должно быть сгустков, иначе возможно засорение узлов анализатора и искажение результатов (pCO_2 , рН, Hb). Первые микротромбы могут образоваться уже через 15 с после взятия крови. Предотвратить ее свертывание позволяет использование специальных шприцов с нанесенным на стенки сухим гепарином лития. Избежать засорения анализатора позво-

ляют специальные фильтры-ловушки сгустков, надеваемые на шприц при введении пробы в прибор.

10. Гемолиз в пробе существенно искажает результаты анализа ионного состава крови и некоторые параметры КОС (K^+ , Ca^{++} , pCO_2 , ВЕ, СО-Нb). Обнаружить небольшой гемолиз в цельной крови очень трудно. Основной причиной его появления служат дефекты процедуры взятия крови: прокалывание сосуда насквозь и образование гематомы, повреждение окружающих тканей, неполное испарение дезинфектанта (спирта) на коже и т.д. В пробах капиллярной крови гемолиз наблюдается значительно чаще, поскольку вытекающая после прокола пальца кровь неизбежно соприкасается с поврежденными тканями и с кожей, а ее «выдавливание» усиливает травму клеток. Кроме того, к гемолизу ведет длительное охлаждение пробы крови. Снизить влияние указанных факторов и предотвратить гемолиз помогает использование специальных систем для артериальной крови, тщательное выполнение правил ее взятия и минимизация времени хранения пробы перед анализом (по возможности без охлаждения).

Большое значение при исследовании КОС и газового состава крови имеют и другие аспекты преаналитического этапа, схожие для всех клинико-лабораторных исследований: точная идентификация пациента и шприца или капилляра с пробой, выжидание перед взятием крови определенного промежутка времени (минимум 15-20 мин) после внутривенной инфузии и вызванной ею гемодилюции, учет параметров ИВЛ, вводимых лекарственных препаратов и проводимых диагностических и терапевтических процедур.

Методы исследования

pH плазмы крови можно определить следующими методами:

✓ *Индикаторный метод* основан на свойстве некоторых слабых кислот или оснований, используемых в качестве индикаторов, диссоциировать при определенных значениях pH и изменять при этом свой цвет.

✓ *Метод pH-метрии* позволяет более точно и быстро определять концентрацию водородных ионов с помощью специальных полярографических электродов, на поверхности которых при по-

гружении в раствор создается разность потенциалов, величина которой зависит от рН исследуемой среды (рис. 18).

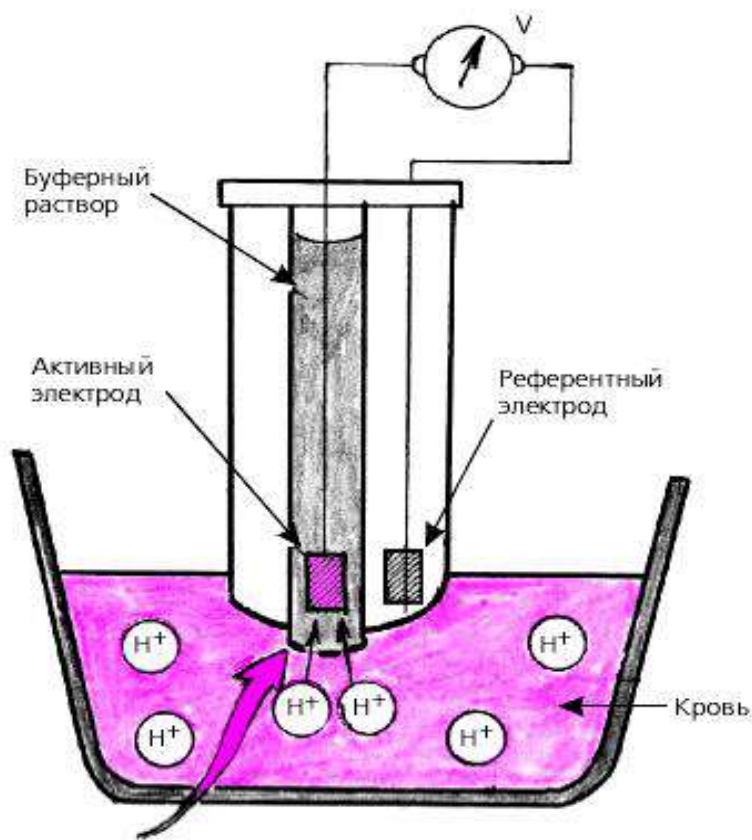


Рисунок 18. – Схема устройства рН-метра

Один из электродов при этом является измеряющим. Он выполнен из благородного металла (платины или золота), другой (референтный) служит электродом сравнения. Платиновый электрод отделен от остальной системы стеклянной мембраной, проницаемой только для ионов водорода (H^+). Внутри он заполнен буферным раствором. Электроды погружают в исследуемый раствор и поляризуют от источника тока. В результате в замкнутой электрической цепи возникает ток. Поскольку платиновый (активный) электрод дополнительно отделен от раствора электролита стеклянной мембраной, проницаемой только для ионов H^+ , величина напряжения на обеих поверхностях этой мембраны пропорциональна рН крови.

Для оценки кислотно-основного состояния может быть применен *метод Аструпа*. При этом определяют также показатели, как ВВ, ВЕ и pCO_2 . Две порции исследуемой крови приводят

в равновесие с двумя газовыми смесями известного состава, различающимися по парциальному давлению CO_2 . В каждой порции крови измеряют рН. Значения рН и pCO_2 в каждой порции крови наносят в виде двух точек на номограмму. Через две отмеченные на номограмме точки проводят прямую до пересечения со стандартными графиками ВВ и ВЕ и определяют фактические значения этих показателей. Затем измеряют рН исследуемой артериальной крови и находят на полученной прямой точку, соответствующую этой измеренной величине рН. По проекции точки на ось ординат определяют фактическое напряжение CO_2 в крови (pCO_2).

В настоящее время так называемым «золотым стандартом» лабораторной экспресс-диагностики, или STAT-анализа неотложных состояний, являются три параметра: рН, pO_2 и pCO_2 артериальной крови. Поэтому основным оборудованием в экспресс-лаборатории остается анализатор кислотно-основного состояния (КОС) и газов крови.

Развитие анестезиологии и реаниматологии стимулировало разработку электродов для определения концентрации электролитов крови. В состав газоанализаторов были включены ионоселективные электроды с возможностью измерения в той же микропробе цельной крови концентрации K^+ , Na^+ , Ca^{2+} , Cl^- . Были созданы также литиевый и магниевый электроды. Но поскольку определение уровня лития наиболее востребовано лишь в ургентной психиатрии, а уровень магния достаточно нестабилен и противоречив, к принятым в медицинской практике параметрам STAT-анализа были причислены только четыре вышеназванных электролита.

Современная концепция лабораторной экспресс-диагностики неотложных состояний основана на понятии РОСТ (Point-of-Care-Testing), то есть на анализе «непосредственно у постели пациента». В клинической практике концепция РОСТ подразумевает установку и работу анализаторов КОС, газов крови, электролитов, метаболитов (глюкозы, лактата) непосредственно в операционной, отделении реанимации, отделении гемодиализа и т.д. Практическая реализация данной концепции требует того, чтобы современные анализаторы КОС отвечали определенным требованиям:

- ✓ портативность;
- ✓ простота обслуживания;
- ✓ малый объем пробы крови;

Современные информационные технологии в составе анализаторов позволяют:

- ✓ создавать и обрабатывать обширную базу данных;
- ✓ быстро (в режиме on-line) передавать обработанную информацию лечащему врачу;
- ✓ проводить дистанционное обслуживание анализаторов;
- ✓ автоматизировать контроль качества.

Измерение трех параметров «золотого стандарта» (pH, pO₂, pCO₂) в артериальной крови необходимо учитывать:

- ✓ при проведении оперативных вмешательств под общей анестезией с ИВЛ;
- ✓ при проведении продленной ИВЛ в послеоперационном периоде;
- ✓ у пациентов отделений реанимации и интенсивной терапии.

Поступление пациентов с полиорганной недостаточностью, шоком разной этиологии (т.е. с системной гипоксией) требует обязательной оценки кислородного статуса. Данные могут быть получены при включении в состав газоанализатора так называемого ко-оксиметра, то есть оптической системы для измерения параметров ко-оксиметрии (ctHb, SO₂, FHbO₂, FHb, FHbCO, FHbMet, FHbF) наряду с традиционными параметрами STAT-анализа из одной микропробы крови.

ЛАБОРАТОРНАЯ ОЦЕНКА ВОДНО-ЭЛЕКТРОЛИТНОГО И МИНЕРАЛЬНОГО ОБМЕНА

Вода в организме взрослого человека составляет в среднем около 70% массы тела. Ее содержание с возрастом уменьшается (табл. 21).

Таблица 21. – Содержание воды в организме

Возрастная группа	% воды от массы тела
Новорожденные	75-80%
Взрослые до 60 лет	70%
Взрослые >60 лет:	
мужчины	54%
женщины	46%

Вода в организме распределяется между двумя главными депозитами:

- Внутриклеточное пространство (ВКЖ).
- Экстраклеточное пространство (ЭКЖ), которое в свою очередь включает:
 - внутрисосудистую жидкость;
 - интерстициальную жидкость;
 - транселлюлярную жидкость.

Главные ионы ЭКЖ – катион натрия, анион хлора и карбонат-анион.

Главные ионы ВКЖ – катион калия, анион фосфата и белковый анион. Распределение ионов во внеклеточной жидкости неравномерно. Если в плазме крови концентрация белка составляет 65-85 г/л, то в интерстициальной жидкости – 15-20 г/л.

Таблица 22. – Содержание ионов в сыворотке крови

Катионы	ммоль/л	Анионы	ммоль/л
Натрий	135-145	Хлор	96-107
Калий	3,5-5,2	Гидрокарбонат	21-27
Кальций	2,12-2,6	Анионный промежуток (АП)	8-16
Магний	0,8-1		

Осмотическое давление и осмоляльность

Осмотическое давление возникает в результате прохождения воды через полупроницаемую мембрану, когда с одной ее стороны в растворе находится субстанция, для которой эта мембрана непроницаема. Один миллимоль вещества, растворенного в 1 кг воды, после отделения ее полупроницаемой мембраной от «чистой» воды, вызывает давление, равное 17 мм рт. ст. Это количество субстанции называется *миллиосмолем*.

Общая осмоляльность всех жидкостей организма зависит:

- от концентрации свободных частиц растворенной осмоактивной субстанции;
- от активности этих частиц;
- от содержания воды.

Общая осмоляльность плазмы крови рассчитывается следующим образом:

$$\text{Осм} = 2 \times [\text{Na}] + [\text{глюкоза}] + [\text{мочевина}]$$

Осмоляльность можно измерить с помощью осмометра криоскопическим методом.

Референтный уровень – 285 ± 10 мОсм/кг H_2O .

Эффективное осмотическое давление в ЭКЖ создается в основном ионами натрия и соответствующими ему анионами, для которых клеточная мембрана относительно непроницаема. Эффективная осмоляльность плазмы равна:

$$\text{Осм} = 2 \times [\text{Na}] + [\text{глюкоза}]$$

Клиническое значение при оценке водно-электролитного обмена имеет показатель *осмоляльный промежуток (интервал)* – это разница между осмоляльностью, вычисленной по формуле и измеренной с помощью осмометра.

Референтный уровень – до 10 мОсм/кг H_2O .

Регуляция водного обмена

Организм теряет воду через почки, легкие, ЖКТ и кожу. Потери воды восполняются посредством выпитой жидкости и пищи, часть воды образуется в процессе обмена веществ (300 мл/сут). В случае ограничения поступления воды главным органом выделения ее являются почки.

Выделение воды почками регулируется антидиуретическим гормоном (АДГ), который увеличивает реабсорбцию воды в дистальной части нефрона.

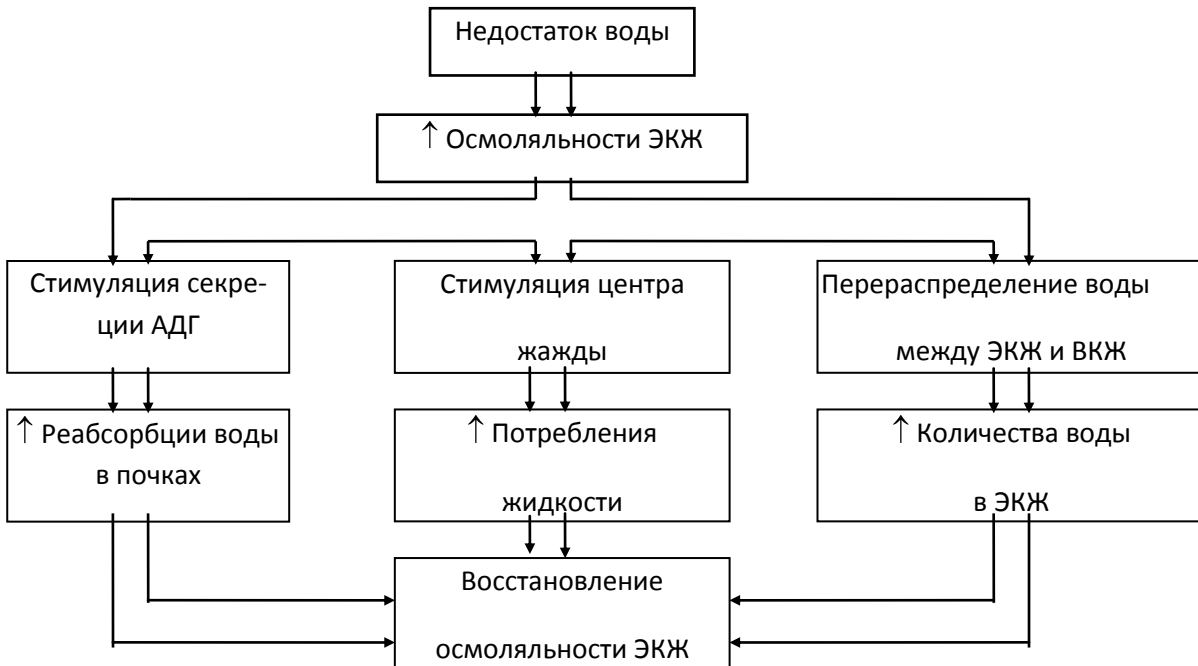


Рисунок 19. – Физиологический ответ организма на недостаток воды

Регуляция обмена натрия

При стабильном поступлении натрия с пищей его выделение с мочой равняется потреблению. Общее количество отфильтрованного натрия в первичной моче за сутки составляет около 22500 ммоль. В проксимальных канальцах реабсорбируется около 90%, в дистальных – 9% натрия. Около 1% натрия выводится с мочой. В клинике для оценки выведения натрия с мочой используется показатель фракционной экскреции:

$$Fe_{Na} = [Na^+_{\text{мочи}}]/[Na^+_{\text{плазмы}}] \times [Креатинин_{\text{плазмы}}]/[Креатинин_{\text{мочи}}] \times 100\%$$

Референтный уровень – до 1%.

Диагностически значимое увеличение >1,5%.

В проксимальных канальцах реабсорбция натрия зависит от величины клубочковой фильтрации, в дистальных же регулируется альдостероном. Увеличение реабсорбции натрия в этой части нефрона сопровождается увеличением выведения ионов калия и водорода с мочой.

Регуляция выделения альдостерона осуществляется главным образом за счет *ренин-ангиотензин-альдостероновой системы*:

Уменьшение объема ОЦК приводит к уменьшению тока крови через почки и снижению суммарного заряда натрия, что сопровождается ростом выделения ренина клетками юкстагломерулярного аппарата



Ренин высвобождает ангиотензин-I из ангиотензиногена, синтезирующегося в почках и печени



Ангиотензин-I под влиянием конвертирующего фермента в легких превращается в ангиотензин-II



Ангиотензин-II увеличивает синтез альдостерона путем влияния на клетки коры надпочечников

Рост объема внеклеточной жидкости стимулирует выделение предсердного натриуретического фактора (ANF), который влияет на увеличение диуреза и рост выведения натрия с мочой, а также тормозит синтез альдостерона.

Лабораторные показатели, используемые для оценки водно-электролитного обмена

Лабораторные показатели, используемые для оценки водно-электролитного обмена (табл. 23) принято делить на две группы:

1. Показатели для оценки объема внеклеточной жидкости.
2. Показатели для оценки объема внутриклеточной жидкости.

Объем внеклеточной жидкости можно оценить с помощью следующих показателей:

- ✓ количества эритроцитов в периферической крови;
- ✓ концентрации общего белка (альбумина) в плазме крови;
- ✓ концентрации гемоглобина в крови;
- ✓ величины гематокрита (зависит от объема вне- и внутриклеточной жидкости).

Объем внутриклеточной жидкости оценивают с помощью:

- ✓ концентрации натрия в сыворотке;
- ✓ осмоляльности плазмы;
- ✓ среднего объема эритроцита (MCV);
- ✓ средней концентрации гемоглобина в эритроците (MCH).

Таблица 23. – Основные показатели для оценки состояния гидратации

Показатель	Референтные значения
Количество эритроцитов	Муж. – $4,0-5,0 \times 10^{12}/л$ Жен. – $3,7-4,7 \times 10^{12}/л$
Общий белок	65-85 г/л
Гемоглобин	Муж. – 130-160 г/л Жен. – 120-140 г/л
Ht	Муж. – $47 \pm 5\%$ Жен. – $42 \pm 5\%$
Na^+	135-145 ммоль/л
Осм _{пл}	275-295 мосм/кг
MCV	80-93 фл
MCH	27-31 пг

Нарушения водно-электролитного обмена

Основные виды нарушений водно-электролитного обмена – обезвоживание и гипергидратация.

Обезвоживание – состояние отрицательного баланса воды в организме.

Гипергидратация – состояние положительного водного баланса в организме.

В зависимости от концентрации натрия и величины осмоляльности плазмы нарушения водно-электролитного обмена следующие:

- *Изотонические* – осмоляльность плазмы – 275-295 мОсм/кг, [Na] – 135-145 ммоль/л. Равномерная утрата или задержка воды и натрия.
- *Гипотонические* – осмоляльность плазмы <275 мОсм/кг, [Na]<135 ммоль/л. Доминирует потеря натрия или задержка воды.
- *Гипертонические* – осмоляльность плазмы >295 мОсм/кг, [Na]>145 ммоль/л. Доминирует потеря воды или задержка натрия.

Таблица 24. – Диагностика преобладающих потерь воды или Na

Показатель	Преобладающие потери натрия (гипотоническая дегидратация)	Преобладающие потери воды (гипертоническая дегидратация)
Натрий сыворотки	N или ↑	↑
Гематокрит	↑↑	Незначительно ↑
Мочевина сыворотки	↑	N
Объем мочи	↓	↓↓
Удельный вес мочи	↑	↑↑

Таблица 25. – Клиническая диагностика степени дегидратации (ВОЗ)

Степень дегидратации	% снижения массы тела	Клинические признаки
I	3-6	Жажда, сухость кожи, тахикардия
II	6-9	Жажда, сухость кожи, тахикардия, олигурия, гипотензия
III	Более 9	Жажда, сухость кожи, тахикардия, олигурия, гипотензия

Характеристика основных электролитов крови

Катионы

Натрий. Общее содержание натрия в организме взрослого человека с массой тела 70 кг примерно 100 г (4350 ммоль). Около 75% общего содержания натрия в организме активно участвует в обменных процессах. Суточное потребление натрия 2-4 г (87-174 ммоль). Примерно 90% (78-157 ммоль) обменного натрия экскретируется из организма с мочой и 10% (9-17 ммоль) – с калом и потом.

Натрий составляет 92% всех катионов интерстициальной жидкости и плазмы и 46% всех осмотически активных веществ. Ориентировочно 44% всего натрия организма находится во внеклеточной жидкости, 47% – в костях и хрящах («депо натрия») и 9% внутриклеточно. Внутрикостный натрий довольно подвижен, 45% его количества участвует в свободном метаболизме.

Внутрикостный подвижный натрий является его функциональным резервом, который обеспечивает длительную компенсацию патологических потерь этого элемента. Натрий, накапливающийся во внеклеточной жидкости в избыточном количестве, в костной ткани не депонируется. Этот избыток натрия эффективно может быть выведен из организма только через почки с мочой при достаточно высоком диурезе.

Натрий фильтруется в почечных канальцах в первичную мочу и тем самым содержится в ней в такой же концентрации, что и в плазме крови. Общее количество натрия, экскретируемого почками, зависит от скорости их клубочковой фильтрации, концентрации в плазме крови, степени реабсорбции в канальцах из первичной мочи и интенсивности секреции в канальцевую мочу. Вызванное любой причиной уже небольшое увеличение или снижение скорости клубочковой фильтрации натрия изменяет его экскрецию с мочой. Количество экскретируемого с мочой натрия определится разностью между количеством натрия, профильтровавшегося в клубочках и реабсорбированного в канальцах. Скорость клубочковой фильтрации является первым, а степень канальцевой реабсорбции вторым и основным фактором регуляции экскреции натрия из организма. Натрий всасывается обратно в кровь во всех сегментах почечных канальцев. Наибольшее коли-

чество натрия реабсорбируется в проксимальных канальцах – 85% натрия, профильтровавшегося в клубочках здоровых людей. В норме не более 1% натрия ультрафильтрата клубочков теряется с мочой. Способность проксимальных канальцев почек к абсолютному увеличению реабсорбции натрия ограничена. В дистальных канальцах количество реабсорбируемого натрия не превышает небольшого и постоянного уровня.

Основные функции натрия в организме:

- ✓ поддержание осмоляльности и объема внеклеточной жидкости;
- ✓ регуляция водного обмена;
- ✓ участие в нервно-мышечной возбудимости.

Диссоциирующие соли натрия (натрия хлорид, натрия гидрокарбонат, натрия фосфаты) обеспечивают примерно 92% осмоляльности внеклеточной жидкости.

Основные причины **гипернатриемии** (концентрация в крови >145 ммоль/л) заключаются в следующем:

- ✓ гипогидратация (дефицит безэлектролитной воды) в результате отрицательного водного баланса при несахарном диабете, длительной ИВЛ неувлажненными газовыми смесями, при назначениях осмотических диуретиков и др.;
- ✓ солевая перегрузка организма.

Гипонатриемия (концентрация в крови <135 ммоль/л) развивается в следующих случаях:

- ✓ при положительном балансе безэлектролитной воды, вызывающем разведение крови (водная интоксикация при почечной недостаточности, высвобождение из тканей больших количеств безэлектролитной воды в результате гиперкатаболизма после операций, травм; задержка в организме безэлектролитной воды при повышенной секреции антидиуретического гормона);
- ✓ при отрицательном балансе натрия (бессолевая диета, применение натрийуретиков, болезнь Аддисона, кишечные свищи, рвота, диарея);
- ✓ при перемещениях натрия в третье водное пространство при кишечной непроходимости и перитоните; клетки при их трансминерализации; вследствие фиксации натрия на коллагене воспаленных и поврежденных тканей.

Калий. Общее содержание калия в организме взрослого человека с массой тела 70 кг примерно 150 г (3900 ммоль), что примерно в 1,5 раза превышает общее содержание натрия. У мужчин содержание калия в организме выше, чем у женщин (45 ммоль/кг у мужчин и 35 ммоль/кг у женщин), что связано, в частности, с относительно большей у мужчин массой мышечной ткани. По мере старения или физического истощения содержание калия в организме уменьшается. В активном обмене участвует 90% всего имеющегося в организме калия. Нормальное суточное потребление калия – 3-4 г (78-104 ммоль), что обеспечивается приемом в составе пищи 6-8 г калия хлорида, 1 г которого содержит по 13,6 ммоль калия и хлора. Количество обменного (потребляемого, высвобождающегося из тканей и выделяемого) калия зависит от многих причин (объем мышечной массы, физическая активность, возраст, пол и др.). Обычная физиологическая потребность в калии в состоянии покоя составляет 1,0-1,5 ммоль на 1 кг массы тела в сутки.

Примерно 98% всего калия организма находится в клетках и лишь 2% внеклеточно. Калий является основным внутриклеточным катионом. Он составляет 77% всех внутриклеточных катионов. Около 70% калия организма сосредоточено в мышцах. Калий является единственным катионом, который почти полностью находится в клетках в свободном ионизированном состоянии. Небольшая часть внутриклеточного калия, связанного глюкозой, белками, креатинином и фосфатами, неподвижна. В интерстициальной и внутрисосудистой жидкостях также почти весь калий находится в свободном ионизированном состоянии.

Величина отношения концентрации калия вне и внутри клеток является важной характеристикой калиевого обмена, определяющей трансмембранный потенциал клеток, а также физиологические и патологические эффекты калия. Ориентировочно отношение концентрации внеклеточного калия к внутриклеточному (мышечному) в среднем равно 1/30, отношение концентраций калия в плазме и эритроцитах – 1/20. Поскольку внутриклеточная концентрация калия относительно внеклеточной концентрации очень высока, то даже небольшие изменения внеклеточной его концентрации существенно изменяют величину отношения внутриклеточной и внеклеточной концентрации калия и тем самым –

трансмембранный потенциал и функциональное состояние клеток. Эта закономерность имеет большое практическое значение. Например, при высоком содержании калия в плазме введение пациенту внутривенно концентрированного раствора глюкозы с инсулином вызывает небольшое уменьшение содержания калия в плазме крови за счет перемещения калия в клетки, однако это сопровождается выраженным снижением токсических эффектов гиперкалиемии.

Обменный калий выводится из организма на 95-98% (75-150 ммоль) с мочой и на 2-5% (3-7 ммоль) с калом и потом. В норме концентрация калия в моче 20-60 ммоль/л. Выделение калия с мочой в ночное время несколько снижается и увеличивается утром и днем. Количество выделяющегося с мочой калия определяется разностью величин секреции и реабсорбции калия в дистальных почечных канальцах. Реабсорбция калия в дистальных канальцах не существенна. Практически весь экскретируемый из организма калий является результатом его секреции клетками дистальных канальцев. Избыточное высвобождение калия из тканей или избыточное его поступление в организм при достаточно интенсивном диурезе сопровождается быстрым выведением излишков калия из организма и гиперкалиемия не возникает.

При сниженном диурезе (олигурия) почки длительно сохраняют способность адекватно выводить из организма калий, высвобождающийся в тканях. Определение гиперкалиемии практически всегда свидетельствует о тяжелом поражении мочевыделительной функции почек. При возникновении дефицита калия почки медленно и слабо реагируют компенсаторной задержкой калия. При сохраненном диурезе почки продолжают выводить калий, несмотря на нарастающий его дефицит.

Основные функции калия в организме:

- ✓ поддержание осмоляльности и объема внутриклеточной жидкости;
- ✓ участие во всех видах обмена и жизнедеятельности каждой клетки организма (утилизация углеводов, синтез и функции белков, ферментов, гормонов, АТФ, фосфокреатинина и др.);
- ✓ формирование трансмембранного электрического потенциала и осуществление процессов поляризации, деполяризации и реполяризации клеточных мембран;

✓ влияние на функциональное состояние сердечно-сосудистой системы, желудочно-кишечного тракта, скелетной мускулатуры и других органов и систем.

Гиперкалиемия – повышение концентрации калия в крови выше 5,2 ммоль/л. Основная причина развития – длительная олигурия или анурия, когда в результате глубокого ослабления или полного блока абсолютно доминирующего пути выведения из организма калия возникает положительный калиевый баланс. Олигурия и анурия могут развиваться при острой и хронической почечной недостаточности, при дегидратации и глубоком гемодинамическом шоке. При этом гиперкалиемия может быть следствием неспособности почек осуществить достаточное выведение из организма либо калия, усваиваемого из пищевых продуктов и поступающего в кровь из тканей в ходе метаболизма, либо калия, высвобождающегося из тканей в массивных количествах (тяжелые механические травмы, обширные ожоги, длительное сдавление, размоложение тканей, гиперосмолярный синдром, электротравма, тяжелая ацидемия и др.). Гиперкалиемия может развиваться при гипоальдостеронизме любого генеза (болезнь Аддисона, интерстициальный нефрит и др.).

Гипокалиемия рассматривается как снижение концентрации калия в крови ниже 3,5 ммоль/л. Основная причина развития – недостаточное поступление либо значительные потери калия организмом.

К непосредственным причинам гипокалиемии относятся:

✓ стеноз верхних отделов пищеварительного тракта, несбалансированное парентеральное питание, адренокортикоидная фаза обмена после операций и травм и любое другое состояние гиперкатаболизма при достаточном диурезе;

✓ длительно повторяющаяся рвота или длительная аспирация желудочного содержимого через зонд, массивные потери кишечных секретов (кишечная непроходимость, хронические фистулы и свищи кишечника, частый прием слабительных, длительные поносы и др.), длительная полиурия любого происхождения, метаболический алкалоз, первичный или вторичный гиперальдостеронизм, повышение в организме уровня глюкокортикоидов.

Гипокалиемия свидетельствует о дефиците в организме калия, однако он не всегда проявляется снижением его concentra-

ции в крови. В условиях декомпенсированного ацидоза (ацидемии) можно говорить о дефиците калия в организме, если его концентрация в плазме крови ниже средней величины нормы, хотя и не выходит за нижнюю границу нормы.

Кальций. Общее содержание кальция в организме взрослого человека со средней массой составляет 1200-2000 г (30-50 тыс. ммоль). Подавляющая часть (99%) сосредоточена в костях скелета и в зубах, небольшая часть (1%) находится во внеклеточной жидкости. Примерно 50% кальция плазмы связано белками, незначительное количество кальция находится в плазме в виде солей органических кислот. Средняя суточная потребность взрослого человека в кальции примерно 1 г (25 ммоль).

Выделяется кальций из организма с калом (70-80%) и мочой (20-30%). Обмен кальция тесно связан с обменом фосфора. Регулируется обмен кальция паратгормоном (уменьшает экскрецию кальция почками и повышает выделение фосфора), тиреокальцитонином (увеличивает экскрецию кальция с мочой), активной формой витамина D (увеличивает реасорбцию кальция в канальцах). Паратгормон в регуляции обмена кальция и фосфора имеет наибольшее значение. Паратгормон, тиреокальцитонин, активный витамин D регулируют обмен кальция и фосфора не только в почках, но и в кишечнике и костях. Кальций может депонироваться в костях и высвобождаться из них. Во внеклеточной жидкости биологически активен только ионизированный кальций. Степень ионизации кальция зависит от рН крови: повышается при ацидозе и снижается при алкалозе.

Основные функции кальция в организме:

- ✓ выполнение роли основного структурного элемента костей;
- ✓ участие в формировании электрических потенциалов клеточных мембран;
- ✓ воздействие на возбудимость и сократимость мышц;
- ✓ влияние на клеточную и сосудистую проницаемость;
- ✓ участие в гемостазе.

Гиперкальциемия (концентрация общего кальция в крови $>2,6$ ммоль/л) наблюдается при гиперпаратиреозе, метастазировании рака в костную ткань, миеломной болезни, лимфоме, саркоидозе, гипертиреозе, гиперкортицизме, гипервитаминозе D.

Гипокальциемия (уровень общего кальция в крови $<2,12$ ммоль/л) развивается при гипопаратиреозе, гипоальбуминемии (наиболее частая причина), панкреатите, острой и хронической почечной недостаточности, стеаторее, беременности, длительной стероидной терапии, гиповитаминозе D.

Магний. Общее содержание магния в организме взрослого человека со средней массой тела составляет 20-28 г (835-1165 ммоль). Примерно 50-60% имеющегося в организме магния сосредоточено в костях. При патологических потерях магния (утрата с кишечным секретом через свищи, при диурезе и др.) или при недостаточном его поступлении в организм (длительное голодание, хронический алкоголизм, обширная резекция тонкого кишечника и др.) треть внутрикостного магния может быть мобилизована и вовлечена в активный обмен.

Подавляющая часть (95-99%) внекостного магния находится в клетках. Магний является типичным внутриклеточным катионом. Во внеклеточной жидкости находится лишь 1-5% внекостного магния. Примерно 60% магния плазмы ионизировано, остальная часть связана белками и в низкомолекулярных комплексах.

Обменный пул магния составляет примерно 0,1 г (4 ммоль) в сутки. Практически весь обменный магний выделяется с мочой. С пищей в сутки в организм поступает около 0,25-0,3 г (10-12 ммоль) магния, из которых примерно 0,1 г усваивается в тонком кишечнике, остальная часть не абсорбируется и выделяется с калом. Ионизированный магний обладает высокой биологической активностью.

Основными функциями магния в организме выступают:

- ✓ депрессивное воздействие на деятельность ЦНС (при значительном повышении содержания магния в крови возникает сонливость, утрата чувствительности, вплоть до глубокого наркоза);
- ✓ снижение нервно-мышечной возбудимости, сократительной деятельности миокарда, тонуса гладких и скелетных мышц;
- ✓ участие в процессах фибринолиза;
- ✓ снижение сосудистого тонуса;
- ✓ участие во многих биохимических реакциях, в том числе и реакциях, ответственных за образование энергии;
- ✓ участие в костеобразовании.

Функции магния тесно взаимосвязаны с функциями кальция, калия и фосфатов. В различных реакциях взаимодействие магния с кальцием может быть как агонистическим, так и антагонистическим. Магний и фосфаты способствуют утилизации клетками калия, их применение резко повышает эффективность коррекции тяжелой калиевой недостаточности препаратами калия.

Гипермагниемия (уровень магния в крови $>1,1$ ммоль/л) развивается при почечной недостаточности, пероральном приеме больших доз магнийсодержащих препаратов, внутривенном введении больших доз сульфата магния.

Гипомагниемия (концентрация магния в крови $<0,8$ ммоль/л) наблюдается при снижении поступления магния в организм, увеличении потерь катиона из организма (частая рвота, продолжительная диарея или назогастральная аспирация, усиленная экскреция магния с мочой в результате длительной интенсификации диуреза).

Анионы

Хлор. Общее содержание хлора в организме взрослого человека со средней массой тела примерно 100 г (2800 ммоль). Практически весь хлор организма ионизирован и находится в виде хлоридов, то есть химических соединений хлора с другими элементами. Когда говорят о хлоридах жидкостей организма, обычно имеют в виду свободные, ионизированные атомы – анионы хлора.

Подавляющая часть (99%) хлоридов находится во внеклеточной жидкости и лишь небольшая их часть (1%) – внутриклеточно. Хлориды являются количественно наиболее значимыми анионами интерстициальной жидкости и плазмы: на их долю приходится 2/3 всех анионов, они определяют 1/3 осмоляльности плазмы, а вместе с натрием – 80%. Суточная потребность взрослого человека в хлоре в среднем 3-4 г (120 ммоль).

Обмен хлора тесно связан с обменом натрия. Поступает этот анион в организм с пищей в основном в составе натрия и калия хлорида. В клетках содержание хлоридов незначительно. В эритроцитах содержание хлора составляет примерно 3 ммоль/л. Почти полностью хлориды выделяются из организма с мочой, незначительная их часть – с калом и потом. В суточной моче содер-

жится примерно 120 ммоль хлоридов. У здорового человека выделение хлоридов с мочой идет параллельно выделению ионов натрия в соотношении, близком к 1:1.

Основные функции, выполняемые хлором в организме:

- ✓ участие в формировании электропотенциалов клеточных мембран;
- ✓ обеспечение практически трети осмоляльности плазмы крови;
- ✓ участие в образовании соляной кислоты желудочного сока;
- ✓ регуляция pH внеклеточной жидкости;
- ✓ участие в обеспечении газотранспортной функции эритроцитов;
- ✓ мощный детоксикационный эффект.

Гиперхлоремия (хлор крови >108 ммоль/л) развивается при передозировке введения растворов натрия хлорида, сгущении крови, уретеросигмостомии.

Гипохлоремия (хлор крови менее <96 ммоль/л) наблюдается при больших утратах хлоридов (рвота, значительные потери кишечных соков, полиурия, фиксация хлора на коллагене воспаленных тканей и др.), а также при выраженном разведении крови безэлектролитной водой (положительный водный баланс, повышенное образование и задержка в организме «чистой» воды).

Гидрокарбонат. Во внеклеточной жидкости гидрокарбонат (бикарбонат, HCO_3^-) представляет собой анион угольной кислоты (H_2CO_3) и составляет примерно 16% всех анионов плазмы и интерстициальной жидкости.

В процессе клеточного дыхания непрерывно образуется углекислота, которая удаляется из организма через легкие. В легкие из тканей она транспортируется в трех формах: в состоянии физического растворения в плазме и в соединении с ее белками (4%), в химической связи с гемоглобином эритроцитов в виде карбаминогемоглобина (8%) и в форме гидрокарбоната (88%). Физически растворенная в интерстициальной жидкости и в плазме углекислота и гидрокарбонат, образующийся из нее, представляют собой буферную систему (смесь слабой кислоты и слабого основания). Эта физико-химическая система (гидрокарбонатный буфер) непосредственно определяет и регулирует величину pH

внечелочной жидкости. Содержание гидрокарбоната в плазме крови характеризует так называемый «щелочной резерв крови», то есть способность крови противостоять кислотной инвазии. Гидрокарбонат является наиболее «подвижным» анионом внечелочной жидкости, а его содержание при самых разнообразных воздействиях на организм быстро изменяется, что обеспечивает возможность стабилизации рН жидкостей. Достигается это быстрыми изменениями элиминации углекислоты легкими и почками.

Физиологическая роль гидрокарбоната заключается в следующем:

- ✓ это форма транспорта углекислоты из тканей в легкие;
- ✓ он является компонентом важнейшей буферной системы, непосредственно определяющей и регулирующей рН крови;
- ✓ представляет собой фактор осмоляльности внечелочной жидкости;
- ✓ является наиболее «подвижным» анионом внечелочной жидкости, способен быстро компенсаторно изменяться при увеличении или уменьшении других ионов.

Повышение концентрации гидрокарбоната в крови наблюдается в следующих случаях:

- ✓ при метаболическом алкалозе (увеличение концентрации гидрокарбоната происходит параллельно с увеличением рН крови);
- ✓ при респираторном ацидозе (рост концентрации гидрокарбоната противоположен уменьшению рН крови).

Снижение концентрации гидрокарбоната в крови развивается:

- ✓ при метаболическом ацидозе (уменьшение концентрации гидрокарбоната совпадает со снижением рН крови);
- ✓ при респираторном алкалозе (уменьшение концентрации гидрокарбоната противоположно увеличению рН крови).

Рост и снижение концентрации гидрокарбоната в крови могут быть как причинными факторами изменения рН крови, так и компенсаторными. Изменения причинных факторов логически совпадают со сдвигами рН крови, при компенсаторных — они противоположны.

Фосфаты – это анионы органических и неорганических соединений фосфора, представляет собой основную форму его содержания в организме. Общее содержание фосфатов у человека составляет 1% от массы тела (500-800 г). Преимущественно находятся в костях (86-88%), значительно меньшая их часть локализована в клетках (13-14%) и во внеклеточной жидкости (до 1%).

Органические фосфаты (в составе нуклеиновых кислот, ко-энзимов, 2,3-ДФГ, АТФ, АДФ, фосфокреатина) являются основными соединениями фосфора в клетках, неорганические фосфаты – во внеклеточной жидкости. Фосфаты – это основные внутриклеточные анионы. Наибольшее влияние на водно-электролитный обмен оказывают неорганические соединения фосфора.

Общая концентрация органического и неорганического фосфора в клетках примерно в 50 раз выше, чем вне клеток. Суточный обмен фосфатов около 1 г (10 ммоль). Обмен фосфатов тесно связан с обменом кальция. Из пищевых продуктов фосфаты всасываются в тонком кишечнике, выводятся из организма в основном почками. Из клубочкового ультрафильтрата экскретируется с мочой до 15% фосфатов (до 90% – реабсорбируется).

Обмен фосфора регулируется в основном паратгормоном, который активирует выведение фосфатов с мочой, а также витамином D, он активирует их всасывание в кишечнике, и инсулином, активирующим перемещение фосфатов в клетки и снижающим их содержание в сыворотке крови.

Физиологическая роль фосфатов заключается в следующем:

- ✓ участие в костеобразовании;
- ✓ участие в углеводно-энергетическом обмене (усвоение клетками глюкозы, накопление и использование энергии через метаболизм АТФ и креатининфосфата);
- ✓ структурные элементы органических веществ;
- ✓ составляющий компонент фосфатного буфера, участвующего в регуляции рН внутриклеточной жидкости и выведении почками ионов водорода с мочой.

Гиперфосфатемия наблюдается при гипопаратиреозе.

Гипофосфатемия характерна для гиперпаратиреоза.

Методы определения электролитов

Методы определения электролитов в биологических жидкостях основаны на физических, химических и физико-химических свойствах химических элементов. В настоящее время относительно распространенными являются методы атомно-спектрального анализа и потенциометрические, с использованием ионоселективных электродов.

Атомно-спектральный анализ

Общим для методов атомно-спектрального анализа является необходимость перевода исследуемого образца из жидкого состояния в состояние «атомного пара», осуществляемое при нагреве пробы до высокой температуры. Образующиеся свободные атомы обладают способностью излучать либо селективно поглощать свет определенных частот или длин волн. После разложения излучения в спектр производится измерение «интенсивности» линий, индивидуальных для каждого элемента. Измеренная «интенсивность», а точнее, эквивалентная ей величина фототока, при использовании фотоэлемента связывается с концентрацией определяемого элемента в пробе. Зависимость аналитического сигнала от концентрации вещества в пробе в спектральных методах анализа устанавливается с использованием стандартных образцов, в которых концентрация определяемого элемента известна.

Пламенная фотометрия

Пламенная фотометрия (атомно-эмиссионная спектроскопия пламени) основана на измерении интенсивности излучения, испускаемого атомами, возбужденными в пламени, после их возвращения в основное состояние. Эмиссионное излучение исследуемого компонента выделяется и детектируется. Концентрацию исследуемого вещества в биологической жидкости определяют путем сравнения интенсивности эмиссионного потока стандартных растворов с интенсивностью эмиссии исследуемых растворов.

В связи с несовершенством некоторых моделей пламенных фотометров и влиянием на интенсивность излучения натрия и калия других электролитов в стандартные растворы вводят, кроме исследуемого вещества, другие компоненты биологических жид-

костей. Это уменьшает величину погрешностей, обусловленных различием состава анализируемого и стандартного растворов. Для компенсации ионного воздействия в стандартные растворы для определения калия в плазме добавляют натрий и кальций. Стандартные растворы для определения натрия в плазме однокомпонентные, так как в плазме крови калия и кальция содержится значительно меньше, чем натрия, и их присутствие практически не влияет на результаты исследования.

Большинство пламенных фотометров предназначены для исследования содержания натрия, калия, а также лития в сыворотке крови. Наличие автоматического диллятора обеспечивает разведение исследуемого материала и соответствующих стандартных растворов до необходимой концентрации. Для калибровки пламенных фотометров используют специально приготовленные для этой цели калибраторы или водные растворы с высоким и низким содержанием натрия и калия. В ходе исследования их разводят до соответствующей концентрации, совместимой с аналитическим диапазоном прибора. В настоящее время методы используются редко.

Атомно-абсорбционная спектрофотометрия (ААС)

ААС основана на измерении поглощения монохроматического пучка света атомами в пламени. Величина поглощенного светового потока пропорциональна числу атомов на пути луча. Метод ААС является более чувствительным по сравнению с пламенной фотометрией и позволяет определять весь спектр электролитов. Как правило, данный метод используют для исследования элементов, содержание которых в образце составляет менее 10^{-6} моль/л. В клинико-диагностических лабораториях данный метод применяется крайне редко в связи с высокой стоимостью аппаратуры.

Потенциометрические методы

Потенциометрические методы основаны на зависимости величины потенциала электрода от состава раствора, в который он погружен. Величина потенциала зависит от состава раствора, концентрации ионов, материала, из которого изготовлен электрод, а также температуры.

Измерить потенциал одного электрода невозможно, однако электродвижущую силу элемента (ЭДС) можно измерить в составе гальванического элемента при участии другого электрода. Электрод, потенциал которого зависит от концентрации ионов в растворе, называется индикаторным, электрод, электрический потенциал которого остается постоянным при измерении ЭДС, – стандартным. Для потенциометрических измерений применяются мембранные индикаторные электроды, обладающие высокой чувствительностью и селективностью к разным катионам и анионам.

Стеклянные ионоселективные электроды. Эти электроды по принципу действия и конструкции напоминают электроды, предназначенные для измерения pH, но отличаются от них по составу стекла. Примером этого вида может служить натриевый электрод. Если обычный pH-электрод чувствителен к ионам натрия только в щелочной среде, то натриевый – в широком диапазоне значений pH.

Ионоселективный анализатор электролитов



Жидкостные ионообменные электроды. Эти электроды называют мембранными, поскольку они содержат жидкий органический ионообменник и тонкую пористую мембрану, обладающую сродством к определенным соединениям. При взаимодействии катиона с данной мембраной возникает потенциал, величина которого зависит от концентрации катиона в исследуемой жидкости. При проведении потенциометрических измерений необходимо строго соблюдать определенные условия проведения анализа. Ионная сила раствора, рН, температура при этом должны быть строго стандартизированы.

Различают два типа потенциометрических методов с использованием ионоселективных электродов (ИСЭ) – прямые и непрямые. В непрямых методах исследуемый образец смешивается с достаточно большим объемом растворителя с высокой ионной силой, в прямых методах образец реагирует с электродами без предварительного разведения.

Прямые методы характеризуются существенным преимуществом в скорости исследования. Кроме того, при их проведении химический состав образца не меняется и может быть использован для определения других компонентов (глюкозы, молочной кислоты, мочевины).

ЛАБОРАТОРНЫЕ МЕТОДЫ ОЦЕНКИ МЕТАБОЛИЗМА ЖЕЛЕЗА

Метаболизм железа в организме

Железо является необходимым биохимическим компонентом в ключевых процессах метаболизма, роста и пролиферации клеток. Исключительная роль железа определяется важными биологическими функциями белков, в состав которых входит этот биометалл.

К наиболее известным железосодержащим белкам относятся гемоглобин и миоглобин. Кроме того, железо находится в составе значительного количества ферментов, участвующих в процессах энергообразования (цитохромы), в биосинтезе ДНК и делении клеток, детоксикации продуктов эндогенного распада, нейтрализующих активные формы кислорода (пероксидазы, цитохромоксидазы, каталазы). Установлена роль железосодержащих белков (ферритин) в реализации клеточного иммунитета, регуляции кроветворения. Вместе с тем железо может быть исключительно токсичным элементом, если присутствует в организме в повышенных концентрациях. Потенциальная токсичность свободного двухвалентного железа (Fe^{2+}) объясняется его способностью запускать цепные свободнорадикальные реакции, приводящие к перекисному окислению липидов биологических мембран и токсическому повреждению белков и нуклеиновых кислот. Общее количество железа в организме здорового человека составляет 3,5-5,0 г.

Обмен железа в организме состоит из нескольких этапов:

- всасывание в желудочно-кишечном тракте;
- транспорт;
- внутриклеточный метаболизм и депонирование;
- утилизация и реутилизация;
- экскреция из организма.

Всасывание железа

Основным местом всасывания железа в организме является тонкий кишечник. Железо в пище содержится в форме Fe^{3+} , но лучше всасывается в двухвалентной форме. При нарушении функции желудка абсорбция железа в кишечнике ухудшается. До 90% железа всасывается в двенадцатиперстной кишке. При дефи-

ците железа зона всасывания расширяется, захватывая слизистую верхнего отдела подвздошной кишки.

Известно несколько специфических белков, содержащихся в энтероцитах, способствующих всасыванию железа: мобилферрин, интегрин и ферроредуктаза. На мембране между энтероцитом и капилляром присутствует специфический переносчик двухвалентных катионов (*divalent cation transporter 1, DCT 1*), связывающий Fe^{2+} . Данный белок синтезируется только в криптах двенадцатиперстной кишки. При сидеропении его синтез увеличивается, что приводит к росту скорости всасывания алиментарного железа.

Транспорт железа в крови

Железо в сосудистом русле соединяется с трансферрином, связывающим две молекулы Fe^{3+} . В физиологических условиях и при дефиците железа только трансферрин важен как железотранспортирующий белок. Неспецифическое связывание железа с другими транспортными белками, в частности с альбумином, наблюдается при перегрузке железом при высоком уровне насыщения трансферрина.

Биологическая функция трансферрина заключается в его способности легко образовывать диссоциирующие комплексы с железом, что обеспечивает создание нетоксического его пула в кровотоке, который доступен и позволяет распределять и депонировать железо в организме. Металлосвязывающий участок молекулы трансферрина не является строго специфичным для железа. Трансферрин может связывать также хром, медь, магний и кобальт.

Основной источник сывороточного железа – его поступление из ретикулоэндотелиальной системы (печень, селезенка), где происходит распад старых эритроцитов и утилизация освобождающегося железа. Небольшое количество железа поступает в кровь при абсорбции его в тонком кишечнике. В норме только треть трансферрина насыщена железом.

Внутриклеточный метаболизм

Большинство клеток организма содержат на мембранах рецепторы к трансферрину, которые необходимы для поступления

железа в клетку. Трансферриновый рецептор представляет собой трансмембранный гликопротеин, состоящий из двух идентичных полипептидных цепей, связанных дисульфидными мостиками.

Комплекс Fe^{3+} -трансферрин попадает в клетки с помощью эндоцитоза. После этого ионы железа освобождаются, а комплекс трансферрин-рецептор расщепляется, в результате чего рецепторы и трансферрин независимо друг от друга возвращаются на поверхность клетки (рис. 20).

Внутриклеточный свободный пул железа играет важную роль в регуляции пролиферации клетки, синтезе гемоглобина, экспрессии трансферриновых рецепторов, синтезе активных радикалов кислорода и др. Неиспользуемая часть железа хранится внутриклеточно в молекуле ферритина в нетоксичной форме.

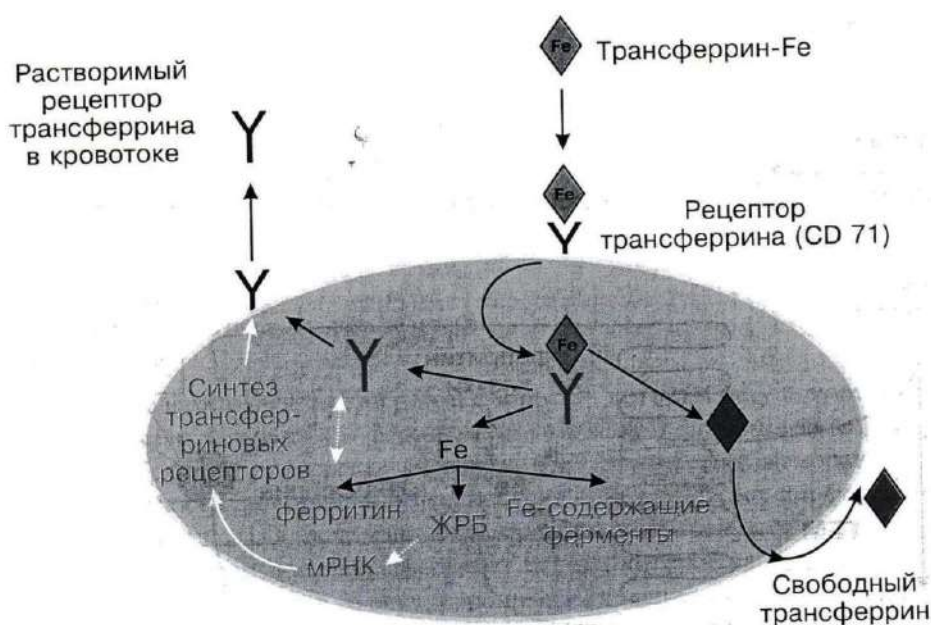


Рисунок 20. – Схема взаимодействия внутри- и внеклеточного пулов железа

Экспрессия трансферриновых рецепторов (CD 71) зависит от потребности клетки в железе. Определенная часть рецепторов к трансферрину в виде мономеров сбрасывается клеткой в сосудистое русло, образуя растворимые трансферриновые рецепторы, способные связывать данный белок. При перегрузке железом число клеточных и растворимых рецепторов к трансферрину снижается. При сидеропении лишенная железа клетка реагирует повышенной экспрессией трансферриновых рецепторов на своей

мембране, увеличением растворимых трансферриновых рецепторов и снижением количества внутриклеточного ферритина.

Депонирование железа в организме

Основные формы депонированного железа в организме – **ферритин и гемосидерин**, которые связывают избыток железа и откладываются во многих органах, но особо интенсивно – в печени, селезенке, мышцах и костном мозге.

Ферритин представляет собой комплекс, состоящий из гидрата закиси Fe^{3+} и белка апоферритина, имеет полукристаллическую структуру (рис. 21). Апоферритин покрывает в виде оболочки ядро из гидроксифосфата железа. Ферритин содержит около 15-20% общего железа в организме. Железо высвобождается из данного белка в двухвалентной форме.

Ферритин локализуется преимущественно внутриклеточно, где играет важную роль в кратковременном и длительном депонировании железа, регуляции клеточного метаболизма и детоксикации избытка железа. Основными источниками сывороточного ферритина являются моноциты, макрофаги печени (клетки Купфера) и селезенки.

Ферритин, циркулирующий в крови, практически не участвует в депонировании железа, но концентрация ферритина в сыворотке в физиологических условиях прямо коррелирует с количеством железа, депонированного в организме. В этой связи в клинике ферритин должен использоваться в первую очередь как параметр, оценивающий депонированное железо.

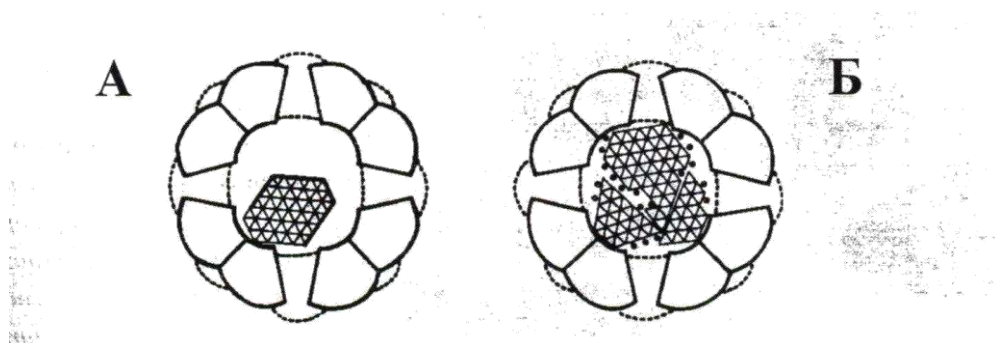


Рисунок 21. – Молекулы ферритина (А – молекула содержит единственный кристалл FeO(OH) ; Б – молекула, заполненная кристаллами FeO(OH))

Гемосидерин по структуре практически не отличается от ферритина и представляет собой данный белок в макрофаге в аморфном состоянии. После того как макрофаг поглощает молекулы железа, сразу же начинается синтез апоферритина, который накапливается в цитоплазме, связывает железо, образуя ферритин. Макрофаг насыщается железом приблизительно в течение 4 ч, после чего в условиях перегрузки железом в цитоплазме молекулы ферритина агрегируют в мембранно-связанные частицы, известные как сидеросомы. В сидеросомах молекулы ферритина кристаллизуются, формируется гемосидерин.

Гемосидерин находится в лизосомах и включает комплекс, состоящий из ферритина, окисленных остатков липидов и других компонентов. В отличие от ферритина, гемосидерин не растворяется в воде, поэтому его железо практически не подлежит мобилизации и почти не используется организмом.

Выведение железа из организма

За сутки из организма мужчины теряется около 1 мг железа с мочой, потом, при стрижке ногтей, волос, слущивающимся эпителием кожи.

У женщин наибольшая потеря железа происходит с менструацией. В среднем потеря крови за одну менструацию составляет около 30 мл, что соответствует 15 мг железа. Исходя из этого, суточная потребность в железе у женщин детородного возраста увеличивается до 2-4 мг в зависимости от объема кровопотери.

Таблица 26. – Показатели обмена железа

Показатель	Референтные значения
Сывороточное железо	Муж. – 11,6-31,3 мкмоль/л; Жен. – 9-30,4 мкмоль/л
ОЖСС	46-90 мкмоль/л
Трансферрин	23-45 мкмоль/л
Насыщение трансферрина железом	15-45%
Ферритин	Муж. – 15-200 мкг/л; Жен. – 12-150 мкг/л

В настоящее время наиболее адекватными лабораторными тестами для оценки дефицита железа в организме признаны

определение в сыворотке крови содержания железа и ферритина, её общей железосвязывающей способности (ОЖСС), трансферрина и уровня насыщения трансферрина железом (табл. 26).

Нарушения обмена железа

Нарушение обмена железа проявляется в увеличении или уменьшении содержания его в организме, а также в задержке восстановления трехвалентного железа в двухвалентное.

Увеличение содержания железа в организме может происходить как экзогенно, так и эндогенно. Экзогенно железо попадает в организм при некоторых профессиональных заболеваниях (у шахтеров, электросварщиков), при боевых и бытовых травмах. Металлическое железо, попав в организм, может откладываться там в виде окислов трехвалентного железа. В этом случае возникает сидероз легких, глазного яблока и др.

Второй путь накопления железа в организме – эндогенный – наблюдается:

- 1) при кровоизлияниях, гемолизе (железо освобождается из эритроцитов);
- 2) при нарушении использования организмом железа (гиперхромные анемии);
- 3) при нарушении транспорта железа белками сыворотки крови.

Железо может накапливаться в организме в виде пигмента ржаво-коричневого цвета – гемосидерина. Он представляет собой белковый комплекс коллоидной окиси железа. Последствия накопления железа и гемосидерина в организме – гемосидероз, гемохроматоз, а также нарушение процессов окостенения.

Гемосидероз – это состояние, проявляющееся отложением железосодержащего пигмента гемосидерина главным образом в макрофагальных клетках печени, селезенки, костном мозге, а также в паренхиматозных органах: печени, почках, лимфатических узлах и др. Гемосидероз возникает при попадании эритроцитов или свободного гемоглобина в цитоплазму клеток ретикулоэндотелиальной системы и лимфатических узлов, а также при

внеклеточном разрушении эритроцитов вследствие кровоизлияния и гемолиза.

Гемохроматоз. В отличие от гемосидероза, характеризуется окраской кожи в бронзовый цвет, внутренних органов – в коричневый (меланодермия), а также циррозом печени и сахарным диабетом. При гемохроматозе гемосидерин откладывается в тканях и органах вместе с не содержащим железа пигментом гемофусцином. Вследствие отложения пигмента в клетках паренхиматозных органов нарушаются обменные процессы, происходит разрастание соединительной ткани и склерозирование органов (печень, поджелудочная железа и др.). В поджелудочной железе наряду с дегенеративными изменениями отмечаются также инкреторные изменения, что ведет к развитию сахарного или бронзового диабета. Гемохроматоз наблюдается не только при кровоизлияниях и гемолизе, но и при расстройствах обмена железа в клетках, например вследствие нарушения транспорта железа белками крови или под влиянием хронической интоксикации (алкоголь, мышьяк, свинец, медь), при кахексиях разного происхождения.

Нарушение процессов окостенения. При избытке железа в организме оно начинает откладываться в костях. Данный микроэлемент является конкурентом кальция за места в кристаллической решетке костной ткани. Оба элемента влияют на цитохромоксидазу и играют важную роль в метаболизме остеобласта. Железо наряду с кальцием и фосфором откладывается в местах эндохондрального и периостального костеобразования.

Уменьшение содержания железа в организме развивается по следующим причинам:

1. Недостаточное поступление железа в организм с пищей.
2. Нарушение всасывания железа из желудочно-кишечного тракта:
 - ✓ дефицит соляной кислоты, которая диссоциирует соединения железа, поступающего в желудок;
 - ✓ отсутствие восстановителей, которые превращают трехвалентное железо в более усвояемую двухвалентную форму;
 - ✓ нарушение образования ферритина в слизистой оболочке кишечника, который способствует всасыванию железа из желудочно-кишечного тракта;

- ✓ функциональные и органические расстройства желудочно-кишечного тракта (ахилия, энтериты);
- ✓ дефицит кобальта, который способствует более быстрому переходу депонированного железа в состав гемоглобина эритроцитов.

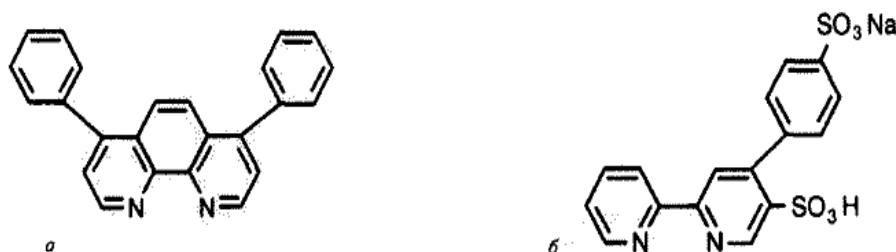
К последствиям дефицита железа в организме относятся железодефицитная анемия и гипосидероз.

Методы определения показателей метаболизма железа

Методы определения сывороточного железа

Для определения железа в сыворотке может быть использован ряд методов.

Первую группу составляют методы, основанные на способности железа образовывать комплексы с хелатирующими соединениями. Они включают одну общую реакцию, в ходе которой при снижении рН сыворотки крови железо вытесняется из трансферрина.

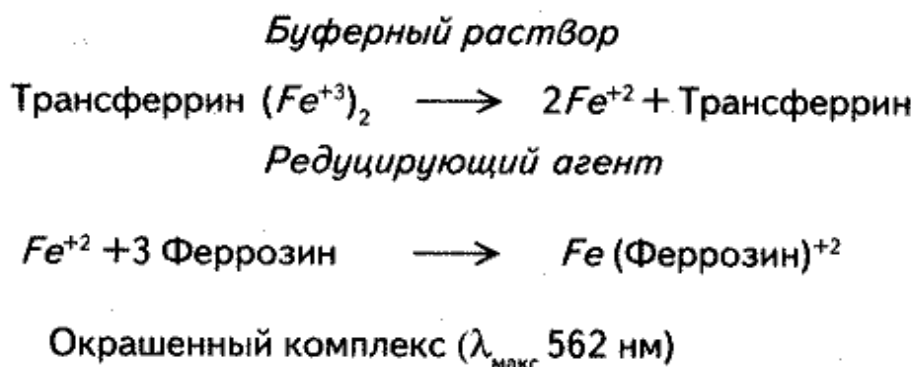


Структурные формулы батофенантролина (а) и феррозина (б)

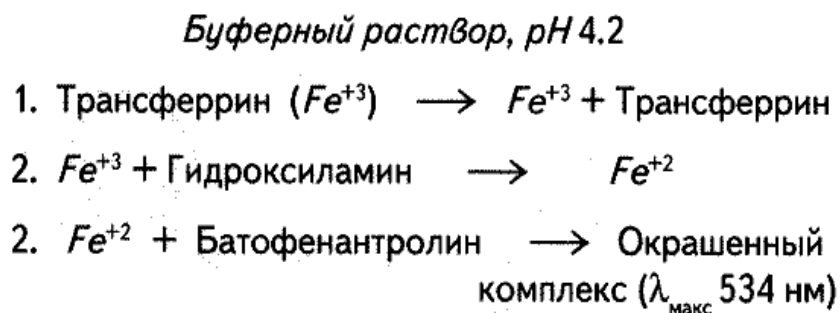
Рисунок 22. – Виды хромогенов для определения железа в сыворотке

При участии сильных редуцирующих агентов, в частности, гидразина, аскорбиновой кислоты, тиогликолевой кислоты или гидроксиламина, ион железа Fe^{3+} превращается в Fe^{2+} и образует комплекс с соединениями, содержащими группировку $-\text{N}=\text{C}-\text{C}=\text{N}-$. Комплекс железо-хромоген обладает высоким значением коэффициента молярного поглощения. Широкое распространение в качестве хромогенов получили батофенантролин и феррозин (рис. 22).

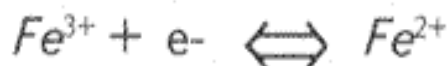
Реакция протекает по следующей схеме:



Для автоанализаторов разработан метод с использованием батофенантролина:



К другой группе относится электрохимический метод. Как и в фотометрических методах, железо сначала вытесняет из комплекса железо-трансферрин путем обработки образца спиртовым раствором соляной кислоты. Перемещение электронов от Fe^{2+} к Fe^{3+} вызывает ток, регистрируемый с помощью электрода, его величину соотносят с общей концентрацией железа:



При использовании атомно-абсорбционной спектроскопии содержащееся в исследуемом образце железо связывают с батофенантролином и образовавшийся комплекс экстрагируют органическим растворителем. Содержание железа в экстракте опре-

деляют с использованием атомно-абсорбционного спектрофотометра при длине волны 248 нм.

Методы, использующие феррозин или другие железохелатирующие агенты, дают более высокие значения по сравнению с батофенантролиновым методом.

Содержание железа редко определяют в моче, ее чаще используют для определения гемосидерина. Данный белок, связывающий железо, может появиться в моче в виде желто-коричневых гранул.

Определение общей железосвязывающей способности сыворотки (ОЖСС)

Кроме исследования железа сыворотки для оценки его метаболизма в организме определяется железосвязывающая способность сыворотки. В норме примерно треть трансферрина насыщена железом.

Под ***общей железосвязывающей способностью сыворотки крови*** подразумевается не абсолютное количество трансферрина, а количество железа (в микромолях), которое может связываться с трансферрином (в 1 л сыворотки) для максимального его насыщения.

Для определения ***ненасыщенной, или латентной, железосвязывающей способности*** вычитают количество железа сыворотки крови из общей железосвязывающей способности.

Еще один производный показатель – ***коэффициент насыщения трансферрина железом***. Он представляет собой процентное соотношение железа сыворотки крови и ее общей железосвязывающей способности.

Для железодефицитной анемии характерны увеличение общей железосвязывающей способности сыворотки крови, значительное увеличение латентной железосвязывающей способности и резкое снижение процента насыщения трансферрина. Считается, что определение общей железосвязывающей способности в какой-то мере дает возможность оценить запасы железа в организме. Вместе с тем исследование содержания сывороточного железа и железосвязывающей способности сыворотки не всегда отражает актуальные запасы железа в организме.

Десфераловый тест

Для оценки запасов железа может быть использован ***десфераловый тест***. Десферал (десфероксамин) – комплекс, избирательно выводящий из организма ионы железа. Он представляет собой продукт метаболизма актиномицетов *Streptomyces pilisus*.

В настоящее время известно, что источником железа, входящего в комплекс с десфералом, не может быть ни гемоглобин, ни трансферрин. Имеется определенный параллелизм между содержанием железа в запасах в виде ферритина и гемосидерина и количеством железа, выделяемого с мочой после введения десферала.

Для определения запасов железа пациенту вводится 500 мг десферала, после чего определяется содержание железа в суточной моче. В норме за сутки выводится *0,8-1,3 мг железа*. У пациентов с железodefицитной анемией содержание железа в моче после введения десферала значительно меньше.

Следет помнить, что точного соответствия между запасами железа и содержанием его в моче после введения десферала не существует. При проведении десфералового теста необходимо учитывать тот факт, что выделение железа с мочой отражает не только запасы его в организме, но и степень активности эритропоэза и распада эритроцитов.

Определение трансферрина сыворотки крови

В настоящее время для определения концентрации трансферрина в сыворотке крови используются разные варианты иммунохимических тестов. В частности, для количественного анализа данного белка применяется *турбидиметрический метод*. Анти-тела к трансферрину при смешивании с исследуемым материалом, содержащим его, формируют нерастворимые комплексы. Эти комплексы вызывают изменение абсорбции, зависящее от концентрации трансферрина в исследуемых образцах.

Молекула трансферрина состоит из трех структурных доменов: полипептидной цепи, двух независимых сайтов связывания ионов железа и двух комплексов N-гликанов. Все три домена характеризуются сильной вариабельностью, обеспечивая существенную микрогетерогенность молекул трансферрина. В частности, для диагностики хронического алкоголизма наибольшее зна-

чение имеет вариабельность молекул трансферрина по структуре цепей N-гликанов. Цепочки N-гликанов молекул трансферрина могут различаться по степени разветвления, формируя би-, три- и тетра-антенны. Каждая антенна может заканчиваться молекулой сиаловой кислоты, несущей отрицательный заряд. В зависимости от количества остатков сиаловой кислоты, связанных с антеннами углеводных цепей, в сыворотке крови человека обнаруживают до 9 вариантов (изоформ) трансферрина, начиная от асиало- и заканчивая октасиалотрансферрином.

При злоупотреблении алкоголем гликозилирование трансферрина нарушается, что приводит к изменению процентного соотношения его изоформ в сторону повышения уровня низкосиалированных вариантов, называемых также карбогидрат-дефицитными, или CDT.

Определение растворимых рецепторов трансферрина (sTfR) в крови

Транспорт железа в клетку происходит при взаимодействии комплекса железо-трансферрин со специфическим цитоплазматическим рецептором (TfR).

TfR состоит из двух трансмембранных полипептидных цепей. Молекула трансферрина, несущая до двух атомов железа, присоединяется к внешнему, экстрацеллюлярному концу TfR, после чего поглощается клеткой путем эндоцитоза. В сформированной везикуле происходит изменение pH, железо меняет степень окисления (с Fe^{3+} на Fe^{2+}), в дальнейшем используется для синтеза гемоглобина или сохраняется в депонированной форме. Белковая часть трансферрина, освободившись от железа, вместе с TfR выходит на поверхность клетки, где апотрансферрин отделяется и весь цикл повторяется. При повышенной потребности в железе цикл ускоряется и мембранная экспрессия TfR возрастает. При этом внешняя (внеклеточная) часть TfR подвергается расщеплению экстрацеллюлярными протеазами. В результате воздействия протеаз от TfR отделяется и попадает в кровь довольно стабильный фрагмент, называемый *растворимым рецептором трансферрина (sTfR)*.

Примерно 80% TfR находится на плазматической мембране эритропоэтических клеток. Кроме того, наличие TfR выявлено на

клетках плаценты, лимфоцитах и на некоторых опухолевых клетках. Плотность TfR на поверхности клеток-предшественников эритроцитов повышается по мере дифференцировки вплоть до ретикулоцита, однако на поверхности зрелого эритроцита TfR не обнаружено.

Мониторинг уровня sTfR позволяет определить эффективность применения эритропоэтина. Обычно при соответствующей стимуляции эритропоэтической системы sTfR начинает повышаться. При локальном дефиците железа уровни ферритина и sTfR изменяются разнонаправленно: ферритин снижается, а sTfR повышается. При повышении ферритина при хронических воспалениях, а также опухолях эффективную потребность железа можно оценить только при определении концентрации sTfR.

Для определения концентрации растворимого трансферринового рецептора в крови используются разные варианты иммунохимических методов исследования (ИФА и др.).

Определение ферритина сыворотки крови

Несмотря на то, что ферритин – это белок, содержащийся в тканях, он может появляться в сыворотке крови при ряде состояний (поражения печени и др.). Благодаря разработке иммунохимических методов определения ферритина было доказано, что он имеется в определенном количестве в сыворотке крови у всех здоровых людей. При определении ферритина сыворотки данными методами используются меченные к нему или меченный ферритин.

Метод определения ферритина сыворотки крови в настоящее время является одним из оптимальных способов исследования запасов железа в организме. В то же время содержание ферритина в сыворотке крови не всегда отражает запасы железа, а зависит также от скорости освобождения ферритина из тканей.

ЛАБОРАТОРНАЯ ОЦЕНКА СИСТЕМЫ ГЕМОСТАЗА

Гемостаз – это система организма, обеспечивающая, с одной стороны, сохранение крови в кровеносном русле в жидком состоянии в норме, а с другой – остановку кровотечения при повреждении сосудистой стенки.

Органы и ткани, участвующие в реализации этих функций, составляют систему гемостаза. Элементы системы гемостаза участвуют также в таких важных процессах, как воспаление, репарация тканей, поддержание гомеостаза и др.

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

Морфологические компоненты:

- ✓ Сосудистая стенка.
- ✓ Клеточные элементы крови (прежде всего тромбоциты).
- ✓ Плазменные компоненты (белки и небелковые медиаторы гемостаза, цитокины, а также гормоны).

✓ Костный мозг, печень, селезенку также можно отнести к этой группе, так как в них синтезируются и тромбоциты, и плазменные компоненты системы гемостаза.

Функциональные компоненты:

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

На систему гемостаза оказывают влияние как физиологические, так и патологические факторы. К последним относятся бактериальные токсины, яды животных, протеолитические ферменты, в физиологических условиях отсутствующие или имеющиеся в крови в незначительных концентрациях, а также некоторые лекарственные препараты.

Активность отдельных компонентов системы гемостаза может изменяться в широких пределах из-за генетических особенностей или экзогенных воздействий на организм. Взаимодействие компонентов гемостаза организовано серией механизмов «прямой» и «обратной» связи, которые обеспечивают

жидкое состояние крови и циркуляцию ее в сосудах в течение всей жизни человека.

При относительно низкой или высокой активности отдельного элемента общая интегрирующая активность гемостаза может оставаться физиологической за счет компенсаторного изменения других компонентов системы. Сохранение общей активности гемостаза в физиологических пределах обеспечивает поддержание гомеостатического баланса в организме (рис. 23).



Рисунок 23. – Схема гемостатического баланса в организме

При его смещении за рамки физиологических норм возникают условия для развития кровотечений или тромбозов.

Система гемостаза включает:

1. Сосудисто-тромбоцитарное звено (первичный гемостаз).
2. Коагуляционное звено (вторичный гемостаз).
3. Фибринолиз.

Этапы гемостаза

Сосудисто-тромбоцитарное звено

Сосуды и ткани:

- капилляры, артериолы, венулы спазмируются в ответ на выделение сосудосуживающих субстанций, таких как серотонин, адреналин, норадреналин;
- сосуды большого и среднего калибра – рефлекторный спазм;
- эндотелий сосудов в неповрежденном виде обладает антикоагуляционными свойствами (гепариноиды на поверхности эндотелия), а при повреждении становится мощным прокоагулянтом.

Морфологические элементы крови:

- тромбоциты;
- эритроциты;
- лейкоциты.

Остановка кровотечения при повреждении сосудистой стенки начинается с сосудисто-тромбоцитарных реакций. Уже через доли секунд после травмы в зоне повреждения наблюдается спазм сосудов и развивается цепь реакций кровяных пластинок, которая приводит к образованию тромбоцитарной пробки. Прежде всего, происходит прилипание (*адгезия*) тромбоцитов к коллагеновым волокнам, находящимся в поврежденной сосудистой стенке, к другим адгезивным белкам субэндотелия, а также к поступающему из плазмы фибриногену. Из адгезировавших тромбоцитов высвобождается аденозиндифосфат (ADP).

Под влиянием ADP циркулирующие тромбоциты присоединяются к уже фиксированным на раневой поверхности и друг к другу (*агрегация*). Процесс агрегации вызывается также активными субстанциями, которые высвобождаются в области повреждения не только из стимулированных при адгезии тромбоцитов, но и из форменных элементов крови и эндотелия. Агрегация индуцируется и первыми малыми количествами тромбина, генерируемого по внешнему и внутреннему пути коагуляции. В результате в процесс вовлекается все большее число тромбоцитов, поступающих в зону повреждения. Однако на данной стадии, опре-

деляемой как стадия обратимой или первичной агрегации, связи между тромбоцитами еще не прочные, и часть из них может отрываться током крови.

Позже на стадии необратимой (вторичной агрегации) агрегаты уплотняются, становятся непроницаемыми для крови и плотно закрывают имеющийся дефект в сосудах малого и среднего размера. Таким образом, осуществляется первичный гемостаз, т.е. ранняя остановка кровотечения за счет спазма сосудов и образования тромбоцитарного тромба.

В фазе адгезии прилипание кровяных пластинок к субэндотелиальным структурам, прежде всего к коллагену, различается по своему механизму в зонах циркуляции с малой и большой скоростью тока крови. При низком напряжении сдвига (в случае повреждения стенок крупных артерий, вен) тромбоциты присоединяются к коллагену непосредственно через коллагеновые рецепторы их плазматической мембраны. При высоком напряжении сдвига (при повреждении мелких артерий и артериол) прилипание кровяных пластинок к коллагену опосредовано высокомолекулярным кофактором адгезии – фактором Виллебранда (vWF), который поступает из плазмы.

Следующей стадией тромбоцитарных гемостатических превращений является первичная адгезия, которая представляет собой результат последовательных реакций активации кровяных пластинок в зоне повреждения. Тромбоциты могут активироваться при действии на их поверхность гемодинамических сил, возникающих при турбулентном токе или при повышении скорости движения крови в местах сужения просвета сосуда. Кроме того, кровяные пластинки активируются при действии на них ряда растворимых естественных агонистов, которые присутствуют в зоне повреждения. Данные вещества разделяют на сильные и слабые, отличающиеся по механизму вызываемых ими реакций активации. К сильным агонистам относят коллаген и тромбин в больших количествах. Для осуществления их стимулирующего действия не нужны дополнительные линии усиления активации. Для эффекта слабых агрегирующих агентов, т.е. всех остальных естественных агонистов при больших и средних дозах (а также сильных агонистов в малых дозах) необходимы эти сложные обратные пути активации.

Первичная агрегация представляет собой одну из начальных стадий в цепи гемостатических реакций тромбоцитов и не способна обеспечить эффективный гемостаз. Изменения, вызываемые в плазматической мембране при взаимодействии рецепторов с экзогенными слабыми агонистами, при контакте мембран в процессе первичной агрегации и связи их с фибриногеном, в результате последующего начального повышения уровня свободного ионизированного цитоплазматического кальция (Ca^{2+}) приводят к активации мембранной фосфолипазы A2 (PLA2). PLA2 в свою очередь индуцирует цепь реакций простагландин-тромбоксановой системы, которая начинается с высвобождения арахидоновой кислоты из мембранных фосфолипидов и завершается образованием таких активных продуктов, как лабильные простагландины (PGG2, PGH2) и тромбоксан A2 (TXA2). Последний является вазоконстриктором и эндогенным агонистом агрегации. Повышение концентрации Ca^{2+} создает необходимые условия для всех опосредованных ферментных реакций финальных стадий тромбоцитарного гемостаза.

Тромбоцитарные секреторные реакции имеют большое значение для завершения эффективного гемостаза. Сокращение актомиозина обеспечивает передвижение гранул хранения, контакт их мембран с мембранами открытой канальцевой (OCS) и плазматической систем, а также повышение внутриклеточного давления и выброс содержимого этих гранул в окружающую среду. Из 8 гранул (плотных телец) высвобождаются гемостатически активные субстанции, необходимые для усиления активации и агрегации тромбоцитов в зоне сосудистого повреждения. Через секрецию ADP, серотонина, адреналина после их связи с соответствующими мембранными рецепторами пластинок реализуется важнейшая вторая положительная обратная связь, которая вместе с первой делает возможной развитие вторичной агрегации при действии слабых агонистов.

Фазу необратимой агрегации называют также фазой секреции и необратимой вторичной агрегации, т.к. секреторные реакции достигают в это время своей кульминации и являются основой развития этой фазы агрегации. О значении фазы секреции может свидетельствовать нередко наблюдаемая и приводящая к кровоточивости недостаточность секреторного процесса, которая

особо часто бывает приобретенной, т.е. возникает в результате инфекционных, токсических, лекарственных, иммунных, радиационных воздействий.

Среди тромбоцитопатий высвобождения выделяют: функциональную тромбоцитопатию высвобождения при нарушении внутриклеточной передачи сигнала активации, и структурную, связанную с неполноценностью гранул хранения. О снижении или отсутствии секреции свидетельствует уменьшение или отсутствие второй волны агрегации с оптимальными средними дозами всех агрегирующих агентов и единственной волны агрегации с коллагеном, т.к. эти агрегационные феномены опосредованы секреторным процессом.

Коагуляционное звено

Процесс свертывания крови важен для окончательного гемостаза, обеспечиваемого образованием вторичной гемостатической пробки. В этом процессе принимают участие факторы свертывания крови.

Фактор I (фибриноген) – белок, который синтезируется в печени. Концентрация фибриногена в крови составляет 2-4 г/л. Уменьшение его концентрации в крови менее 1 г/л угрожает пациенту кровотечением.

Фактор II (протромбин) – гликопротеид, синтезируется в печени. Для синтеза этого фактора необходим витамин К. В результате воздействия на него мультиферментного комплекса протромбиназы образуется ключевой фермент гемостаза – тромбин. Тромбин превращает фибриноген в фибрин, чем обеспечивает образование тромба.

Фактор III (тканевой фактор) – рецепторный белок мембраны клеток, находится во всех органах и тканях организма, в том числе и в эндотелии сосудов. Является рецептором для VII фактора и обеспечивает активацию гемостаза.

Фактор IV (кальций) – участвует во всех этапах коагуляционного гемостаза.

Фактор V (проакцелерин) – синтезируется в печени, принимает участие в активации протромбина, являясь частью мультиферментного комплекса протромбиназы.

Фактор VI/VII (проконвертин/ конвертин) – витамин К зависимый белок, синтезирующийся в печени. Около 1% циркулирует в крови в активной форме VIIa. VIIa на поверхности поврежденного эндотелия образует комплекс с тканевым фактором (ТФ), который в свою очередь активирует фХ, таким образом обеспечивая генерацию микроколичеств тромбина, что играет ключевую роль в усилении процесса свертывания крови.

Факторы VIII, IX, XI являются антигемофильными факторами. Активированные факторы VIIIa и IXa на фосфолипидной поверхности мембран образуют теназный комплекс (от английского слова *ten* – десять), который образует главный компонент протромбиназы – фактор Ха.

Фактор X (фактор Стюарта) является ключевым энзимом протромбиназы, которая трансформирует протромбин в тромбин.

Фактор XII (фактор Хагемана) – фактор контакта. Дефицит этого фактора обычно клинически не проявляется.

Фактор XIII – фибрин-стабилизирующий фактор. Образует Д=Д связи в нестабильном полимере фибрина, что стабилизирует последний.

В интактном сосуде факторы свертывания крови циркулируют в неактивной форме в виде проферментов сериновых протеаз. Повреждение сосудистой стенки вызывает цепь протеолитических процессов, в которых факторы свертывания трансформируются в активную форму (а), а скорость их образования определяется активностью процессов свертывания (рис. 24).

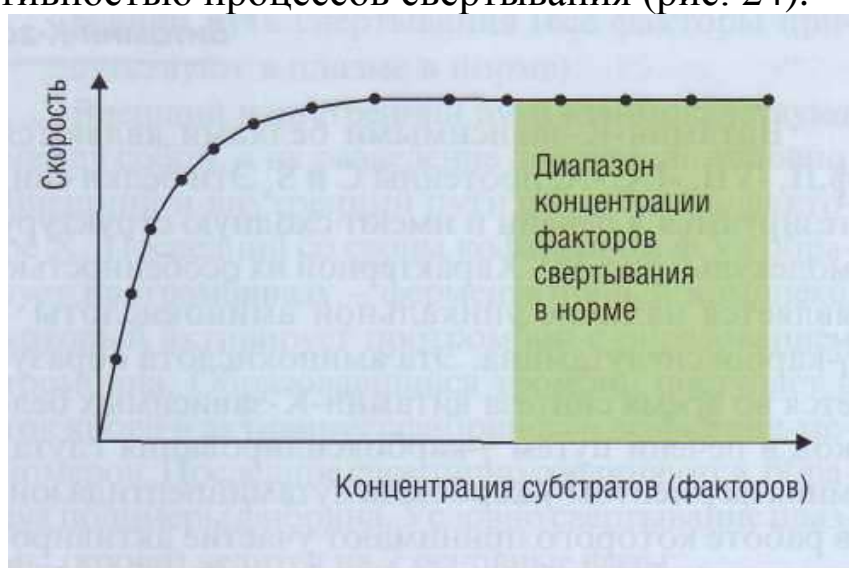


Рисунок 24. – Взаимосвязь между содержанием факторов свертывания и скоростью коагуляции

Процесс свертывания крови представляет собой каскадную реакцию, которая начинается с первичного стимула и усиливается на каждой последующей стадии. В результате образуется большое количество конечного фермента – тромбина – который превращает фибриноген в фибрин (рис. 25).



Рисунок 25. – Схема каскадной активации свертывания крови

Фибрин стабилизирует первичный тромбоцитарный тромб и способствует окончательному гемостазу. Кроме того, тромбин играет важную роль в качестве главного регуляторного фермента свертывания крови с помощью ряда реакций положительной и отрицательной обратной связи. В физиологических условиях тромбин генерируется быстро и только в месте повреждения сосудистой стенки.

Как на внешнем, так и на внутреннем пути коагуляционного гемостаза активация факторов свертывания происходит на фосфолипидных мембранах поврежденных клеток или активированных тромбоцитов, играющих роль матриц, где формируются протеазные комплексы.

Кроме ускорения активации, формирование связанных с мембраной ферментных комплексов способствует регулированию процесса свертывания посредством защиты активированных протеаз от циркулирующих ингибиторов. В каждом из этих путей

выделяют внешний и внутренний путь генерации Ха и общий путь коагуляции.

При активации процесса свертывания крови по внешнему пути роль фосфолипидной матрицы выполняет тканевый фактор (тканевый тромбопластин), в состав которого входит апопротеин III и фосфолипид. Тканевый тромбопластин высвобождается из поврежденных тканей, в том числе из стенки сосуда, в виде липопротеидных осколков клеточных мембран, то есть поступает в кровь извне, отсюда и название – внешний путь.

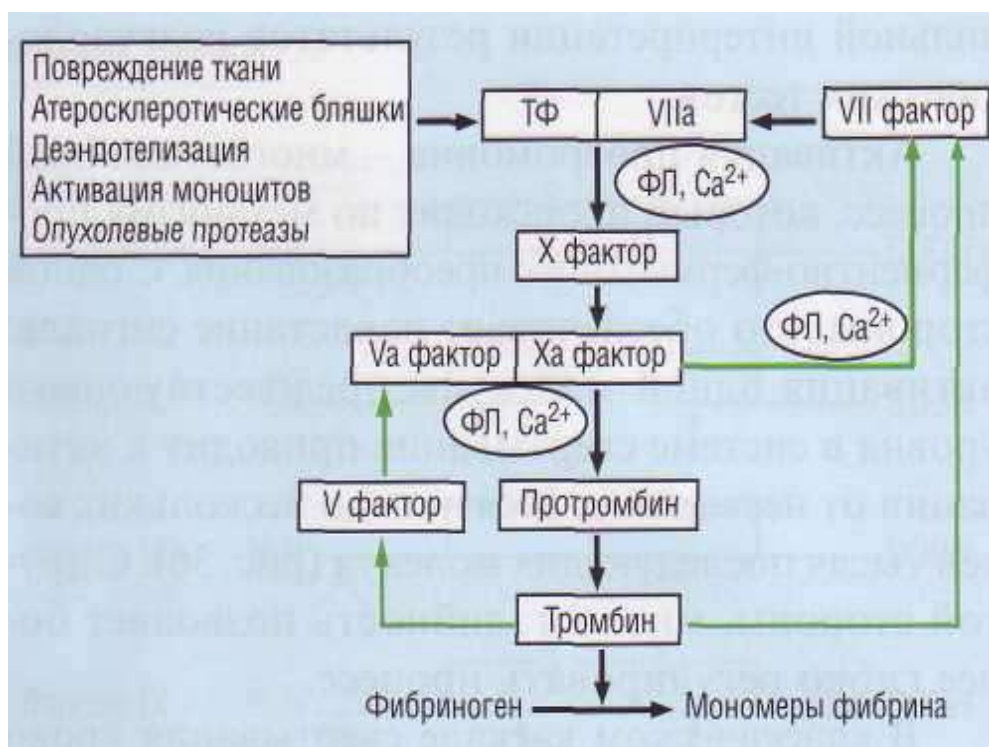


Рисунок 26. – Схема внешнего пути активации коагуляционного гемостаза

При активации свертывания крови по внутреннему пути роль фосфолипидной матрицы выполняют фосфолипиды на наружной мембране активированных тромбоцитов. Тромбоциты являются составными частями крови, отсюда название – внутренний путь (рис. 26).

Отличительной особенностью первой фазы является участие разных факторов в образовании активной формы фактора X (Ха) при активации свертывания крови по внешнему или внутреннему пути. Оба пути замыкаются на факторе X и далее протекают одинаково и обозначаются как общий путь свертывания крови.

рино-пептиды А и В (ФПА и ФПВ), которые закрывают комплементарные участки в фибриногене и не позволяют ему полимеризоваться.

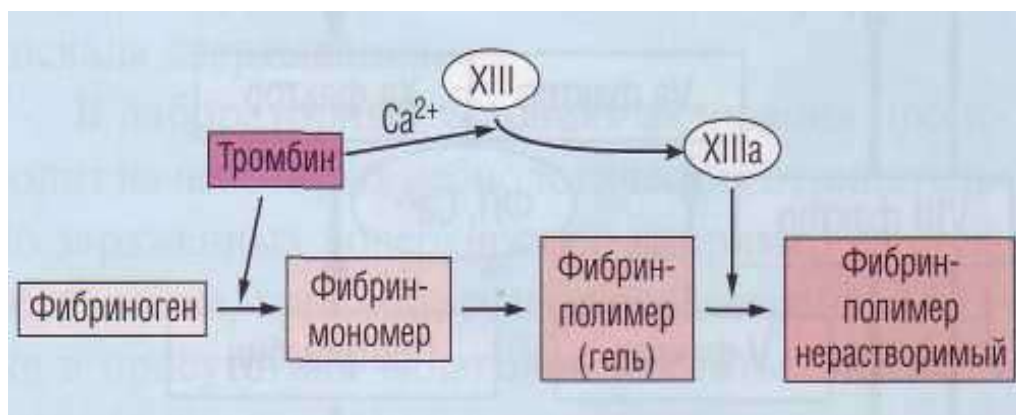


Рисунок 28. – Процесс образования фибрина из фибриногена

Процесс взаимодействия фибриногена и тромбина происходит в кровотоке. Тромбин соединяется с фибриногеном и отщепляет конечные последовательности от α - и β -цепей – 2 ФПА и 2 ФПВ. Образуются растворимые мономеры фибрина. В дальнейшем происходит спонтанное соединение комплементарных участков фибрин-мономеров. Сначала образуются димеры, далее олигомеры, и в конечном итоге собираются моно-нити полимеризованного фибрина. Результатом этой полимеризации является линейный полимер шириной в 2 молекулы. На этом этапе фибрин легко растворим, поэтому он получил название **растворимого фибрина**.

Соединяясь с фибриногеном, тромбин не только отщепляет фибринопептиды, но и активирует связанный с ним фактор XIII. Фактор XIIIa образует ковалентные связи между γ -цепями (D-доменами) нитей растворимого фибрина, которые соединяются за счет образования пептидных мостиков между боковыми радикалами лизина и глутамина. Сшитые между собой моонити фибрина образуют прочную сеть, менее подверженную фибринолизу и более устойчивую к механическим воздействиям. В такой форме фибрин не растворяется и называется **нерастворимым фибрином**.

Регуляция коагуляционного гемостаза

К клеточным компонентам, обеспечивающим поддержание крови в жидком состоянии в циркуляции относятся прежде всего клетки РЭС и гепатоциты, которые специфически удаляют активированные факторы свертывания крови и фибриноген без какого либо влияния на их предшественники. Гуморальный компонент состоит из физиологических антикоагулянтов, которые тем или иным путем инактивируют активные факторы свертывания крови (табл. 26). Среди них наиболее значимыми являются *антитромбин III, протеины C и S*.

Таблица 26. – Основные антикоагулянты

Наименование антикоагулянта	Механизмы действия
Антитромбин III (АТ III)	Прогрессивно действующий ингибитор тромбина, фактора X и в меньшей степени других ферментных факторов свертывания, плазменный кофактор гепарина
Гепарин	Сульфатированный полисахарид, образующий комплексы с АТ III, переводящий последний в быстродействующий антикоагулянт
Кофактор гепарина II	Слабый антикоагулянт, действие которого выявляется в присутствии гепарина после удаления из плазмы АТ III
Протеин С	Витамин К-зависимая серинамидаза, инактивирующая факторы VIII и V _a ; эндогенный активатор плазминогена. Активируется комплексом «тромбомодулин-тромбин»
Протеин S	Витамин К-зависимый кофактор протеина С
Ингибитор тканевого пути свертывания (TFPI)	Ингибитор комплекса «тканевый фактор-фактор VIII - фактор Xa - Ca ⁺⁺
Антитромбопластин а.2 - макроглобулин си. антитрипсин I	Ингибиторы комплекса факторов III-VIII Слабый ингибитор тромбина, плазмина, калликреина Ингибитор тромбина, факторов IXa, XIa, XIIa, плазмина
Ингибитор комплемента I (Анти-CI)	Тоже

Антитромбин III инактивирует сериновые протеазы – тромбин и все предшествующие его образованию активные фак-

торы (за исключением факторов VIIIa и Va), путем образования с ними неактивных комплексов.

Инактивация факторов VIIIa и Va – мощных активаторов образования тромбина – осуществляется другими белками, так называемой системой **протеинов С и S**, которая активируется комплексом, образующимся при взаимодействии тромбина с тромбомодулином. Активированный этим комплексом плазменный протеин С в присутствии своего кофактора (протеина S) протеолитически расщепляет факторы VIIIa и Va. Данные антикоагулянты синтезируются в печени, синтез протеинов С и S зависит от количества витамина К.

Система фибринолиза

В процессе формирования гемостатического тромба активизируются механизмы, направленные на ограничение роста сгустка, постепенное растворение тромба и создание условий для нормального кровообращения. Осуществляется эта функция благодаря *системе фибринолиза*.

Система фибринолиза представляет собой протеолитическую структуру плазмы крови, ответственную за лизис фибринового сгустка, а также вовлеченная в деградацию коллагена, ангиогенез, апоптоз и связанная с другими протеолитическими системами. Наряду с компонентами, проявляющими ингибиторное действие, гуморальная система включает также и фибринолитический механизм, направленный на растворение фибринового сгустка (фибринолиз).

Основные компоненты системы фибринолиза:

✓ **Плазминоген** – это профермент, из которого образуется фибринолитический энзим – плазмин.

✓ **Активаторы плазминогена** – превращают плазминоген в плазмин:

- **Тканевой активатор плазминогена (ТПА)** – главный активатор в плазме.

- **Урокиназный активатор плазминогена (УПА)** – главный активатор в тканях.

✓ **Ингибиторы активаторов плазминогена (ИАП):**

- ИАП-1 – образуется в эндотелии сосудов.

- ИАП-2 – образуется в плаценте.

✓ **Ингибиторы плазмина:** α_2 -антиплазмин, α_2 -макроглобулин и α_1 -антитрипсин.

✓ **Рецепторы урокиназного активатора плазминогена** – обеспечивают протекание фибринолиза в тканях.

✓ **Рецептор плазминогена.**

✓ **Тромбин-активируемый ингибитор фибринолиза (TAFI).**

Активным ферментом фибринолиза является **плазмин**, который образуется из плазминогена, неактивного предшественника, циркулирующего в плазме крови. Различают два пути активации плазминогена с образованием плазмина: внешний и внутренний (рис. 29).

Активация по внешнему пути осуществляется за счет тканевого активатора плазминогена (t-PA), который синтезируется в клетках эндотелия сосудов. Секреция t-PA происходит постоянно и усиливается при действии разных факторов: тромбина, гормонов и лекарственных препаратов, физической нагрузки, стресса, шока, тканевой гипоксии, хирургической травмы и др.

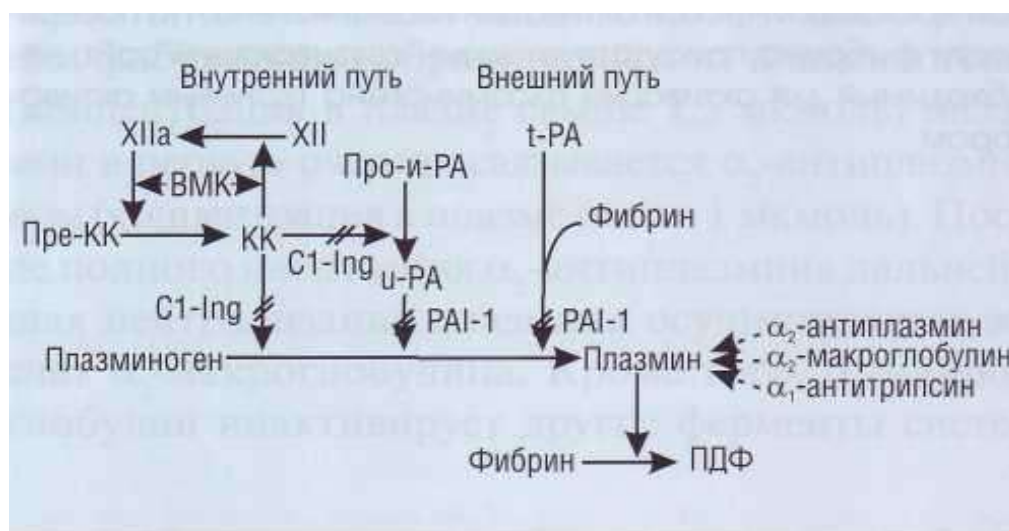


Рисунок 29. – Схема фибринолиза

Пусковым механизмом активации фибринолиза по внутреннему пути является контакт с чужеродной поверхностью, в результате которого образуется фактор XIIa и калликреин (КК), которые активируют плазминоген с образованием плазмина. Кроме того, активация плазминогена может происходить за счет активатора урокиназного типа, который, в отличие от тканевого актива-

тора, не имеет сродства к фибрину, но связывается со специфическими рецепторами на поверхности различных клеток, имеющих также рецепторы для плазминогена.

Плазмин – активный фермент, который приводит к протеолизу не только фибрина, но и фибриногена, факторов свертывания V, VIII и других белков плазмы. Контролируют действие плазмينا несколько ингибиторов, основным из которых является **α 2-антиплазмин**, синтезируемый в печени. Он образует неактивный комплекс со свободным плазмином, попавшим в циркуляцию. Плазмин, образованный на фибрине или на поверхности клеток, защищен от действия ингибитора.

Ингибирование фибринолиза осуществляется также на уровне активаторов плазминогена. Наиболее значимым является **ингибитор активатора плазминогена эндотелиального типа (ИАП-1)**. Он инактивирует как тканевой, так и урокиназный типы активаторов, синтезируется в клетках сосудистого эндотелия, обнаружен также в тромбоцитах, моноцитах и других клетках. Секреция усиливается при действии тканевого активатора плазминогена, тромбина, цитокинов, бактериальных эндотоксинов и др. Повышенное содержание этого ингибитора сопровождает венозные тромбозы, отмечается при инфарктах миокарда, ряде других состояний, связанных с тромботическими проявлениями.

При действии плазмينا на фибрин и фибриноген образуются **продукты деградации фибрина (ПДФн)** или **фибриногена (ПДФг)**, соответственно.

Различают ранние и поздние ПДФ (рис. 30).

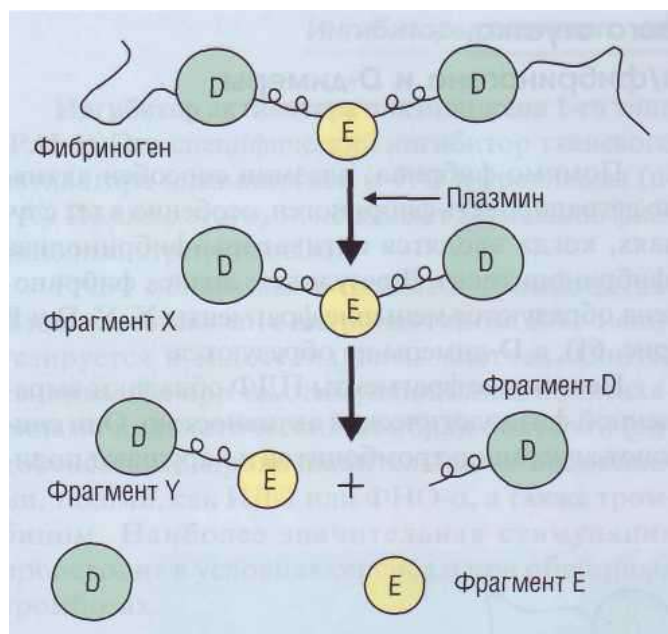


Рисунок 30. – Образование ПДФ

Ранние ПДФ образуются на первых этапах протеолиза и отличаются более высокой молекулярной массой. Дальнейшая их деградация плазмином приводит к образованию поздних ПДФ с меньшим молекулярным весом и устойчивых к протеолизу. При деградации фибрина образуются значительно более сложные комплексы фрагментов, отличительной особенностью которых является наличие так называемых D-димеров – участков молекул фибриногена, связанных прочными ковалентными связями в процессе образования нерастворимого фибрина, которые не разрушаются под действием плазмина.

Мелкие пептиды, высвобождаемые в начале процесса фибринолиза, обладают вазоактивным действием. Они вызывают нарушение микроциркуляции, транскапиллярного обмена, увеличивают проницаемость сосудов, что приводит к выходу форменных элементов крови и белков плазмы за пределы сосудов. Ранние ПДФ ингибируют полимеризацию фибрин-мономеров, вступая во взаимодействие с ними, благодаря чему нарушается образование фибрина.

Поздние ПДФ блокируют рецепторы мембраны тромбоцитов, вызывая их дисфункцию. Обнаружение повышенного уровня ПДФ всегда свидетельствует о наличии плазминемии, а, следовательно, об активации фибринолиза.

Таким образом, реакции фибринолиза, обусловленные взаимодействием различных активаторов и ингибиторов, находятся в тесной взаимосвязи с реакциями гемостаза и направлены на деградацию фибрина с целью поддержания равновесия между его образованием и лизисом для сохранения целостности и проходимости сосудов.

Методы оценки гемостаза

Лабораторная оценка сосудисто-тромбоцитарного гемостаза

Время кровотечения (по Айви, Дьюке)

Время кровотечения – это период времени от момента нанесения стандартной раны кожи до момента прекращения вытекания крови. Оно характеризует функциональную активность тромбоцитов и взаимодействие тромбоцитов с сосудистой стенкой. Время кровотечения не выявляет всех тромбоцитарных нарушений, этот скрининговый тест позволяет в частности заподозрить тромбоцитопатии разного генеза, болезнь Виллебранда и нарушения проагрегантных свойств сосудистой стенки. После выявления патологии нет необходимости повторять это исследование, нужно использовать более чувствительные и специфичные методы.

Определение количества тромбоцитов

Определение числа тромбоцитов в крови может выполняться с помощью гематологических анализаторов или микроскопически в счетной камере Горяева. Фиксация тромбоцитов оксаламом аммония дает возможность осуществить достаточно полное их осаждение в камере Горяева без сопутствующего разрушения части клеток. Метод подсчета тромбоцитов в счетной камере должен сочетаться с оценкой морфологии кровяных пластинок в мазке крови. Нередко, пренебрегая этим, не выявляют такие диагностически важные данные, как резкое увеличение размера тромбоцитов, появление крупных агранулированных пластинок при синдроме серых тромбоцитов, микроформ, почти полное отсутствие агрегатов тромбоцитов и отростков в пластинках.

При подсчете на автоматических анализаторах тромбоциты распознаются по размерам в диапазоне 2-20 фл (рис. 31). Автоматические счетчики позволяют получать достаточно надежные результаты по количеству тромбоцитов. При подсчете тромбоцитов в камере Горяева коэффициент вариации составляет 7-15%, тогда как автоматический подсчет воспроизводится с точностью до 2-4%. Современные анализаторы сигнализируют (флагируют на бланке) о выходе количества тромбоцитов за референтные пределы, наличии агрегатов тромбоцитов, макротромбоцитов или других элементов, сравнимых по объему с тромбоцитами (микроритроциты).

Ложное занижение числа тромбоцитов может быть при их агрегации, агглютинации под действием тромбоцитарных агглютининов и при прилипании тромбоцитов к лейкоцитам (тромбоцитарный «сателлитизм»). При подсчете на гематологических анализаторах в качестве антикоагулянта используется ЭДТА. При наличии ауто-антител к тромбоцитам калиевая соль ЭДТА инициирует агрегацию тромбоцитов, что проявляется псевдотромбоцитопенией.

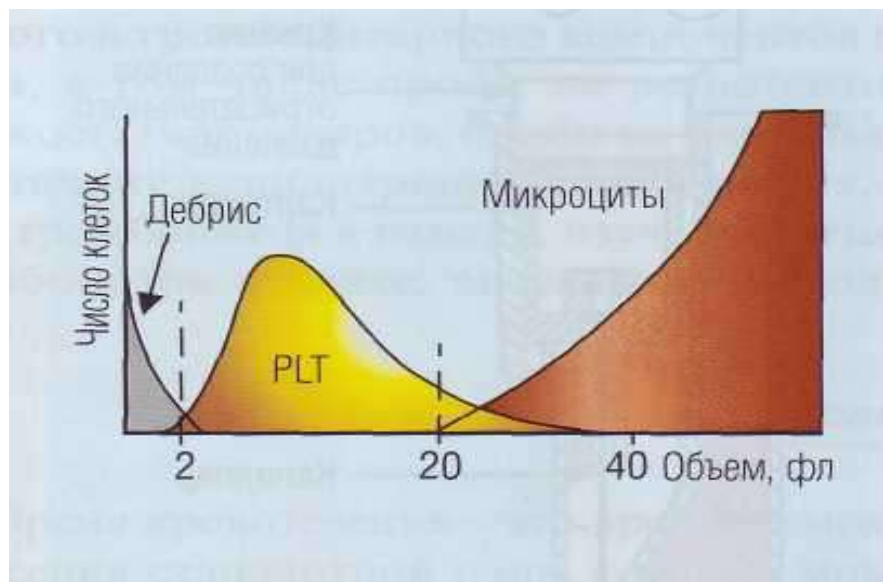


Рисунок 31. – Гистограмма тромбоцитов

Средний объем тромбоцита (MPV) в норме равен **6-12 фл** и находится в обратной зависимости от числа тромбоцитов. Такое соотношение определяет постоянство тромбоцитарной массы в циркулирующей крови. Использование ЭДТА в качестве антикоагулянта

вызывает изменение формы тромбоцитов от диска к сфере, что приводит к увеличению MPV на 10-12% в течение двух часов, а затем показатель существенно не меняется. Под действием цитрата натрия MPV может уменьшаться или увеличиваться, а при высокой концентрации (1:4) не изменяется со временем.

Кроме применяемого антикоагулянта и времени от момента взятия пробы до исследования на MPV также оказывает влияние температура воздуха. Преходящее увеличение MPV отмечается у рабочих, контактирующих с асфальтовыми испарениями, органическими растворителями.

PDW – показатель анизоцитоза (гетерогенности размеров) тромбоцитов – в среднем составляет **10-15%**. Данный показатель находится в обратной зависимости от числа тромбоцитов и периода их жизни. В каждом конкретном случае важна не только величина PDW, но и ее динамика во времени, а также связь с другими тромбоцитарными показателями. Одновременное присутствие фракций макротромбоцитов и микротромбоцитов ведет к увеличению PDW, но MPV может оставаться при этом в пределах нормы.

Тромбоцитокрит (PCT)

Это показатель, характеризующий процент тромбоцитарной массы в объеме крови, вычисляется суммированием прямо измеренных объемов тромбоцитов.

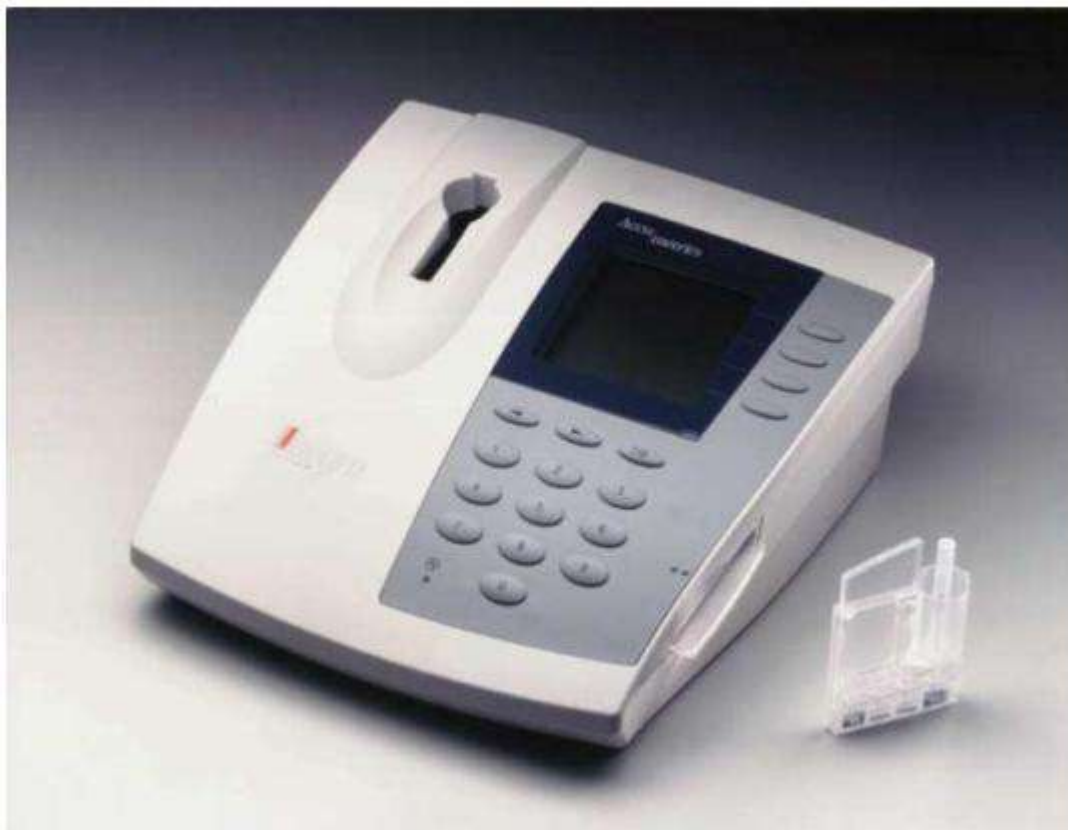
Нормальные значения PCT варьируют в пределах **0,15-0,35%**. Обнаружено, что снижение PCT менее 0,1% обусловило возникновение послеоперационных кровотечений у пациентов с развившейся тромбоцитопенией.

Агрегатометрия

Агрегацию тромбоцитов исследуют на агрегометре с использованием индукторов агрегации. В качестве последних могут быть применены:

- ✓ АДФ.
- ✓ Адреналин.
- ✓ Тромбин.
- ✓ Коллаген.

Агрегометр



Исследование агрегации проводят на плазме, богатой тромбоцитами (ПБТ). Желательно использовать ПБТ, содержащую примерно 200 клеток/нл, однако при тромбоцитопении это требование затрудняет оценку агрегации. Пробы помещаются в кювету агрегометра, который представляет собой оптический прибор с регистрацией проходящего света. Проба в кювете постоянно перемешивается специальной мешалкой. При формировании агрегатов повышается прозрачность плазмы и, следовательно, увеличивается поток проходящего через кювету света (рис. 32). Изменение светопропускания регистрируется в виде кривой.

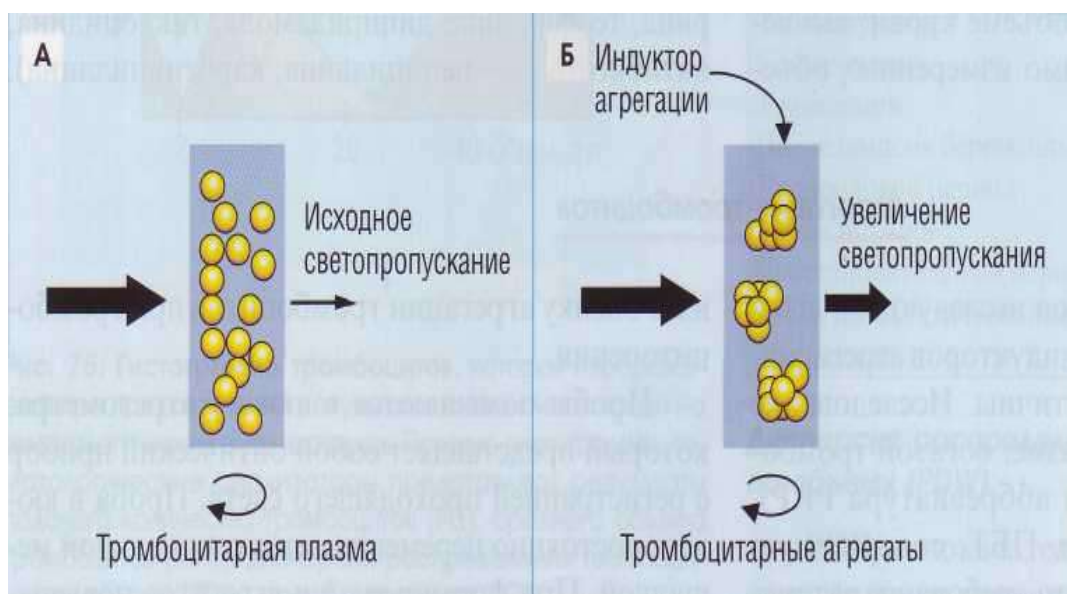


Рисунок 32. – Схема оценки агрегации тромбоцитов

Тромбоэластография

Тромбоэластография (ТЭГ) впервые была описана немецким профессором Хартнером в 1948г. В клиническую практику метод был введен исследователем Кангом в США спустя 25 лет во время операции по трансплантации печени. Ротационная тромбоэластография (роТЭГ) является усовершенствованной и переработанной формой классической тромбоэластографии и была основана Калатзисом и Фритzsche в 1996г. Ранее метод назывался ротационной тромбоэластографией (роТЭГ), а в 2003г. был переименован в ротационную тромбоэластометрию (роТЭМ).

Данный метод основан на графической регистрации изменений вязкости и упруго-эластических свойств крови в процессе образования фибринового сгустка. Тромбоэластограмма, в отличие от классических клотинговых исследований, отображает кинетику всех стадий формирования тромба, а также фибринолиз.

В 1996г. термин «тромбоэластография» зарегистрирован в качестве торговой марки компанией ***Haemoscope Corporation*** и с этого времени применяется для описания анализа, выполненного на приборах Haemoscope. Альтернативные приборы, производимые фирмой ***Pentapharm GmbH***, называются тромбоэластометрами, а сам процесс измерения – ***ротационная тромбоэластометрия***.

Параметры, определяемые в ходе ТЭГ и роТЭМ

В случае проведения классической тромбоэластографии (ТЭГ) результаты выражаются графически в виде кривой реакции (рис. 33), а также с использованием ряда числовых параметров формирования сгустка (табл. 27).

Таблица 27. – Параметры ТЭГ

R	Время с момента помещения образца в анализатор до момента образования первых нитей фибрина
K	Время с момента начала образования сгустка до достижения фиксированного уровня прочности сгустка
α	Угол, построенный по касательной к тромбоэластограмме из точки начала образования сгустка. Отображает скорость роста фибриновой сети и её структурообразование (увеличение прочности сгустка)
МА	Максимальная амплитуда. Характеризует максимум динамических свойств соединения фибрина и тромбоцитов посредством GPIIb/IIIa и отображает максимальную прочность сгустка
LY30	Изменение площади под кривой тромбоэластограммы в течение следующих за достижением МА 30 мин. по отношению к площади под кривой тромбоэластограммы без признаков лизиса

Разные фазы кривой ретракции отображают разные физиологические процессы, отражающие взаимодействие тромбоцитов, коагуляционных агентов и ингибиторов, а также фибриногена и системы фибринолиза.

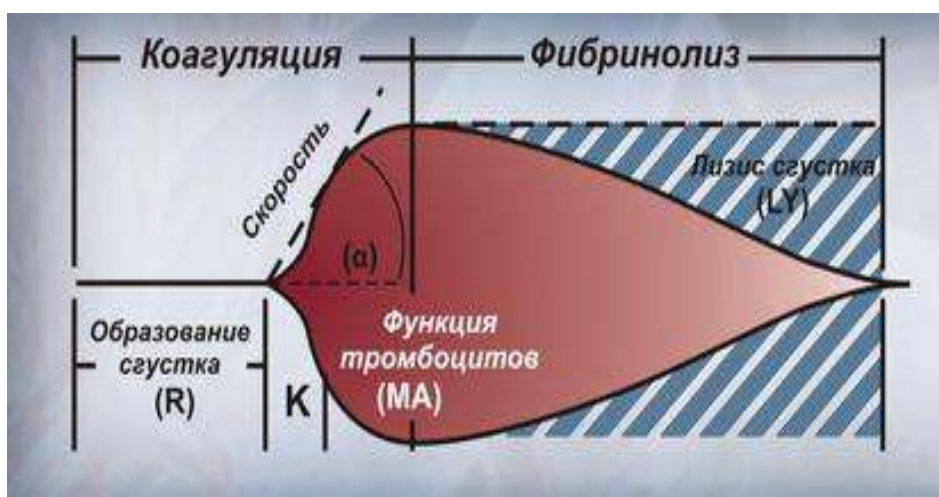


Рисунок 33. – Кривая ретракции при выполнении ТЭГ

Как и в случае с классической тромбоэластографией, с помощью роТЭМ можно получить кривую реакции (рис. 34) и некоторые числовые показатели, характеризующие процесс формирования сгустка (табл. 28).

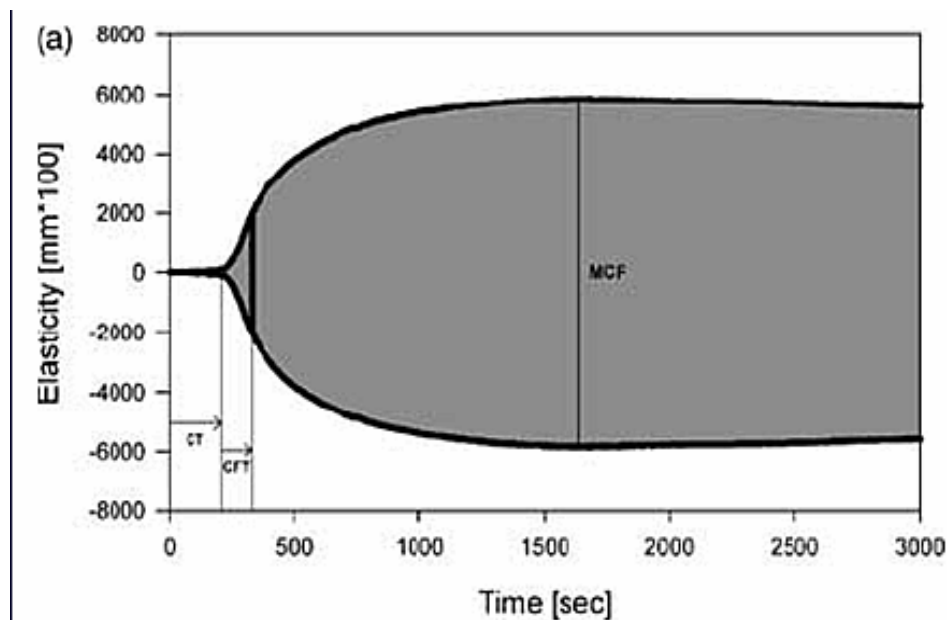


Рисунок 34. – Кривая ретракции при выполнении роТЭМ

Таблица 28. – Параметры роТЭМ

CT	Время начала образования сгустка
CFT	Время образования сгустка
ALP	Угол α
CFR	Скорость формирования сгустка
MCF	Максимальная плотность сгустка
MCE	Максимальная эластичность сгустка
ML	Максимальный лизис

Как видно из данных табл. 28, при проведении тромбоэластометрии существует возможность более детальной и качественной оценки процесса образования сгустка, чем в случае ТЭГ.

Ниже приводится краткая характеристика параметров роТЭМ:

Время начала образования сгустка (СТ) – время от начала тестирования, необходимое для достижения плотности сгустка в 2 мм посредством добавления активатора (реагенты и кальций). Время начала образования сгустка является важным параметром активизации показателей свертывания.

Время образования сгустка (CFT) – отображает следующую фазу свертывания (кинетику образования стойкого сгустка из тромбоцитов и фибрина). Данный показатель отражает время, необходимое для увеличения плотности сгустка с 2 до 20 мм.

Угол альфа (ALP) – представляет собой касательную к кривой тромбообразования в точке, соответствующей двухмиллиметровой плотности сгустка. Эта величина характеризует кинетику образования сгустка. Выражать её принято в градусах. Она высчитывается как угол между центральной линией и касательной к кривой в точке достижения амплитуды, равной 2 мм.

Скорость формирования сгустка (CFR) представляет собой тангенс максимума наклонной.

Максимальная плотность, которую сгусток достигает в течение измерения, обозначается как **максимальная плотность сгустка (MCF)**. Это максимальная амплитуда плотности сгустка, которая представляет собой максимальную величину амплитуды, достигнутую к моменту, когда процесс фибринолиза начинает вызывать её понижение. Данный параметр выражается в миллиметрах, представляет собой амплитуду половины кривой от 0 до её максимальной высоты. Максимальная плотность сгустка является одним из наиболее важных параметров в тромбоэластометрии.

Максимальная эластичность сгустка (MCE) высчитывается из значения MCF. Индекс фибринолиза через 30-60 мин. рассчитывается относительно максимальной плотности сгустка (в % от остаточной плотности) и характеризует степень фибринолиза, имевшего место через 30, 45 и 60 мин. после времени начала формирования сгустка (СТ).

Максимальный лизис (ML) представляет максимальный фибринолиз, обнаруженный в течение анализа, определяется как нахождение самой низкой амплитуды после достижения MCF.

Преимущества роТЭМ-технологии

Классическая тромбоэластография с использованием образцов цельной крови является чувствительным, но трудоёмким способом исследования. Высокая восприимчивость метода к вибрациям, сложность постановки, а также один (или два) канала измерения ограничивают применение данной методики на прак-

тике.

Использование метода роТЭМ позволяет количественно и качественно определить специфические дефекты системы свертываемости крови, что в свою очередь может служить базовой информацией для планирования соответствующих терапевтических мероприятий. Это осуществляется путем ускорения времени исследования при ротационной тромбоэластометрии благодаря использованию специальных модификаторов и активаторов.

РоТЭМ позволяет не только оценить состояние гемостаза пациента, но и определить возможный патогенез нарушения свертываемости крови. При создании анализатора для проведения данного метода была использована новая ротационная технология: роТЭМ использует инновационный, надежный и более устойчивый 4-канальный метод опто-механического обнаружения, в отличие от механического, используемого при классической тромбоэластографии. Устойчивость к внешнему воздействию данного метода была подтверждена рядом клинических испытаний.

По сравнению с традиционной тромбоэластографией эксплуатация прибора роТЭМ значительно упрощена и стандартизирована введением электронной пипетки, управляемой компьютером. Данное нововведение значительно уменьшило требования к квалификации пользователя. Анализатор производит автоматический расчет всех параметров результата по полученному графику, имеется возможность также вводить новые параметры и автоматически архивировать результаты и графики в памяти компьютера.

Область применения роТЭМ

Тромбоэластометрия полезна в случаях, когда необходимо быстро получить полноценную информацию относительно функционального состояния гемостаза пациента. Это особо актуально перед оперативными вмешательствами, после операций и во время их. Быстрая оценка состояния гемостаза является важной при хирургических вмешательствах на сердце и крупных сосудах, проведении трансплантаций и экстракорпорального очищения крови. Одним из первых клинических применений тромбоэластографии был гемостатический мониторинг во время операции по

трансплантации печени.

Многие оперативные вмешательства, особенно в «большой» хирургии, часто сопровождаются массивной кровопотерей. Непосредственно потеря крови во время операции, а также заместительная терапия кристаллоидными и синтетическими коллоидными растворами приводит к прогрессированию нарушений системы гемостаза. Экспресс-оценка состояния свертывающей системы крови, осуществляемая с помощью роТЭМ, позволяет анестезиологу и трансфузиологу выбрать правильную тактику инфузионно-трансфузионной терапии и обосновать введение свежезамороженной плазмы, криопреципитата или тромбоцитного концентрата, или, наоборот, доказать необоснованность переливания того или иного компонента крови.

Прогноз вероятности послеоперационной кровопотери является весьма сложной задачей в современной медицине. Все известные на сегодняшний день методы имеют те или иные ограничения и недостатки. В ряде современных публикаций было продемонстрировано, что использование роТЭМ в этом отношении имеет довольно надежные результаты прогнозирования.

РоТЭМ-технология успешно используется в настоящее время как метод фибринолитического мониторинга. Положительным качеством данной методики при этом является не только оценка самого процесса фибринолиза, но и исследование эффективности антифибринолитической терапии. С использованием роТЭМ-технологии в настоящее время проводятся клинические испытания новых антифибринолитических препаратов.

Современные технологические достижения позволяют применять приборы роТЭМ для анализа состояния системы гемостаза «у постели пациента». В частности, проводить мониторинг антикоагулянтной терапии, осуществлять быструю оценку адгезивно-агрегационной функции тромбоцитов и др. Тромбоэластометрия успешно используется для мониторинга лечения нефракционированным гепарином и гепариноидами. Имеются данные об использовании роТЭМ-технологии в качестве гемостатического мониторинга при применении других противосвертывающих средств (типа гирудина).

Терапевтические мероприятия у онкологических пациентов часто осложняются присоединением ДВС-синдрома вследствие

цитолита опухоли, а также нарушения функционального состояния печени. Генез геморрагического синдрома в такой ситуации требует проведения быстрой дифференциальной диагностики для определения основной причины кровотечения и начала патогенетически обоснованной терапии. Наиболее эффективным методом при этом выступает роТЭМ-технология.

Кровотечение в родах, терапия которого невозможна без контроля свертываемости крови, является частой причиной смертности рожениц и серьезных осложнений родов во всем мире. Применение тромбоэластометра позволяет предупредить и избежать возникновения столь грозного осложнения. Рост числа тяжелых гестозов, приводящих к нарушениям свертывающей системы крови, делает своевременное коагулологическое обследование беременной женщины обязательным.

В терапии пациентов с гемофилиями типа А и В также необходим тщательный контроль гемостаза для определения тактики заместительной терапии VIII и IX факторами свертывания. РоТЭМ-технология с успехом используется для контроля применения комплексных концентратов протромбина и рекомбинантного активированного VII фактора в лечении пациентов с гемофилией типа А и других нарушений коагуляции.

Учитывая широкую распространенность нарушений системы гемостаза при заболеваниях различных органов и систем, полноценная и оперативная диагностика этих изменений имеет особо важное значение. В настоящее время наиболее адекватным методом оценки гемостаза являются ротационная тромбоэластометрия, которая выступает альтернативой классической коагулограмме. Использование данного метода позволяет получать полноценную диагностическую информацию о свертывающей системе крови пациента в кратчайшие сроки и в достаточно полном объеме. Полученные при этом данные о времени образования сгустка, скорости его роста, величине, упругости и растворении в процессе фибринолиза оценивают все этапы гемостаза и создают условия для проведения своевременной патогенетически обоснованной терапии.

Лабораторная оценка коагуляционного гемостаза

Для оценки коагуляционного гемостаза в настоящее время используются так называемые **клоттинговые методы**, которые основаны на определении промежутка времени от добавления стартового реактива, запускающего каскад свертывания плазмы, до момента образования сгустка. Примерная схема данного метода приведена на рисунке 35.

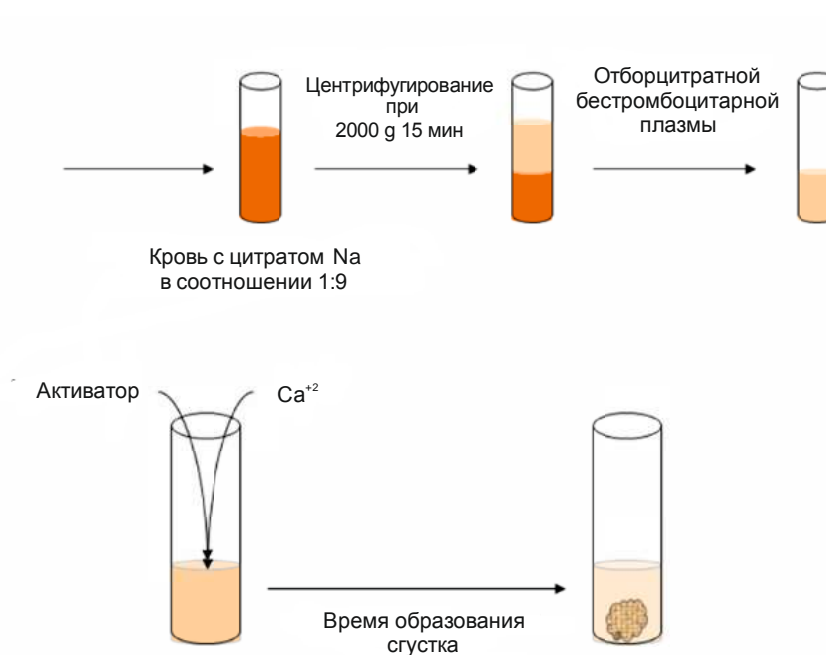


Рисунок 35. – Схема клоттингового метода

Время свертывания венозной крови по Ли-Уайту

Время свертывания венозной крови оценивает общую коагуляционную активность цельной крови по скорости образования в ней сгустка. Тест малочувствителен, так как результаты его будут в референтном интервале, например при уровне фактора VIII 5% от нормы.

Время рекальцификации плазмы

Время рекальцификации плазмы – это время свертывания цитратной плазмы в термостатированных условиях (37°C) после добавления к ней хлорида кальция, оно характеризует общую коагуляционную активность плазмы. Удлинение времени рекальцификации плазмы отмечается при значительных нарушениях в любой из фаз свертывания крови.

В отличие от времени свертывания венозной крови это более чувствительный тест благодаря отсутствию в плазме форменных элементов (эритроцитов, лейкоцитов), обладающих тромбопластической активностью.

Каолиновое время свертывания плазмы

Каолиновое время свертывания плазмы, как и два предыдущих теста, относится к общим коагуляционным тестам. Присутствие каолина обеспечивает стандартную активацию факторов контактной фазы (XII и XI), что обеспечивает большую чувствительность метода по сравнению с тестом определения времени рекальцификации.

Активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ)

Активированное частичное тромбопластиновое время определяет общую коагуляционную активность плазмы при стандартных условиях контактной активации. Благодаря добавлению препарата частичного тромбопластина (замениителя тромбоцитарных фосфолипидов), тест АЧТВ, в отличие от каолинового времени свертывания плазмы, оценивает лишь участие факторов свертывания крови в образовании теназного и протромбиназного комплексов без влияния тромбоцитарных фосфолипидов исследуемого пациента.

Показания к определению АЧТВ:

- ✓ Контроль терапии нефракционированным гепарином.
- ✓ Скрининг врожденного дефицита факторов (VIII, IX).
- ✓ Оценка эффективности заместительной терапии гемофилии.
- ✓ Скрининг антифосфолипидного синдрома.

Протромбиновое время

Метод основан на том, что при наличии избытка тромбопластина и оптимального содержания кальция время образования сгустка в плазме зависит от активации свертывания по внешнему пути, преимущественно от активности факторов протромбинового комплекса – VII, V, X, II. При снижении активности одного или нескольких из перечисленных факторов время образования сгустка в плазме замедляется. При достаточном содержании фак-

торов удлинение протромбинового времени отмечается при лечении прямыми антикоагулянтами (гепарином) и при снижении содержания фибриногена ниже 1 г/л, что подтверждается исследованием тромбинового времени и концентрации фибриногена.

Способы выражения протромбинового времени:

1. Протромбиновый индекс (ПТИ) = ПВ стандартной плазмы / ПВ пациента (0,8-1,2). Увеличение свидетельствует о гиперкоагуляции, уменьшение – о гипокоагуляции.

2. Протромбиновое отношение (ПО или PR) = ПВ пациента / ПВ стандартной плазмы (0,94-1,1).

3. Международное нормализованное отношение (МНО или INR), которое рассчитывается следующим образом:

4. МНО = $ПО^{МИЧ}$.

МИЧ (ISI) – международный индекс чувствительности, соотносящий активность тканевого фактора из животных источников со стандартом тканевого фактора у человека (рекомендуемое ВОЗ значение МИЧ – до 1,2).

Последний способ выражения протромбинового времени особо важен при обследовании пациентов, получающих непрямые антикоагулянты, для которых недопустимы колебания показателей в зависимости от применяемых реагентов. Кроме того, определение МНО в сравнении с ПТИ позволяет более точно подобрать дозу антикоагулянта и уменьшить риск кровотечений, связанных с его передозировкой.

Тромбиновое время

Принцип метода основан на определении времени, необходимого для образования сгустка в плазме после добавления стандартного раствора тромбина. Тромбиновое время характеризует течение конечного этапа свертывания крови (скорость образования фибрина из фибриногена) и зависит от содержания фибриногена и ингибиторов, блокирующих действие тромбина и превращение фибриногена в фибрин.

Определение фибриногена

Для определения фибриногена в плазме используют разные методы, результаты которых могут существенно различаться, особенно при гипо- или гиперфибриногенемии.

Гравиметрический метод (по Рутбергу). Образующийся после свертывания плазмы фибрин быстро высушивается и по весу сгустка определяют содержание фибриногена.

Хронометрический метод (по Клауссу). Принцип метода основан на определении времени свертывания разведенной избытком высокоактивного тромбина плазмы крови. Данное время при этом зависит от концентрации в ней фибриногена, которая определяется по стандартной калибровочной плазме с известным содержанием фибриногена. Этот метод, в отличие от предыдущего, является более чувствительным и информативным.

Иммунохимические методы определения фибриногена основаны на турбидиметрическом или нефелометрическом способах регистрации, использовании поликлональных антител и адаптированы на иммунохимические анализаторы.

Показания к определению концентрации фибриногена:

- ✓ Оценка уровня потребления факторов при ДВС-синдроме.
- ✓ Оценка синтетической функции печени.
- ✓ Оценка риска тромботических осложнений в группе пациентов с атеросклерозом. Увеличение уровня фибриногена является независимым фактором риска тромбоза.
- ✓ Диагностика острой фазы воспаления.

Лабораторные методы оценки фибринолиза

Время лизиса эуглобулинового сгустка

Это один из традиционных методов оценки фибринолиза. В кислой среде при низкой температуре происходит осаждение эуглобулиновой фракции белков плазмы, содержащей фибриноген, факторы свертывания, плазминоген и его активаторы. Ингибиторы фибринолиза выпадают в осадок в незначительном количестве (около 2%).

Укорочение времени лизиса эуглобулинов (активация фибринолиза) отмечается:

- ✓ при гипо- и дисфибриногенемии;
- ✓ при увеличении содержания плазминогена и его активаторов.

Увеличение времени лизиса эуглобулинов (угнетение фибринолиза) отмечается:

- ✓ при гиперфибриногенемии;

- ✓ при врожденной а-, гипо- или дисплазминогенемии;
- ✓ при дефиците плазминогена и его активаторов.

Определение плазминогена

Дефицит плазминогена является одним из потенциальных факторов риска тромбоза, хотя клинически это подтверждается не всегда. При добавлении стрептокиназы (бактериальный препарат, который используется как тромболитик) к разведенному образцу исследуемой плазмы образуется плазминоген-стрептокиназный комплекс, который имеет ферментативную активность и способен расщеплять хромогенный субстрат. Ферментативная активность комплекса плазминоген-стрептокиназа не подавляется α_2 -макроглобулином и α_2 -антиплазмином.

Определение α_2 -антиплазмина

Это самый быстрый ингибитор плазмина, он не позволяет присутствовать плазмину в крови в свободном виде. α_2 -антиплазмин, помимо плазмина, ингибирует активаторы плазминогена, такие как урокиназа (u-PA) и тканевой активатор (t-PA). Дефицит α_2 -антиплазмина встречается относительно редко, но если таковой возникает, это сопровождается тяжелым геморрагическим синдромом. Основная причина кровотечений – присутствие свободного плазмина, который разрушает все тромбы и деградирует фибриноген.

Определение α_2 -антиплазмина вместе с определением ингибитора тканевого активатора плазминогена типа 1 (PAI-1), а также XIII фактора можно рассматривать как тесты 2-го уровня, которые необходимо выполнять, если скрининговые тесты (ПВ, АЧТВ, ТВ и определение тромбоцитов) в норме, а у пациента наблюдаются кровотечения.

Уменьшение содержания (активности) α_2 -антиплазмина наблюдается при:

- ✓ врожденных (наследственных) дефицитах;
- ✓ заболеваниях печени (нарушается синтез α_2 -антиплазмина);
- ✓ ДВС-синдроме;
- ✓ лейкозах;
- ✓ нефротическом синдроме;
- ✓ интенсивной тромболитической терапии.

После экстракорпорального кровообращения может наблюдаться снижение уровня α_2 -антиплазмина, что приводит к гиперфибринолизу, сочетающемуся с истощением фибриногена, деградацией плазмином плазменных белков (в том числе факторов гемостаза), разрушением тромбоцитов и кровотечениями.

Принцип определения α_2 -антиплазмина схож с методами определения других ингибиторов. Так как происходит быстрая инаktivация плазмина α_2 -антиплазмином, стадия ингибирования и стадия измерения стартуют практически одновременно.

Определение содержания ингибитора активатора плазминогена типа 1 (РАI-1)

РАI-1, являясь основным ингибитором урокиназы (u-РА) и тканевого активатора (t-РА), играет важную роль в контроле за активностью фибринолиза. Определение РАI-1 часто включается как один из тестов оценки тромбофилии. У пациентов с кровотечениями неясного генеза и нормальными скрининговыми показателями дефицит РАI-1 может быть причиной патологии. Истинный дефицит выявляется относительно редко, но сопровождается тяжелыми кровотечениями.

Повышение РАI-1 встречается достаточно часто, так как РАI-1 – один из белков острой фазы. Это имеет важное клиническое значение, являясь причиной рецидивирующего венозного тромбоза и отмечается часто у мужчин в преклонном возрасте.

Содержание РАI-1 повышается:

- ✓ при инфекционных и воспалительных процессах;
- ✓ в послеоперационном периоде;
- ✓ при злокачественных опухолях;
- ✓ при ожирении;
- ✓ при гипертриглицеридемии.

У пациентов с инфарктом миокарда подъем уровня РАI-1 рассматривается как неблагоприятный прогностический признак.

Определение РАI-1 состоит из нескольких этапов. На первом из них необходимо инаktivировать ингибиторы плазмина. Затем используется общий принцип определения остаточной активности добавленного в избытке фактора, который должен подавляться исследуемым ингибитором

Содержание PAI-1 в системе циркуляции подвержено суточным ритмам, поэтому пробы при анализе необходимо брать в одно время, лучше по утрам. Кроме того, PAI-1 – один из самых неустойчивых белков плазмы, поэтому определение необходимо проводить сразу после взятия крови, транспортировка может привести к потере активности PAI-1 в пробе.

Определение содержания тканевого активатора плазминогена (t-РА)

Тканевой активатор плазминогена (t-РА) освобождается в кровоток из эндотелиальных клеток сосудистой стенки, где он синтезируется. Поэтому диагностика дефицита t-РА основывается не только на определении концентрации t-РА в крови, но и на способности освобождаться из сосудистой стенки при стрессовых воздействиях. Сначала определяют базовый уровень t-РА, потом на 10-15 мин. на предплечье накладывают жгут или раздувают манжету, вызывающую венозный стаз, затем берут вторую порцию крови, в которой повторно определяют содержание t-РА. Сравнивают результаты обеих проб. Из-за быстрой инактивации тканевого активатора плазминогена PAI-1 и другими ингибиторами пробы крови необходимо немедленно закислить, чтобы предупредить инактивацию t-РА *in vitro*. В настоящее время выпускаются специальные пробирки с кислым антикоагулянтom. Продукция t-РА имеет суточный ритм, поэтому его необходимо определять так же, как PAI-1.

t-РА обладает высокой амидазной активностью, позволяющей эффективно использовать для его определения метод хромогенных субстратов. Однако при низких концентрациях t-РА в плазме требуется проведение дополнительных процедур непрямого определения активности фермента через плазминоген и использование растворимого фибрина.

Определение t-РА проводится у пациентов с тромбофилией. Повышение t-РА после инфаркта миокарда рассматривается как неблагоприятный фактор. Нарушение освобождения t-РА после венозного стаза отмечено у пациентов с тромбозами и патологией почек.

Определение содержания D-димеров

D-димеры – это специфические продукты деградации фибрина, входившего в состав тромба. Они образуются в процессе лизиса сгустка крови под влиянием пламина 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 содержания D-димеров проводится иммуноферментным методом с использованием моноклональных антител, иммунодиффузии, методами турбидиметрии, а также латекс-агглютинации. Во всех этих методах исследования используются моноклональные антитела к эпитопам на D-димере, которые образуются при расщеплении пламином нерастворимого фибрина. Этих эпитопов нет на фибриногене и растворимых фибрин-мономерах, 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 в сыворотке. На определение D-димеров практически не оказывает влияния техника взятия крови, примесь тромбоцитов, не требуется использование ингибиторов для подавления других факторов.

Повышение уровня D-димеров в крови наблюдается при:

- ✓ венозных тромбозах;
- ✓ атеротромбозе;
- ✓ ТЭЛА;
- ✓ ДВС-синдроме;
- ✓ после операций.

D-димеры достаточно долго циркулируют в крови, время их полувыведения составляет более 24 ч, их повышение может персистировать в течение нескольких недель после острого тромбоза.

На концентрацию D-димеров влияют такие факторы, как величина тромба, время от начала клинических проявлений до назначения антикоагулянтной терапии, прием антикоагулянтов, на фоне которых уровень D-димеров постоянно снижается. D-димеры мо-

гут определяться в моче, их появление при этом интерпретируется как маркер почечной дисфункции.

Определение продуктов деградации фибрина/фибриногена (ПДФ)

Продукты деградации фибрина/фибриногена определяются с использованием поликлональных антител. При этом антитела могут взаимодействовать с эпитопами фибриногена, поэтому требуется не только использование сыворотки, но и полное удаление фибриногена с добавлением к крови тромбина или змеиного яда с тромбиноподобным эффектом.

Для определения ПДФ широко распространен метод латекс-агглютинации. Он легко автоматизируется на турбидиметрах, но характеризуется относительно низкой специфичностью.

Положительная проба (содержание ПДФ в крови >0,5 мкг/мл) наблюдается при:

- ✓ ДВС-синдроме;
- ✓ тромбозе глубоких вен;
- ✓ ТЭЛА;
- ✓ метастазах в легкие, раке яичников;
- ✓ фибринолитической терапии.

Определение растворимых фибрин-мономерных комплексов (РФМК)

При ряде форм патологий, характеризующихся активацией свертывания крови (ДВС, тромбозы, тромбофилии), происходит увеличение пула фибриногена. В норме в крови в данном пуле присутствует только сам фибриноген, а все остальные продукты находятся в минимальном количестве, которое практически не определяется лабораторными тестами.

При ДВС-синдроме за счет свободного тромбина происходит постоянный процесс трансформации фибриногена в фибрин с появлением в крови фибринопептидов А и В, а также накоплением мономеров фибрина. Активация фибринолиза сопровождается повышенным образованием ПДФ. ПДФ взаимодействуют с фибрин-мономерами, увеличивая количество растворимых фибрин-мономерных комплексов (РФМК).

ЛАБОРАТОРНЫЕ МЕТОДЫ ОЦЕНКИ ГОРМОНАЛЬНОГО ОБМЕНА

Все процессы в организме человека регулируются нервной системой и гормонами. Последние, поступая в кровь из желез внутренней секреции, воздействуют на органы и ткани, влияя на их функции. Гормоны с момента рождения помогают нам адаптироваться к условиям внешней среды.

Гормоны можно разделить на три группы:

1. **Первая группа** – рилизинг-факторы, синтезирующиеся в гипоталамусе. Обеспечивают связь с нервной системой, влияя на работу гипофиза.

2. **Вторая группа** – тропные вещества, которые синтезирует гипофиз. Воздействуют на нижележащие отделы эндокринной системы, стимулируя или подавляя их работу. К таким гормонам относятся тиреотропный (ТТГ), аденокортикотропный (АКТГ), фолликулостимулирующий (ФСГ) гормон и другие.

3. **Третья группа** – собственно гормоны желез внутренней секреции, которые влияют на органы-мишени. Среди таких биологически активных веществ можно выделить инсулин, кортизол, тестостерон, трийодтиронин и другие. Всего в настоящее время известно до 100 гормонов.

Современные методы исследования позволяют определить наличие даже незначительного количества как полипептидных, так и стероидных гормонов. С этой целью широко используются иммунологические, применяемые для определения в крови содержания гормонов гипоталамуса (люлиберин, фолиберин и др.), гипофиза (ФСГ, ЛГ, пролактин, АКТГ, ТТГ и др.), яичников (эстрогены, прогестерон, андрогены), надпочечников (кортизол, тестостерон, альдостерон), щитовидной железы (T_3 , T_4) и других эндокринных желез и тканей.

Реже исследуется содержание гормонов и их метаболитов в суточной моче, в частности, определяются 17-КС – метаболиты андрогенов, которые в организме женщины образуются в яичниках, надпочечниках и внегонадно. В виде 17-КС выделяются дегидроэпиандростерон, его сульфат, андростендион и андростерон.

Содержание всех гормонов, особенно половых (стероидной и белковой природы), имеет выраженные колебания как в течение менструального цикла, так и по другим циклическим вариантам. Наиболее выражена активность эндокринной системы, связанная с репродуктивной функцией женщины, в перiovуляторный период. Поэтому целесообразно исследование содержания гормонов проводить два или три раза в течение менструального цикла.

Для топической и дифференциальной диагностики эндокринных заболеваний как по горизонтали (яичники – надпочечники – щитовидная железа), так и по вертикали (матка – яичники – гипофиз – гипоталамус – нейротрансмиттерные механизмы) нередко необходимо проведение гормональных функциональных проб. Гормональные пробы, кроме того, позволяют уточнить функциональное состояние разных отделов гипоталамо-гипофизарно-яичниковой системы.

Методы определения гормонов

В современной эндокринологии широко применяется определение содержания гормонов в крови по их иммунологической активности (*иммунометоды*). Однако часто встречается ситуация, когда клиническая картина заболевания не соответствует уровню гормона в крови, определенного с помощью иммунологического метода. При этом возникает необходимость в более точных методах определения уровня гормона в крови. На протяжении многих лет развивались и совершенствовались методы определения уровня гормона по его биологической активности – так называемые *биометоды*.

Биометоды измеряют функциональное влияние и характеризуют гормональную активность. Иммунометоды измеряют антигенные детерминанты и характеризуют концентрацию гормонов. Иммунометоды основаны на узнавании антигенов специфическими антителами, которые выработаны против гормона и измерены против референтного препарата.

Биометоды основаны на функциональном влиянии и дают информацию о биологической мощности гормона, в то время как

иммунометоды – на определении антигенных мест и дают информацию о концентрации этой структуры. Для измерения гормональной активности идеально служили бы клеточные системы, выделенные из соответствующего органа-мишени. Эти системы должны сохранить всю нормальную биологическую картину той же клетки *in vivo*. Измеряемые гормониндуцированные проявления должны отражать известные функции этого органа *in vivo*.

Применяемый биометод должен соответствовать следующим характеристикам:

- ✓ обладать достаточной чувствительностью для измерения более низкого уровня гормона в плазме по сравнению с нижней границей, характерной для здоровой популяции;
- ✓ иметь стабильную воспроизводимость при стандартизованных условиях выполнения анализа;
- ✓ являться специфичным для определяемых молекул или их фракций;
- ✓ быть технически не сложным, не требовать специального дорогостоящего оборудования.

Особые требования предъявляются к стандартам, используемым в методе. Материал, отобранный для стандартного гормона, должен быть природным, иметь высокую активность в классических *in vivo* биометодах.

Одним из определяющих достижений современной биологии и медицины является создание во второй половине XX века методов **радиоиммунологического определения** гормонов и других биологически активных соединений в разных средах и тканях организма, что позволило адекватно оценивать функциональное состояние эндокринной или любой другой физиологической системы.

Позже были созданы и другие методы иммуноанализа. В отличие от ранее использовавшихся биологических и химических методов, иммунологические методы обладают значительными преимуществами. Доступность и широкое использование этих методов приобретает определяющее значение для развития многих направлений в биологии и медицине. Разные методы иммуноанализа позволяют определять некоторые биологически активные вещества в диапазоне концентраций от 10^{-6} М до 10^{-12} М.

Нейзотопные методы исследования

Создание в начале 80-х годов прошлого века метода включения фермента в антитело или определяемый антиген обеспечило быстрое развитие методов иммуноферментного анализа (ИФА). Наиболее широко в качестве меченого компонента используется пероксидаза хрена и щелочная фосфатаза.

Твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA)

ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) получил наиболее широкое распространение при определении гормонов. В качестве твердофазных носителей при этом используются полистироловые микропланшеты. В ELISA применяются конъюгаты антител с ферментом, которые, реагируя с соответствующими «хромогенными» субстратами, образуют окрашенные соединения с определенными оптическими характеристиками.

Данный метод более производителен в сравнении с классическими жидкофазными методами РИА и ИФА. Однако необходимо отметить и недостатки данной технологии. В частности, высокую точность измерений могут обеспечить только специальные анализаторы. Кроме того, свойства и качество полистироловых микропланшетов, используемых в ELISA, при недостаточно оптимальной технологии их производства могут изменяться от партии к партии и даже от лунки к лунке, что существенно влияет на качество и воспроизводимость гормонального анализа.

Высокочувствительные методы 3-го поколения

Флуоресцентный иммуноанализ

В последнее время большое распространение в гормональной диагностике получил иммуноанализ с флуоресценцией, отсроченной во времени, где в качестве метки используется редкоземельный элемент европий. Это принципиально новый тип иммуноанализа. Данный метод позволяет определять стероидные гормоны в пикограммовых количествах, а гипофизарные гормоны – в концентрациях от 0,03 мЕд/л до 0,15 мЕд/л.

Люминесцентный иммуноанализ

Наиболее оптимальными методами иммуноанализа являются фотоэмиссионные или люминесцентные методы. Наибольшее применение в иммуноанализе получил метод с усилением люминесцентного свечения.

Метод усиленной люминесценции. Усиление реакции люминесценции при этом достигается добавлением люминогенного субстрата, люминола или изолуминола и специального усилителя, который резко увеличивает интенсивность и продолжительность свечения, что и обеспечивает высокую чувствительность, а также воспроизводимость метода. Световой сигнал регистрируется специальным анализатором – люминометром. Метод высокопроизводителен, обладает достаточной чувствительностью и специфичностью.

Для определения требуемого уровня специфичности в определении гормона в ряде случаев используются в сенсоре белки рецептора конкретного гормона. А это требует наличия высокого уровня специалистов в области молекулярной биологии.

Методы масс-спектрометрии

Любой из существующих методов иммуноанализа требует при его конструкции технологических разработок для каждого индивидуального гормона, включая моноклональные антитела с высокой специфичностью, а также повышение его чувствительности. Особую сложность при создании тест-систем представляет класс стероидных гормонов и их активных метаболитов, близких по химической структуре, многие из которых циркулируют в крови в очень низких концентрациях.

Появление и развитие технологии масс-спектрометрии в тандеме с высокоразрешающим жидкостным хроматографом, обеспечивающей высокую производительность, практически 100% специфичность, необходимую чувствительность и воспроизводимость, открывает новые возможности в исследовании гормонального обмена.

В отличие от прежнего технологически трудоемкого комплекса, газовый хроматограф/масс-спектрометр (GCMS), современная масс-спектрометрия (MS/MS) не требует трудоемкой процедуры подготовки исследуемого биологического материала.

Технология MS/MS высокопроизводительна и экономична по сравнению с современными автоматическими анализаторами, которые требуют больших затрат на постоянное приобретение дополнительных расходных материалов. В методе MS/MS расходные материалы сведены к минимуму. Технология MS/MS используется для определения разных по химической структуре гормонов, включая ТТГ, свободных T_4 и T_3 , эстрадиол и его метаболиты, а также ряд других биологически активных соединений.

Характеристика отдельных гормонов

Гормоны передней доли гипофиза

Передняя доля гипофиза секретирует несколько гормонов, в том числе трофических, стимулирующих активность других эндокринных желез. Секреция гормонов передним гипофизом контролируется гормонами, секретируемыми гипоталамусом, которые попадают в гипофиз через систему воротных кровеносных сосудов. Процесс образования гипоталамических гормонов зависит от деятельности высших мозговых центров. Кроме того, секреция гормонов гипоталамусом и гипофизом регулируется по механизму обратной связи гормонами, продукцию которых они стимулируют в органах-мишенях.

Гормон роста

Гормон роста (ГР) – полипептид, необходимый для нормального роста, хотя действует преимущественно опосредованно за счет стимуляции синтеза в печени инсулиноподобного фактора роста-1 (ИФР-1), известного также под названием соматомедин-С.

Выделение ГР регулируется двумя гипоталамическими гормонами – гормоном, высвобождающим ГР (соматолиберин), и гормоном, ингибирующим высвобождение ГР (соматостатин). В гипофизе соматомедин-С осуществляет отрицательную обратную связь, модулируя эффекты соматолиберина, а в гипоталамусе совместно с самим ГР он стимулирует выделение соматостатина.

Концентрация ГР в крови особо сильно колеблется в течение дня. Секреция стимулируется стрессовыми ситуациями, фи-

зическими нагрузками, падением концентрации глюкозы в крови, голоданием и потреблением определенных аминокислот. Эти стимулы используют в провокационных тестах при диагностировании достаточности ГР, особенно у детей. Секреция ГР тормозится при увеличении концентрации глюкозы в крови.

Соматостатин – гипоталамический пептид, состоящий из 14 аминокислот и ингибирующий выработку ГР. Этот гормон выполняет разные функции как в системе гипоталамус-гипофиз, так и в других системах организма.

Пролактин

Пролактин – полипептидный гормон, инициирующий и поддерживающий лактацию. Секреция пролактина регулируется гипоталамусом. Повышенная секреция данного гормона наблюдается при пролактинсекретирующих опухолях (пролактиномах) и опухолях гипофиза, которые нарушают кровоток от гипоталамуса. В отсутствие дофамина секреция пролактина является автономным процессом.

Секреция пролактина носит периодический характер, усиливаясь во время сна и при стрессе, у женщин зависит от эстрогенного статуса. Секреция гормона возрастает во время беременности, но если женщина после родов не кормит грудью, то его концентрация снижается до нормы в течение 7 дней. При грудном вскармливании содержание пролактина в крови начинает снижаться приблизительно через месяц. Дефицит пролактина является редким нарушением, но встречается, например, при инфаркте гипофиза.

Тиреотропный гормон

Тиреотропный гормон (ТТГ) – гликопротеид, состоящий из α - и β -субъединиц. α -субъединица аналогична таковой в составе гонадотропинов и практически идентична таковой для человеческого хорионического гонадотропина (чХГ), β -субъединица уникальна для ТТГ.

ТТГ связывается со специфическими рецепторами клеток щитовидной железы и стимулирует синтез и высвобождение ее гормонов. Секреция ТТГ возрастает под действием гипоталами-

ческого трипептида тиреолиберина (ТЛ), но этот эффект подавляется высокими концентрациями тиреоидных гормонов в крови.

Синтез тиреоидных гормонов регулируется по механизму отрицательной обратной связи: если их концентрация в плазме снижается, возрастает секреция ТТГ; если содержание тиреоидных гормонов возрастает, секреция ТТГ подавляется. При первичном гипотиреозе продукция ТТГ увеличена, при гипертиреозе – снижена. Недостаточность ТТГ может привести к развитию гипотиреоза, но гипертиреоз вследствие ТТГ-секретирующей опухоли – состояние очень редкое.

Гонадотропины

Фолликулостимулирующий гормон (ФСГ) и лютеинизирующий гормон (ЛГ) – гликопротеиды, состоящие из двух субъединиц: β -субъединицы индивидуальны для каждого гормона, α – одинаковы и подобны тем, которые входят в состав ТТГ и чХГ.

Синтез и высвобождение обоих гормонов стимулируется гипоталамическим декапептидом – гонадолиберинем (ГЛ). Его эффект модулируется циркулирующими в крови половыми стероидами. ГЛ секретируется эпизодически, что приводит к волнообразному изменению концентрации гонадотропинов в плазме, максимальная концентрация которых достигается каждые полтора часа. У мужчин ЛГ стимулирует синтез тестостерона клетками Лейдига. Тестостерон и эстрадиол, образованный в клетках Лейдига и в процессе метаболизма тестостерона, блокируют по механизму обратной связи действие ГЛ на секрецию ЛГ. ФСГ совместно с тестостероном, присутствующим в семенниках в высокой концентрации, стимулирует сперматогенез. Секреция ФСГ тормозится ингибином – гормоном, образующимся в процессе сперматогенеза.

В женском организме взаимодействия гормонов имеют более сложный характер. Секреция эстрогенов (прежде всего эстрадиола) яичниками стимулируется ФСГ в первую часть менструального цикла; оба гормона необходимы для развития граафовых фолликулов. По мере увеличения в крови концентрации эстрогенов секреция ФСГ уменьшается, пока эстрогены по механизму положительной обратной связи не вызовут одномоментное вы-

свобождение в большом количестве ЛГ и, в меньшей степени – ФСГ.

Повышение концентрации ЛГ стимулирует овуляцию и развитие желтого тела, а возрастание концентраций эстрогенов и прогестерона приводит к угнетению секреции ЛГ и ФСГ. До периода полового созревания концентрации ЛГ и ФСГ в плазме очень низкие и не наблюдается никакой реакции на экзогенный ГЛ.

Повышенные концентрации гонадотропинов выявляются у женщин при недостаточности яичников, обусловленной болезнью, или после естественной менопаузы. Высокие концентрации ФСГ отмечаются у мужчин с азооспермией, а при снижении секреции тестостерона растет содержание ЛГ.

Адренокортикотропный гормон

Адренокортикотропный гормон (АКТГ) – полипептид, биологическая функция которого заключается в стимулировании синтеза глюкокортикоидов надпочечниками. Секреция АКТГ регулируется гипоталамическим пептидом – кортиколиберином (КЛ), она происходит периодически, с суточными колебаниями: максимальная концентрация гормона в плазме отмечается около 8 утра, минимальная – в полночь. Секреция возрастает при стрессе и тормозится кортизолом. Процесс выработки кортизола корой надпочечников регулируется по принципу отрицательной обратной связи, но этот механизм, а также циркадные колебания подавляются при стрессе.

Повышенная секреция АКТГ гипофизом наблюдается при опухолях гипофиза (болезнь Кушинга) и при первичной недостаточности надпочечников (болезнь Аддисона). Гормон может секретироваться также эктопически негипофизарными опухолями. Избыточная продукция АКТГ сопровождается гиперпигментацией, обусловленной меланоцит-стимулирующим действием гормона. Сниженная секреция АКТГ может встречаться как самостоятельный феномен, но чаще всего она связана с общей недостаточностью гипофиза.

Нарушения функции передней доли гипофиза

Гипопитуитаризм

Повреждения гипофиза проявляются признаками его гипофункции. Частичный гипопитуитаризм наблюдается чаще, чем полная утрата функции гипофизом. Уменьшение секреции ГР – ранний признак недостаточности гипофиза. Проявление этого состояния зависит от ряда факторов, но возраст пациента относится к одним из важнейших. Секреция ГР и гонадотропинов (ЛГ раньше, чем ФСГ) нарушается раньше, чем выработка АКТГ. При недостаточности гипофиза появление признаков гипотиреоза не характерно. Изолированный дефицит отдельных гормонов передней доли гипофиза, как правило, врожденный. В большинстве случаев он обусловлен нарушением выработки соответствующего гормона гипоталамусом.

При подозрении на гипофункцию гипофиза проводят тесты со стимуляцией для выявления способности железы вырабатывать гормоны. Если предполагается опухоль гипофиза, необходимо установить избыточную секрецию гормона опухолью.

Нервная анорексия

Нервная анорексия – добровольное голодание, обусловленное, как правило, превратным представлением пациента об избыточности массы своего тела. Клинически она напоминает гипопитуитаризм. Для обоих состояний характерно развитие аменореи, обусловленной снижением секреции гонадотропинов. Однако при нервной анорексии не происходит утраты волос на лобке и в подмышечных ямках, и даже появляются на теле пушковые волосы (лануго). Снижение массы тела в данном случае выражено в гораздо большей степени, чем при гипопитуитаризме, а концентрации кортизола и ГР в плазме крови имеют тенденцию к увеличению.

Недостаточность гормона роста

Недостаточность ГР – редкая, но важная причина отставания в росте. У здоровых детей концентрация ГР в плазме может быть настолько низкой, что ее не удастся определить. Статус ГР можно определить с помощью различных провокационных проб

со стимуляцией. Хотя эти тесты широко применяются при выявлении причин задержки роста, их способность оценить физиологическую секрецию ГР проблематична и, кроме того, они дают как ложноположительные, так и ложноотрицательные результаты. Более достоверную информацию можно получить, измеряя секрецию ГР посредством частого отбора проб крови во время сна через введенную канюлю.

До середины 1980-х гг. XX века единственным источником ГР для пациентов, нуждавшихся в заместительной терапии, были гипофизы, взятые от умерших людей. В настоящее время доступен биосинтетический ГР человека, вырабатываемый бактериями, в геном которых введен участок ДНК, кодирующий ГР. Установлено, что большинство случаев изолированного дефицита ГР обусловлено недостаточностью соматолиберина (СЛ).

У взрослых уменьшение секреции ГР не имеет существенных последствий, пока не установлено, что заместительная терапия должна проводиться обязательно. Изучается необходимость назначения ГР пациентам с тяжелыми катаболическими реакциями для усиления анаболических процессов.

Опухоли гипофиза

Опухоли гипофиза могут быть чисто деструктивными, но часто они являются функциональными, вырабатывая избыточное количество какого-либо гормона. Частота встречаемости гиперсекреции у пациентов с гипофизарными опухолями следующая: пролактин > ГР > АКТГ > гонадотропины > ТТГ. Любая опухоль гипофиза может вызвать клинические симптомы вследствие разрушения его нормальной ткани или внутричерепных пространственных нарушений – головную боль, тошноту и отек сосочков зрительного нерва. Когда опухоль растет вперед и давит на зрительный перекрест, развиваются дефекты полей зрения, что может привести к его потере.

Акромегалия и гигантизм

Акромегалия и гигантизм в 90% случаев являются следствием гиперсекреции ГР опухолями гипофиза, приводящей к усиленному росту мягких тканей и костей. Если это происходит до сращивания эпифизов длинных костей, развивается гигантизм.

Чаще ГР-секретирующие опухоли встречаются у взрослых. Они сопровождаются развитием акромегалии, при которой усиливается рост мягких тканей, кистей, стоп, челюстей и внутренних органов. Концентрация ГР в случайной пробе сыворотки обычно повышена, но, поскольку в норме секреция ГР происходит дискретно, клинический диагноз должен быть подтвержден биохимическим анализом, выявляющим отсутствие подавления секреции ГР при проведении теста на толерантность к глюкозе.

У многих пациентов с акромегалией ТЛ вызывает увеличение секреции ГР, но не установлены ни причины, ни значение этого явления. В плазме крови у пациентов с акромегалией повышена концентрация соматомедина-С (ИФР-1). Измерение содержания соматомедина-С важно для установления случаев пограничных состояний и оценки реакции пациента на проводимое лечение.

У 25-30% пациентов с акмегалией выявляется гиперпролактинемия, обусловленная нарушением нормального процесса торможения секреции пролактина или секрецией этого гормона опухолью. Может нарушаться секреция других гормонов гипофиза. В ряде случаев акромегалия является проявлением множественной эндокринной неоплазии.

Гиперпролактинемия

Гиперпролактинемия – распространенное эндокринное нарушение. Она рассматривается как одна из основных причин бесплодия как у мужчин, так и у женщин. Кроме того, она вызывает импотенцию у мужчин и нарушает менструальный цикл у женщин. Это состояние может развиваться вследствие действия различных лекарств, которые или блокируют допаминергические рецепторы, или снижают содержание допамина в мозге, в дополнение к опухоли гипофиза (пролактинома) или его деструктивным повреждениям, которые нарушают нормальное торможение секреции пролактина. Пролактиномы, как правило, невелики, но встречаются и большие опухоли – макроаденомы, которые разрушают гипофизарную ямку и располагаются вне этого образования. Пролактиномы чаще возникают у женщин, но у мужчин более вероятно формирование макроаденомы.

Имеется несколько динамических тестов для выявления пролактинсекретирующих опухолей. Чаще всего определяется реакция пролактина на введение ТЛ, которая снижена у большинства пациентов с пролактиномами. Тест нельзя считать специфичным, а его результаты переменны. Если же опухоль удалось диагностировать, обязательно следует оценить возможную недостаточность секреции других гормонов передней доли гипофиза. При небольших размерах опухоли другие функции гипофиза, как правило, не нарушены.

Болезнь Кушинга

Болезнь Кушинга – патология, при которой повышается секреция кортизола корой надпочечников в ответ на возросшую продукцию АКТГ передней долей гипофиза. У пациентов, которым в целях лечения болезни Кушинга проводится адреналэктомия, впоследствии могут развиваться гиперпигментация и клинические признаки большой опухоли гипофиза (синдром Нельсона). Пигментация обусловлена меланоцит-стимулирующей активностью АКТГ и его предшественников. Синдром Нельсона редко наблюдается у пациентов, которым наряду с адреналэктомией проведено облучение или удаление гипофиза.

Гормоны задней доли гипофиза

Задняя доля гипофиза секретирует два гормона: ***вазопрессин (антидиуретический гормон, АДГ) и окситоцин***. Эти гормоны синтезируются в гипоталамусе, по аксонам нейронов передаются в заднюю долю гипофиза и уже оттуда высвобождаются в кровоток. Окситоцин участвует в регуляции сократимости матки и продукции молока в лактирующей молочной железе. Нарушения его секреции достаточно редки и не имеют большого клинического значения.

Вазопрессин

Вазопрессин играет важную роль в регуляции тоничности внеклеточной жидкости и, опосредованно, – внутриклеточной жидкости и водного баланса. Избыточная секреция гормона приводит к гипонатриемии, при которой возникает риск водной интоксикации. Снижение секреции сопровождается развитием не-

сахарного диабета, при котором происходит нерегулируемая экскреция. Он обычно вызван заболеванием гипофиза или гипоталамуса, но может быть следствием способности почек реагировать на гормон (нефрогенный несахарный диабет).

При несахарном диабете дефицит вазопрессина приводит к жажде и полиурии. Если гипоталамический центр жажды не поврежден, происходит усиленное потребление воды (полидипсия). Дифференциальная диагностика проводится с сахарным диабетом, хронической почечной недостаточностью, гиперкальциемией и гипокалиемией. Непреодолимое (компульсивное) желание пить воду (психогенная или первичная полидипсия) также вызывает полиурию. Однако в этом случае полидипсия вторична по отношению к возросшему потреблению воды, а при несахарном диабете она является ответом на полиурию.

Если существуют сомнения в правильности диагноза, рекомендуется провести водный депривационный тест. Это эффективная биологическая проба по определению вазопрессина, содержание которого в плазме измерить трудно.

Если результаты теста с водной депривацией неоднозначны, необходимо определить реакцию вазопрессина плазмы на введение гипертонического раствора натрия хлорида. Реакция является нормальной у пациентов, страдающих нефрогенным несахарным диабетом или первичной полидипсией, но снижена при центральном несахарном диабете.

Гормоны надпочечников

Кортизол

С белками, в основном с транскортином (кортизолсвязывающим глобулином), связано 95% кортизола в крови. Количество свободного кортизола, которое может экскретироваться в мочу в неизмененном состоянии, очень мало. При нормальных концентрациях кортизола транскортин практически полностью насыщен.

Содержание кортизола в плазме подвержено суточным колебаниям: самые высокие концентрации наблюдаются утром, самые низкие — ночью. Секреция кортизола, опосредованная АКТГ,

усиливается при стрессе, поэтому для правильной интерпретации результатов стресс должен быть минимальным. Исследования гипо- или гиперфункции надпочечников часто включают измерение концентрации кортизола после стимуляции или подавления его секреции.

При интерпретации результатов определения кортизола в плазме следует помнить, что синтетический аналог – преднизолон – может перекрестно реагировать с кортизолом в процессе иммунохимического анализа. С дексаметазоном перекрестной реакции не возникает.

Альдостерон

Концентрация альдостерона в плазме варьирует в зависимости от положения тела. Кровь у пациентов необходимо брать после длительного нахождения их в горизонтальном положении в течение ночи, а повторную пробу (для сравнения) – после пребывания в вертикальном положении.

Секреция альдостерона стимулируется ренином, поэтому нередко целесообразно одновременно с альдостероном измерять активность ренина в плазме, чтобы выяснить, автономна ли секреция альдостерона.

Андрогены

Определение концентрации надпочечниковых андрогенов помогает в диагностике и лечении врожденной гиперплазии надпочечников и при исследовании причин вирилизации у женщин.

Заболевания коры надпочечников

Гипофункция надпочечников (болезнь Аддисона)

Случаи, впервые описанные Аддисоном, были вызваны туберкулезом, но в настоящее время превалирует аутоиммунная причина заболевания. В этих случаях обычно обнаруживаются аутоантитела к тканям надпочечников, а также возможно аутоиммунное заболевание других органов, например пернициозная анемия.

Наиболее частой причиной гипофункции надпочечников является супрессия гипоталамико-адренальной оси глюкокортикоидами, назначаемыми в терапевтических целях. Хотя во время ле-

чения у пациентов могут развиваться признаки синдрома Кушинга, резкая отмена стероидов или неназначение увеличенных их доз во время стресса (например при оперативном вмешательстве) может вызвать острую надпочечниковую недостаточность. Нормальная гипофизарно-адреналовая функция восстанавливается при отмене стероидов очень медленно, и в случаях прекращения стероидной терапии дозы стероидов следует снижать постепенно.

Большинство клинических проявлений надпочечниковой недостаточности обусловлены дефицитом глюко- и минералокортикоидов. Усиленная пигментация обусловлена высокой концентрацией АКТГ в плазме. Этот гормон оказывает некоторое меланоцитстимулирующее действие, а его концентрация возрастает в результате утраты отрицательного обратного контроля кортизолом.

Надпочечниковая недостаточность обычно развивается постепенно, но может возникнуть и остро. Надпочечниковый криз является неотложной клинической ситуацией. При этом развивается тяжелая гиповолемия, шок и гипогликемия. Криз может провоцироваться стрессом, обусловленным инфекцией, травмой или операцией, у пациентов с начинающейся надпочечниковой недостаточностью. У пациентов, получающих глюкокортикоиды как в физиологических (заместительная терапия), так и в терапевтических дозах (при тяжелых воспалительных заболеваниях), также имеется риск развития надпочечниковой недостаточности, если доза гормона не была увеличена. Кровоизлияние в надпочечники может развиваться как осложнение антикоагулянтной терапии и при менингококковой септицемии и также привести к острой надпочечниковой недостаточности.

Надпочечниковая недостаточность нередко возникает вторично при недостаточности гипофиза, когда сами надпочечники не поражены, но снижена стимуляция их функции АКТГ. При вторичной надпочечниковой недостаточности может развиваться гипотензия, так как при недостатке кортизола снижается чувствительность гладкой мускулатуры артериол к катехоламинам. Иногда присутствует гипонатриемия, поскольку дефицит кортизола снижает способность почек экскретировать воду, но потери солей почками не происходит, потому что секреция альдостерона не зависит от АКТГ.

Лучший способ разграничить первичную и вторичную надпочечниковую недостаточность – это определение концентрации АКТГ в плазме. При первичной недостаточности продукция АКТГ гипофизом значительно увеличена, так как нарушен механизм отрицательной обратной связи, осуществляемой кортизолом, в то время как при вторичной надпочечниковой недостаточности концентрация АКТГ в плазме низкая.

Пациенты, с недостаточностью коры надпочечников нуждаются в пожизненной заместительной терапии. Гидрокортизон обычно принимают два раза в день неравными дозами, утром (большая доза) и вечером. Адекватность заместительной терапии может быть оценена клинически и путем определения концентрации кортизола в плазме в течение дня через определенные промежутки времени. Это позволяет выявить слишком высокую концентрацию вскоре после приема дозы препарата или слишком низкую концентрацию незадолго перед приемом очередной дозы. Результаты лечения минералокортикоидами можно установить, определяя активность ренина в плазме крови: повышенная активность свидетельствует о недостаточной заместительной терапии, а полная супрессия – об избыточной. Гидрокортизон обладает некоторой минералокортикоидной активностью, и у отдельных пациентов симптомы могут быть купированы только им, в особенности, если они соблюдают высокосолевую диету.

Гиперфункция надпочечников

При синдроме Кушинга наблюдается преимущественное повышение продукции глюкокортикоидов, но выработка минералокортикоидов и андрогенов также может быть избыточной. При синдроме Конна только минералокортикоиды вырабатываются в избыточном количестве.

Синдром Кушинга

Гипофизарно-зависимая гиперфункция надпочечников известна как болезнь Кушинга. Клинические проявления обусловлены в первую очередь избытком кортизола, но сам кортизол и его предшественники обладают некоторой минералокортикоидной активностью. Поэтому при лабораторных исследованиях час-

то обнаруживается задержка натрия, ведущая к гипертензии, и потеря калия, вызывающая гипокалиемический алкалоз.

Псевдосиндром Кушинга, при котором у пациентов появляются кушингоидные признаки и сдвиги биохимических показателей, соответствующие таковым при синдроме Кушинга, может возникать у алкоголиков и при тяжелой депрессии. Псевдосиндром Кушинга, обусловленный приемом алкоголя, обычно быстро проходит при отказе от него.

В обследовании пациентов с подозрением на синдром Кушинга существуют две диагностические ступени: выявление высоких концентраций кортизола в плазме и выяснение возможной причины. Достаточно часто можно видеть пациентов с кушингоидным видом, однако далеко не всегда причиной является синдром Кушинга. Поэтому нередко полезно амбулаторно провести предварительное обследование, чтобы исключить пациентов, не страдающих заболеванием надпочечников, и выявить тех, кто нуждается в дальнейшем обследовании.

В норме экскреция кортизола с мочой за сутки составляет <300 нмоль. Повышенная экскреция характерна для синдрома Кушинга (хотя может наблюдаться и при псевдосиндроме Кушинга и выраженном ожирении). Если моча собрана не полностью, можно недооценить истинную экскрецию.

Синдром Конна

Синдром Конна характеризуется избыточной продукцией альдостерона. Примерно в 80% случаев это обусловлено аденомой надпочечников, в оставшихся случаях – диффузной гипертрофией клеток клубочковой зоны, вырабатывающих альдостерон, в обоих надпочечниках. Большинство клинических проявлений обусловлено гипокалиемией, возникающей вследствие повышенного выведения калия почками. Пациенты также страдают гипертензией, которая развивается в результате задержки натрия, обусловленной альдостероном.

Альдостеронизм наблюдается также у пациентов с повышенной активностью ренина в плазме. Это вторичный альдостеронизм, поскольку надпочечники отвечают на свой нормальный трофический стимул, в отличие от автономной секреции альдостерона при синдроме Конна, который обозначается как пер-

вичный альдостеронизм. При этом активность ренина в плазме низкая. Вторичный альдостеронизм встречается гораздо чаще, чем первичный, и может быть связан с рядом состояний, при которых повышена секреция ренина. Наличие или отсутствие у пациента гипертензии зависит от природы основного заболевания.

При обследовании пациентов с гипокалиемией и гипертензией многие возможные причины вторичного альдостеронизма могут быть исключены либо на основании клинической симптоматики, либо с помощью простых лабораторных исследований. Концентрация натрия в плазме при первичном альдостеронизме обычно близка к верхней границе нормы или немного повышена; при вторичном альдостеронизме она обычно снижена. Тест, который позволяет окончательно дифференцировать первичный и вторичный альдостеронизм, заключается в одновременном определении концентрации альдостерона и активности ренина в плазме. При первичном альдостеронизме активность ренина в плазме снижена; при вторичном ренин является причиной избыточной секреции альдостерона и его активность повышена. Однако определение активности ренина технически сложно и проводится только на поздних этапах обследования пациентов, у которых есть серьезные основания подозревать наличие первичного альдостеронизма.

Первичный альдостеронизм следует подозревать у любого пациента с гипертензией при низкой концентрации калия в плазме. Важной причиной гипокалиемии являются диуретики, а их использование при гипертензии – наиболее частая причина сочетания гипокалиемии и повышенного артериального давления.

При болезни Конна гипокалиемия вызывается потерей калия через почки. При гипокалиемии калий должен абсорбироваться максимально, и если у пациента с гипокалиемией, не получающего диуретики, выведение калия почками составляет более 30 ммоль/сут, можно подозревать первичный альдостеронизм.

Концентрация альдостерона и активность ренина в плазме зависят от положения тела. У здоровых людей секреция ренина и, следовательно, альдостерона возрастает в вертикальном положении, что связано с уменьшением почечного кровотока. Исходное определение активности ренина и концентрации альдостерона должно проводиться, когда пациент находится в горизонтальном

положении. Зависимость концентрации альдостерона от положения тела может помочь определить, обусловлен синдром Конна опухолью надпочечников или их гиперплазией.

Врожденная гиперплазия надпочечников (ВГН)

Данный синдром охватывает целую группу наследственных метаболических расстройств биосинтеза стероидных гормонов надпочечников. Клинические проявления каждого нарушения зависят от места неполноценного фермента в каскаде биосинтеза, которое в конечном счете определяет, какие гормоны и предшественники будут вырабатываться.

Примерно 90% всех случаев ВГН обусловлены дефицитом 21-гидроксилазы. Большая часть из оставшихся 10% случаев обусловлена дефицитом 11 β -гидроксилазы. Недостаточность 21-гидроксилазы зачастую частичная, и нормальный синтез кортизола может поддерживаться за счет увеличения секреции АКТГ гипофизом. Именно это вызывает гиперплазию желез. Из-за отсутствия фермента его субстрат накапливается, что приводит к увеличению образования адреналовых андрогенов.

Девочки с ВГН могут родиться с неразвитыми половыми органами, но если имеет место только частичный дефицит фермента, заболевание может не проявиться до наступления периода половой зрелости, когда будут отмечены гирсутизм, аменорея или бесплодие.

Мужчины нередко обращаются к врачу по поводу псевдо-раннего полового созревания. Частичная и полная формы недостаточности 21-гидроксилазы возникают как два разных заболевания, каждое из которых проявляется внутри семей, затронутых генетическим дефектом.

Диагноз ставится на основании повышенной концентрации 17 α -гидроксипрогестерона (17-ГОП) в плазме спустя два дня после рождения (до этого срока в крови ребенка еще может присутствовать материнский 17-ГОП). Лечение включает замещение кортизола, при необходимости – минералокортикоидов, которые должны подавлять излишнюю выработку АКТГ и, следовательно, избыточный синтез андрогенов. Мониторинг лечения осуществляется путем измерения концентрации 17-ГОП в плазме.

Заболевания мозгового вещества надпочечников

Основной патологией мозгового вещества надпочечников, представляющей интерес с точки зрения клинической биохимии, являются **феохромоцитомы**. Это опухоли, секретирующие катехоламины. Примерно 10% феохромоцитом обнаруживаются в экстрамедуллярной хромоаффинной ткани, которая имеет такое же эмбриональное происхождение, что и собственно мозговое вещество надпочечников.

Пациенты с феохромоцитомой обычно обращаются с жалобами на гипертензию, которая, как правило, присутствует постоянно. Другими клиническими признаками являются сердцебиения, потливость, тремор и дискомфорт в области живота.

После постановки диагноза местонахождение опухоли определяется с помощью методов визуализации, с учетом того факта, что феохромоцитомы, расположенные вне надпочечников, обычно секретируют больше норадреналина, чем адреналина, а опухоли собственно мозгового вещества надпочечников – наоборот.

Хотя феохромоцитомы доброкачественны в 90% случаев, все опухоли должны удаляться оперативным путем. Однако операция эта представляет потенциальную угрозу для жизни пациента, так как во время ее проведения большое количество катехоламинов может попасть в системный кровоток. Следует также отметить, что 10% пациентов имеют множественные опухоли.

Гормоны щитовидной железы

Щитовидная железа (ЩЖ) является самой большой эндокринной железой организма человека. Масса ЩЖ здорового взрослого человека составляет около 18-20 г. Железа заключена в фиброзную капсулу и прикрепляется к передней и боковым поверхностям гортани рыхлой соединительной тканью. Две доли щитовидной железы, располагающиеся по обе стороны трахеи, соединяются между собой тонкой полоской ткани – перешейком. Ткань ЩЖ заполнена преимущественно сферическими тиреоидными фолликулами (рис. 36).

Каждый фолликул представляет собой слой кубовидных клеток (тиреоцитов), окружающих полость, заполненную коллоидом, главной составляющей которого является белок тиреоглобулин (ТГ). Клетки обращены внутрь полости апикальными

поверхностями, на которых имеются микроворсинки, проникающие в коллоид.

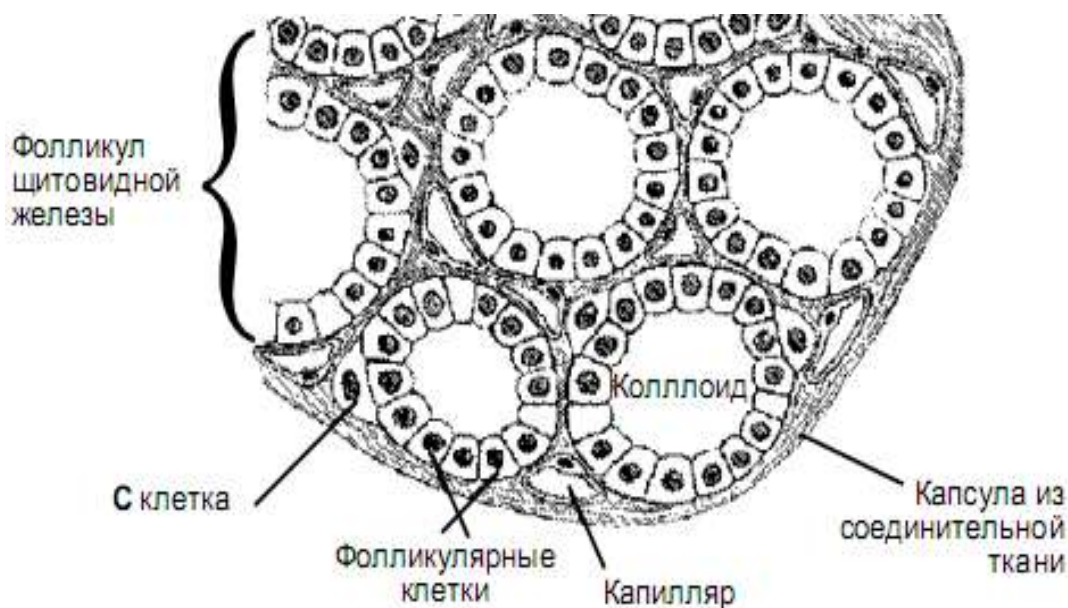


Рисунок 36. – Срез щитовидной железы

Между фолликулами располагаются кровеносные капилляры. Тиреоглобулин служит исходным субстратом для синтеза гормонов тироксина (T_4) и трийодтиронина (T_3). Регуляцию синтеза и секреции T_3 и T_4 осуществляет тиреотропный гормон (ТТГ), вырабатываемый в гипофизе.

Тироксин

Тироксин (тетрайодтиронин – T_4) – тиреоидный гормон, содержащий 4 атома йода. Многостадийный биосинтез T_4 из тиреоглобулина происходит в ЩЖ. Основное количество органического йода в организме человека находится в виде тироксина. При этом большая часть T_4 (99%) циркулирует связанном с белками плазмы состоянии.

Концентрация тироксина в сыворотке крови – общепринятый показатель функции ЩЖ, позволяющий довольно четко разграничивать гипер- и гипотиреоз. Измерение концентрации тироксина в сыворотке крови показано при гипертиреозе для дифференциации тиреоидита, автономной аденомы и аденокарциномы, при состояниях с повышенным уровнем тироксинсвязывающего глобулина (беременность, генетически обусловленное по-

вышение), при остром гепатите и ожирении.

Низкое содержание T_4 в сыворотке наблюдается при гипотиреозе, состояниях с пониженным уровнем концентрации тироксинсвязывающего глобулина и физической нагрузке. Снижение концентрации T_4 происходит также при гемолизе. Уровень T_4 в крови понижается при приеме аминосалициловой кислоты, андрогенов, ацетилсалициловой кислоты, кортикостероидов, лития, йодида калия, сульфаниламидов, трийодтиронина и др. Количественное определение свободного тироксина – более надежный параметр для оценки состояния ЩЖ, чем определение общего трийодтиронина.

Трийодтиронин

Трийодтиронин (T_3) – гормон щитовидной железы, содержащий 3 атома йода (58% от общей массы молекулы). В ЩЖ синтезируется небольшая часть T_3 , основное же его количество образуется путем ферментативного дейодирования T_4 в периферических тканях (печени, почках, сердечной мышце и др.). Наиболее интенсивно этот процесс идет в передней доле гипофиза.

Только 0,3% циркулирующего в сыворотке T_3 находится в свободной форме, основная же его часть связана с сывороточными белками, однако эта связь гораздо слабее, чем у T_4 . В пересчете на 1 моль T_3 имеет в 4 раза более высокую биологическую активность и в 10 раз большую скорость метаболизма, чем T_4 . Многие биологические эффекты гормонов ЩЖ реализуются именно через действие T_3 .

Концентрация общего T_3 в сыворотке крови примерно в 50 раз ниже уровня T_4 . У мужчин содержание T_3 в крови на 5-10% выше, чем у женщин. Концентрация гормона в сыворотке крови новорожденных составляет 1/3 от содержания у взрослых, но уже в течение двух первых суток она возрастает до этого уровня. В раннем детском возрасте содержание T_3 несколько снижается, но в подростковом возрасте его уровень достигает концентрации, характерной для здорового взрослого человека. После 65 лет наблюдается более заметное снижение T_3 в сыворотке по сравнению со снижением T_4 . Если определение ТТГ и T_4 достаточно полно характеризует функциональную активность ЩЖ, то анализ

T_3 имеет ограниченный круг показаний для выявления тиреоидной патологии, обусловленной недостатком этого гормона: дифференциальная диагностика T_3 -токсикоза, тиреотоксикоза, рецидив тиреотоксикоза с симптоматическим повышением уровня концентрации T_3 , острый тиреотоксикоз после подавляющей терапии L-тироксина.

Примерно 10% пациентов с клиническими признаками гипотиреоза имеют нормальный уровень T_3 . При определении T_3 в сыворотке крови необходимо учитывать изменения его концентрации после экзогенного введения гормонов ЩЖ. Повышенные концентрации T_3 в сыворотке крови наблюдаются при приеме эстрогенов, героина, метадона, пероральных контрацептивов. Понижение концентрации T_3 в крови пациентов отмечено при применении андрогенов, даназола, дексаметазона, при приеме производных кумарина, салицилатов и др.

Свободные T_3 и T_4

Только незначительная часть тироксина и трийодтиронина находится в кровотоке в свободной форме, но именно они принимают непосредственное участие в реализации в организме человека множества регуляторных функций. Чаще всего в лабораториях определяют содержание общего T_3 , и T_4 , а также ТТГ. В случае субклинического гипертиреоза уровни концентраций общих T_3 и T_4 остаются в норме, тогда как содержание свободного T_4 возрастает в несколько раз. У пациентов с явным гипотиреозом концентрация как общего, так и свободного T_4 понижена; при субклинической форме заболевания снижается только содержание свободной формы гормона. Поэтому определение концентрации свободного T_4 имеет большое значение для эффективной диагностики. Уровень свободного T_4 не зависит от концентрации тироксинсвязывающих белков, что позволяет использовать результат его анализа для адекватной оценки гормональной функции ЩЖ.

Измерение концентрации свободного T_4 часто используют для мониторинга лечения пациентов с тиреотоксикозом, поскольку она быстрее, чем ТТГ, реагирует на тиреостатическую терапию.

Тиреоглобулин

Тиреоглобулин (ТГ) – гликопротеид, в состав которого вхо-

дят йодированные производные аминокислоты тирозина. ТГ синтезируется в тиреоцитах и секретируется в просвет фолликулов, где осуществляется синтез тиреоидных гормонов. В щитовидной железе ТГ выполняет функцию накопления йодпроизводных тирозина, использующихся по мере необходимости для синтеза тироксина. Секрецию ТГ контролирует тиреотропный гормон. Период полужизни ТГ в плазме крови – 3-4 дня. В норме в кровоток поступает лишь небольшая часть ТГ (10%). Однако при злокачественных опухолях ЩЖ эта ситуация резко меняется – опухолевые клетки выделяют в кровоток значительные количества ТГ. Этот эффект наблюдается у всех пациентов с метастазами дифференцированного рака ЩЖ, независимо от способности опухоли накапливать йод. Поэтому в клинической эндокринологии ТГ используют как маркер рака ЩЖ.

Определение концентрации ТГ в сыворотке крови имеет большое значение для выявления метастазов карциномы щитовидной железы. Известно, что карцинома ЩЖ, а также ее метастазы при стимуляции ТТГ продуцируют тиреоглобулин. Снижение концентрации ТГ после радикального лечения пациента свидетельствует об отсутствии у него метастазов. Нарастание содержания ТГ служит признаком генерализации процесса.

Нарушения функций щитовидной железы

Нарушения функциональной активности ЩЖ могут обнаруживаться у пациентов с разными симптомами. При тиреотоксикозе чаще всего изменяется самочувствие: появляются раздражительность, плаксивость, суетливость, чрезмерная потливость, нарушения сна, тремор конечностей; а при гипотиреозе – вялость, медлительность, быстрая утомляемость, сонливость, ухудшение памяти, боли в пояснице. Как правило, клиническая картина стерта, и поражение ЩЖ протекает под маской других заболеваний. У одних пациентов могут преобладать неврологические симптомы, тогда как у других основное клиническое проявление патологии ЩЖ – синдром артериальной гипертензии или боли за грудиной. Иногда ведущими становятся симптомы поражения желудочно-кишечного тракта – тошнота, метеоризм, запоры.

Нарушения функции тиреоидной системы приводит к целому ряду патологических состояний и заболеваний. К ним относят

снижение фертильности, повышенную перинатальную смертность, мертворождение, врожденные аномалии развития детей и подростков, кретинизм, задержку психического и физического развития, ухудшение интеллектуальных способностей у взрослых. Все эти последствия йодного дефицита в организме связывают с недостаточной продукцией тиреоидных гормонов и компенсаторными реакциями, направленными на преодоление йодной недостаточности. У детей даже относительный дефицит тиреоидных гормонов приводит к более тяжелым последствиям, чем у взрослых (чем младше ребенок, тем тяжелее патология ЩЖ). Даже легкий недостаток йода при развитии плода отрицательно влияет на последующее нейropsychическое развитие ребенка.

Наиболее тяжелым проявлением дефицита йода является **кретинизм**. Для него характерны: тяжелая умственная отсталость, низкорослость, деформация скелета, глухонмота. Выделяют неврологическую и микседематозную формы кретинизма. Первую объясняют недостаточностью тиреоидных гормонов в критическом периоде развития плода в начале второго триместра беременности. Микседематозную форму считают следствием хронического гипотиреоза на поздних этапах внутриутробной, и ранних стадиях постнатальной жизни.

У пожилых людей при длительном недостатке йода в ткани ЩЖ нередко формируются очаги, секретирующие тиреоидные гормоны автономно, т.е. независимо от ТТГ. Так развивается узловый или многоузловой токсический зоб; во многих случаях тиреотоксикоз индуцируется внезапным увеличением доступности йода в виде продуктов с высоким его содержанием или йодсодержащих лекарственных или диагностических препаратов.

Наиболее сложна для диагностики скрытая патология ЩЖ – **субклинический гипертиреоз и субклинический гипотиреоз**.

Субклинический гипертиреоз – состояние повышенной функции ЩЖ, для которого характерна пониженная концентрация ТТГ в сыворотке крови, в то время как уровни тиреоидных гормонов в сыворотке крови находятся в пределах нормы. Выявить субклинический гипертиреоз, как правило, удастся только по результатам лабораторных исследований, поскольку отсутствуют его клинические симптомы. Чаще всего он развивается на

фоне длительно существующего многоузлового зоба, а также у пациентов с тиреотоксикозом, пролеченных тиреостатиками. Эти группы пациентов, несмотря на отсутствие классических симптомов гипертиреоза, нуждаются в периодическом измерении концентрации ТТГ и тиреоидных гормонов. Известно, что наиболее чувствительными к повышению или снижению содержания тиреоидных гормонов в организме являются сердечно-сосудистая и центральная нервная система. Субклинический гипертиреоз может сопровождаться развитием патологии печени, причем это наблюдается чаще, чем при явном тиреотоксикозе. В большинстве случаев расстройства печени, обусловленные тиреотоксикозом, полностью обратимы после его раннего лечения.

Субклинический гипотиреоз – состояние пониженной функции ЩЖ, при котором наблюдается повышенная концентрация ТТГ, а уровни тиреоидных гормонов находятся в пределах нормы.

Половые гормоны

Андрогены

Наиболее важным андрогеном в организме является тестостерон. Кроме того, к этой группе относится андростендион и дигидроэпиандростенон (ДГЭА).

Тестостерон – мощный анаболический гормон, необходимый для развития вторичных половых признаков у мужчин. Секретируется клетками Лейдига в яичках под влиянием лютеинизирующего гормона. Концентрация тестостерона в крови очень низкая до периода полового созревания, но затем быстро повышается.

В гораздо меньшем количестве тестостерон присутствует в организме женщин. Примерно треть его секретируется в яичниках, остальная часть – результат метаболизма андрогенов надпочечников.

В крови около 97% гормона связано с глобулином, связывающим половые гормоны (ГСПГ), альбумином и другими белками. Тканям доступен только свободный тестостерон. Биологи-

ческая активность гормона в основном связана с дигидротестостероном (ДГТ), который образуется в тканях из тестостерона.

Эстрогены

Основным овариальным гормоном является *17β-эстрадиол*. Эстрогены секретируются желтым телом и плацентой. Они отвечают за развитие женских вторичных половых признаков, стимулируют рост овариальных фолликулов и пролиферацию эндометрия матки в первой половине менструального цикла.

Концентрация эстрогенов в плазме до полового созревания крайне низка. В период полового созревания синтез эстрогенов увеличивается и до менопаузы, если не возникает беременность, содержание гормонов в крови подвержено циклическим колебаниям. После менопаузы эстрогены образуются только в процессе метаболизма надпочечниковых андрогенов, и поэтому их концентрации в плазме снижаются до крайне низких значений.

В плазме эстрогены транспортируются в связанной с белками форме, 60% при этом связаны с альбумином, остальная часть – с ГСПГ. В несвязанной форме находятся до 3% эстрогенов. Эстрогены стимулируют синтез ГСПГ и других транспортных белков, в частности тироксинсвязывающего глобулина (ТСГ) и транскортина.

Эстрадиол в небольших концентрациях присутствует в плазме крови мужчин. Примерно одна треть его секретируется яичками, остальная часть образуется в результате метаболизма тестостерона в печени и жировой ткани. Медленно увеличивающиеся или постоянно высокие концентрации эстрогенов совместно с прогестероном подавляют секрецию гонадотропина гипофизом по механизму отрицательной обратной связи, но быстрый рост концентрации эстрогенов, наблюдающийся непосредственно перед овуляцией, стимулирует секрецию ЛГ (положительная обратная связь).

Прогестерон

Прогестерон – важный промежуточный продукт синтеза стероидных гормонов, секретируется в значимых количествах только желтым телом и плацентой. Его концентрация в плазме повышается во второй половине менструального цикла, но затем

снижается, если не происходит зачатия. В крови прогестерон связывается с альбумином и транскортином, в свободной форме находится только 1-2% гормона.

Прогестерон оказывает важное влияние на матку, включая подготовку эндометрия к имплантации продуктов оплодотворения, а также на влагалище и молочные железы. Данный гормон обладает пирогенным эффектом и вызывает повышение базальной температуры тела при овуляции.

Глобулин, связывающий половые гормоны

ГСПГ связывает в плазме и тестостерон, и эстрадиол, но большее сродство имеет к первому гормону. Концентрация ГСПГ в крови мужчин примерно в 2-2,5 раза меньше, чем у женщин. Если концентрация ГСПГ снижается, отношение свободного тестостерона к свободному эстрадиолу увеличивается, хотя при этом имеет место абсолютное повышение концентраций обоих гормонов. Если концентрация ГСПГ увеличивается, отношение свободного тестостерона к свободному эстрадиолу уменьшается. Таким образом, результатом увеличения концентрации ГСПГ является усиление эффектов эстрогенов, а уменьшение концентрации данного глобулина ведет к усилению андрогенных эффектов.

Нарушения функции мужских половых желез

Гипогонадизм

Для данного состояния характерно нарушение или сперматогенеза, или продукции тестостерона, или обоих этих процессов. Гипогонадизм может быть первичным или вторичным, связанным с заболеванием гипофиза или гипоталамуса.

Первичный гипогонадизм может быть результатом нарушения функции семенных канальцев или функции клеток Лейдига. В первом случае заболевание ведет к бесплодию, обусловленному уменьшением выработки сперматозоидов, вторичные половые признаки развиваются при этом нормально. При нарушении функции клеток Лейдига нарушаются все процессы, регулирующиеся тестостероном, в том числе сперматогенез. Последствия снижения секреции тестостерона зависят от времени возникновения заболевания. Вторичные половые признаки могут

частично присутствовать, если нарушение секреции произошло после полового созревания.

Биохимические тесты важны для подтверждения диагноза первичной, и в меньшей степени – вторичной недостаточности функции яичек. При определении причины первичного гипогонадизма эти тесты менее информативны. Обычно поражение семенных канальцев связано с повышенной концентрацией ФСГ в плазме крови, а поражение клеток Лейдига – с повышенной концентрацией ЛГ. Человеческий хорионический гонадотропин (чХГ), действие которого аналогично действию ЛГ, может использоваться для оценки функции клеток Лейдига. Функцию семенных канальцев можно оценить по анализу семенной жидкости, у пациентов же с низким количеством сперматозоидов методом исследования является биопсия яичек.

Гинекомастия

Рост молочных желез у мужчин обычно связан с нарушением соотношения эстрогенов и андрогенов. Это нарушение может носить физиологический характер у новорождённых. В период полового созревания примерно у половины здоровых мальчиков развивается гинекомастия, обусловленная временно относительным увеличением секреции эстрогенов по сравнению с секрецией андрогенов. В обоих этих случаях гинекомастия разрешается самостоятельно.

Гинекомастия, возникающая в других ситуациях, должна рассматриваться как патологическая. Причины могут выявляться либо при сборе анамнеза, либо при клиническом обследовании пациента. Определение содержания тестостерона, гонадотропинов, ГСПГ и пролактина в плазме крови, а также оценка функции печени и щитовидной железы помогают выявить причину гинекомастии. Для постановки диагноза синдрома Клайнфелтера, характеризующегося наличием дополнительной X-хромосомы (47XXY), требуется кариотипирование. Помочь в постановке диагноза может также рентгенография грудной клетки и черепа, а также тесты функций гипофиза и надпочечников.

Нарушения функции женских половых желез

Климактерический период

На протяжении климактерического периода прогрессирующая недостаточность функции яичников вызывает снижение секреции эстрогенов, что приводит к прекращению менструаций. Менопауза является последним менструальным периодом. После нее эстрогены в небольшом количестве образуются в жировой ткани из андростендиона надпочечников. Концентрация гонадотропинов гипофиза в плазме крови постепенно повышается, достигая высоких значений. Это изменение является более достоверным признаком недостаточности яичников, чем концентрация эстрогенов в плазме, которая может в значительной степени варьировать.

Метаболические изменения, происходящие после менопаузы, включают повышение содержания в плазме липопротеидов низкой плотности и уратов. Дефицит эстрогенов является основным фактором, приводящим к развитию постменопаузального остеопороза.

Аменорея и олигоменорея

Аменорея может быть первичной или вторичной. Олигоменорея представляет собой скудные или редкие менструальные кровотечения; она может быть обусловлена менее тяжелыми формами некоторых патологических состояний, являющихся причинами аменореи.

Наиболее частая причина аменореи у женщин детородного возраста – беременность. Обнаружение высокой концентрации ЛГ в плазме заставляет заподозрить беременность еще до проведения теста. Другой распространенной причиной является снижение массы тела: частота пульсовых выделений ГРГ уменьшается и секреция гонадотропинов снижается. Менструации практически всегда прекращаются при снижении массы ниже 75% от идеальной. Регулярные менструации возобновляются после восстановления массы тела. В остальных случаях аменорея связана с гормональными нарушениями, которые приводят к недостаточности яичников. В некоторых случаях причиной аменореи является нарушение функции матки.

Для диагностики гормональных причин аменореи необходимы измерения базальной концентрации ФСГ, ЛГ и пролактина в плазме крови. Гиперпролактинемия является причиной аменореи примерно в 20-25% случаев.

Высокая концентрация ФСГ указывает на недостаточность функции яичников. Если концентрация ЛГ повышена и пациентка не беременна, наиболее вероятный диагноз – синдром поликистоза яичников. Если концентрации ЛГ и ФСГ нормальные или понижены, следует подозревать нарушение функции гипофиза или гипоталамуса. Диагноз в таких случаях должен ставиться на основании анатомических исследований и проведения динамических функциональных проб гипоталамо-гипофизарной системы.

Гирсутизм

Гирсутизм представляет собой увеличение роста волос на теле по мужскому типу. В большинстве случаев менструальный цикл нормальный, но могут наблюдаться и его нарушения, а также увеличение клитора, потеря волос по мужскому типу и др. Причина гирсутизма обычно заключается в избыточном воздействии андрогенов на ткани. Это может быть связано как с увеличением секреции андрогенов, так и с низкой концентрацией ГСПГ, что ведет к увеличению свободной фракции тестостерона. В некоторых случаях отмечается повышенная чувствительность к андрогенам.

Наиболее распространенной причиной гирсутизма является поликистоз яичников (ПКЯ). Выраженность этого состояния может быть разной и возможно, что многие пациентки, у которых ранее гирсутизм считался идиопатическим, на самом деле страдали легкими формами поликистоза яичников.

Выбор методов исследования при гирсутизме зависит от конкретной клинической ситуации, хотя, если менструальный цикл не нарушен, эндокринная патология может не обнаруживаться. Всем пациенткам необходимо определить концентрации ЛГ, ФСГ, тестостерона и, по возможности, ГСПГ. Умеренно повышенные концентрации тестостерона наблюдаются при ПКЯ и врожденной гиперплазии надпочечников с поздним началом. У пациенток с выраженным гирсутизмом и при наличии нарушений менструального цикла или вирилизма должны быть определены

концентрации андрогенов надпочечников и 17-ОН прогестерона (17-ОНП). Диагноз врожденной гиперплазии надпочечников с поздним началом подтверждается повышенной концентрацией 17-ОНП. Высокие концентрации 17-ОНП, дегидроэпиандростерона сульфата и андростендиона отмечены у пациенток с опухолями надпочечников.

НЕКОТОРЫЕ АСПЕКТЫ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ В ОНКОЛОГИИ

Опухолевые маркеры (онкомаркеры, ОМ) – важная составляющая диагностического комплекса в онкологии. Злокачественный рост сопровождается продукцией аномальных типов или повышением уровней биологических веществ.

Биохимические опухолевые маркеры – это вещества, образуемые опухолевыми клетками и секретируемые в биологические жидкости, в которых они могут быть количественно определены неинвазивными методами. В настоящее время измерение уровня ОМ широко используется в скрининге и диагностике, лечении и мониторинге состояния онкологических пациентов.

К ОМ относится большая группа факторов, концентрация которых в сыворотке зависит от развития злокачественного процесса:

Онкофетальные антигены:

1. α -фетопротеин (АФП).
2. Раково-эмбриональный антиген (РЭА).
3. Тканевой полипептидный антиген (ТПА).

Углеводсодержащие антигенные эпитопы:

1. СА 125
2. СА 15-3

Антигены групповых систем крови:

1. СА 19-9
2. СА 242

Простатспецифический антиген (ПСА)

Гормоны, ферменты

ОМ представляют собой макромолекулы, в основном белки с углеводным или липидным компонентом. От соединений, продуцируемых нормальными клетками, они отличаются или качественно (опухолеспецифичные), или количественно (ассоциированные с опухолью, но присутствующие также и в нормальных клетках). Они формируются внутри или на поверхности злокачественно трансформированных клеток или же в результате индукции образуются в нормальных клетках. Часть ОМ секретируется

в кровь, благодаря чему их концентрацию можно определить с помощью иммунологических методов.

Известно большое количество разных классов веществ, которые могут рассматриваться как ОМ при различных локализациях рака. К ним относятся ассоциированные с опухолью антигены или антитела к ним, гормоны, ферменты, продукты обмена – креатин, гидроксипролин, полиамины, белки плазмы – ферритин, церулоплазмин, β 2-микроглобулин, цитокины, молекулы адгезии, металлопротеиназы, маркеры клеточного цикла, апоптоза, деградации внеклеточного матрикса и т.д. В настоящее время не известно ни одного ОМ, соответствующего идеальным параметрам.

В клинической практике используют около двух десятков ОМ, обладающих достаточной диагностической значимостью.

Использование ОМ

Скрининг. Принято считать, что ни один из известных ОМ не обладает необходимой специфичностью и чувствительностью, достаточной для того, чтобы рекомендовать его для скрининга на наличие опухоли в общей популяции.

Диагностика. ОМ могут являться эффективным и экономически целесообразным дополнением других диагностических процедур. Комбинация нескольких ОМ может быть использована при диагностике опухолевого заболевания для выявления первичной локализации опухоли при метастазировании. ОМ можно использовать в дифференциальной диагностике доброкачественных и злокачественных заболеваний. Степень повышения концентрации многих ОМ может быть использована для оценки стадии заболевания.

Прогноз. ОМ имеют прогностическую значимость, т.е. уровень маркера до начала лечения или концентрация и скорость/степень ее изменения после первичной терапии соответствуют прогнозу. Агрессивная, быстро растущая опухоль, с множественными метастазами продуцирует очень высокий уровень ОМ в сыворотке, указывающий на плохой прогноз. Хорошо дифференцированная опухоль, менее агрессивная, продуцирует меньшие количества маркера.

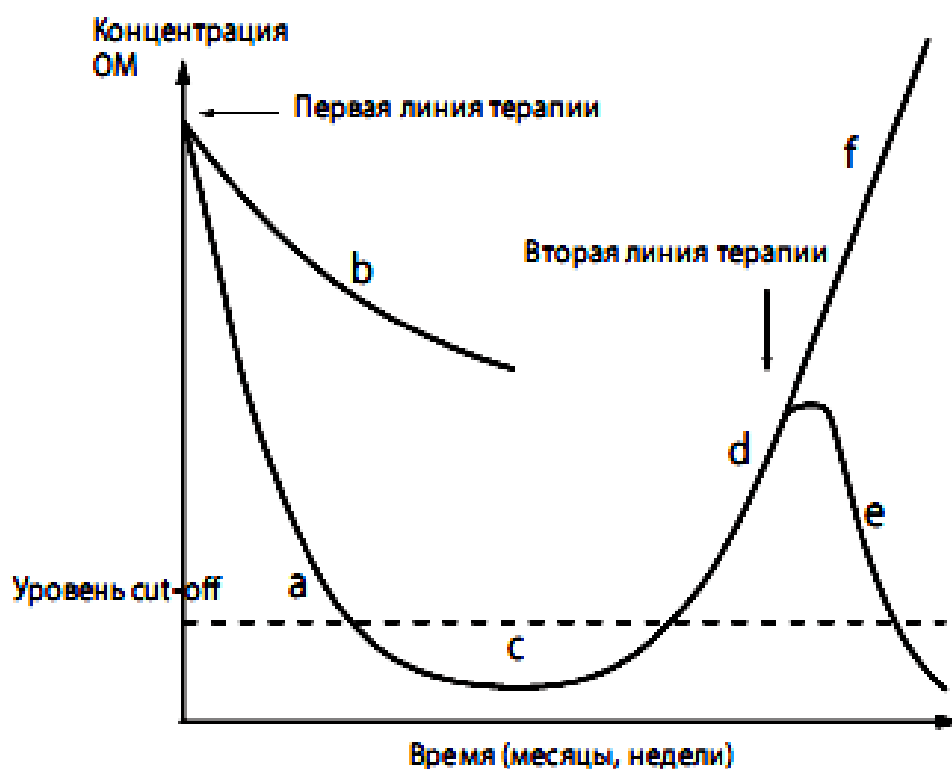


Рисунок 37. – Профили ОМ

- Быстрое снижение концентрации ОМ до нормального уровня после проведенной операции или других форм терапии первого ряда свидетельствуют *об успешности проводимого лечения (a)*.
- Отсутствие снижения уровня маркера до нормального уровня после первой линии терапии может указывать на то, что *лечение не было успешным или на частичный успех лечения (b)*.
- Продолжительный низкий уровень маркера свидетельствует *о периоде ремиссии (c)*.
- Последовательное повышение концентрации ОМ говорит *о рецидиве заболевания (d)*.
- Снижение уровня ОМ после периода повышения, связанного с развитием рецидива, свидетельствует об *ответе на вторую линию терапии или последовательно проводимое лечение (e)*.
- Повышенная концентрация ОМ после лечения означает, что *опухоль может быть резистентна к используемым методам лечения и прогноз неблагоприятный (f)*.

«Cut-off» (контрольный уровень) – это допустимая верхняя граница концентрации опухолевого маркера у здоровых лиц, а также у пациентов с доброкачественными опухолями.

Оценка эффективности терапии и её мониторинг. Это наиболее важная область применения ОМ. Профиль концентрации ОМ наиболее быстро и ясно отражает эффективность проведенной хирургической операции, разных видов и схем терапии, указывает на полную или частичную ремиссию, позволяет выявлять рецидивы задолго до их клинического предъявления.

Динамика уровня маркера представляет больший интерес, чем единичное значение, взятое само по себе. Важно правильно соблюдать интервалы времени анализа. Одной из причин «несработавшего» маркера является именно несвоевременное тестирование. Обязательно необходимо иметь образцы, взятые до начала лечения. В разных ситуациях для каждого ОМ могут быть предусмотрены индивидуальные схемы тестирования.

В общем случае, согласно ВОЗ, рекомендуемые интервалы взятия проб для анализа – не реже 1 раза в месяц в течение первого года после лечения, 1 раз в 2 месяца в течение второго года после лечения, 1 раз в 3 месяца в течение третьего года наблюдения.

Необходим индивидуальный подход к подбору комплекса продуцируемых опухолью маркеров. Рекомендуется проводить оценку уровня нескольких маркеров на момент постановки диагноза и в дальнейшем использовать ОМ, оказавшиеся информативными для конкретного пациента.

Уровень практически любого из известных ОМ не редко повышается при различных доброкачественных заболеваниях. Влияние сопутствующих патологий специфично для каждого маркера и обязательно должно учитываться при интерпретации результатов тестирования.

Характеристика отдельных ОМ

β2-микроглобулин (β2-МГ)

β2-МГ обнаруживается на поверхности различных эпителиальных клеток, лимфоцитов, макрофагов. Как свободный, так и связанный β2-МГ в биологических жидкостях в норме выявляется лишь в незначительных количествах. Определение β2-МГ рекомендуется использовать для подтверждения диагноза и мони-

торинга лечения пациентов с множественной миеломой или неходжкинскими лимфомами. Увеличение концентрации маркера зависит от стадии заболевания, степени злокачественности и типа клеток. У пациентов с прогрессирующей патологией концентрация β 2-МГ значительно выше, чем в период стабилизации. Высокий уровень белка коррелирует с плохим прогнозом. Кроме того, у пациентов с хроническим лимфолейкозом наблюдается корреляция между количеством лимфоцитов периферической крови и концентрацией β 2-МГ. У пациентов с лейкемией повышение уровня β 2-МГ в спинномозговой жидкости свидетельствует о вовлечении ЦНС в патологический процесс. Так как уровень β 2-МГ возрастает при разных аутоиммунных заболеваниях, нарушениях клеточного иммунитета, в том числе при СПИД и после трансплантации органов, этот тест применим для наблюдения за состоянием таких пациентов.

Хорионический гонадотропин (ХГЧ)

ХГЧ – гормон, состоящий из двух субъединиц, из которых β -субъединица наиболее специфична. В норме ХГЧ образуется в плаценте, он обнаруживается стандартными методами в сыворотке беременных женщин через 6-10 дней после оплодотворения, его концентрация растет до конца первого триместра беременности, а затем падает.

У мужчин и небеременных женщин повышение концентрации ХГЧ является достоверным признаком развития злокачественного процесса. Определение ХГЧ рекомендуется для диагностики, мониторинга эффективности терапии и раннего выявления рецидивов трофобластических опухолей, хорионкарцином яичника или плаценты, хорионаденом, семином. Повышение уровня ХГЧ также наблюдается при раках ЖКТ, на поздних стадиях при раке толстой и прямой кишки. Наиболее высокая концентрация маркера отмечается при хорионэпителиоме.

Альфа-фетопроtein (АФП)

АФП – это гликопротеин, состоящий из 591 аминокислот и содержащий до 4% углеводов. В норме АФП продуцируется в период гестации в печени плода и желточном мешке. АФП обнаруживают в сыворотке плода, начиная с 4-й недели беременно-

сти, с пиком содержания на 25-й неделе. Затем его уровень в сыворотке плода постепенно снижается вплоть до рождения.

Определение АФП рекомендуется для выявления и мониторинга течения, а также эффективности терапии первичной гепатоцеллюлярной карциномы, гермином, выявления пороков развития плода и мониторинга его состояния в течение беременности. Повышенная концентрация АПФ в сыворотке крови может определяться у пациентов с опухолями из зародышевого эпителия (тератомы яичка или яичника).

Раково-эмбриональный антиген (РЭА)

РЭА представляет собой гликопротеин с высоким содержанием углеводов, вырабатываемый в тканях пищеварительного тракта эмбриона и плода. РЭА определяется в сыворотке крови плода. После рождения его синтез подавляется и антиген практически не выявляется ни в крови, ни в других биологических жидкостях взрослых здоровых людей. При развитии опухолей разной локализации уровень РЭА повышается и достаточно точно отражает состояние злокачественного процесса.

Повышение концентрации РЭА наблюдается не только при различных карциномах пищеварительного тракта, но и при раке легкого, молочной железы, головы и шеи, злокачественных образованиях соединительнотканного происхождения. РЭА рекомендуется определять совместно с различными органоспецифическими опухолевыми маркерами.

РЭА является белком острой фазы, поэтому его уровень может повышаться у пациентов с разнообразными аутоиммунными, острыми и хроническими воспалительными заболеваниями, при циррозах, хронических гепатитах, язвенной болезни, пневмонии, бронхитах, туберкулезе, эмфиземе легких, муковисцидозе и др. Однако скорость роста и максимально достигаемый уровень маркера при этом значительно ниже, чем при злокачественных заболеваниях.

Антиген СА 125

Антиген СА 125 был идентифицирован с помощью мышинных антител в линии клеток пациентки с серозной карциномой яичников. Это муцин, кодируемый геном *muc16*, содержащий не-

сколько tandemных повторов на N-концевом участке молекулы и сайтом фосфорилирования тирозина на С-конце.

СА125 не является строго специфичным для рака яичников, его уровень может быть повышен при опухолях других локализаций (25% случаев), различных доброкачественных заболеваниях (эндометриозе, остром или хроническом сальпингите, миоме матки, циррозах, хронических гепатитах, почечной недостаточности), после травмы брюшной полости, у молодых здоровых женщин (1-2%) в течение менструального цикла (в фолликулярной фазе) или в первом триместре беременности (до 100 Ед/мл). Определение СА125 рекомендуется проводить перед процедурой ЭКО, пациентки с повышенным уровнем маркера при этом относятся к группе риска по развитию рака яичников.

СА 15-3

СА 15-3 используется для мониторинга лечения и диагностики рецидивов при раке молочной железы. Отмечается незначительное повышение маркера при циррозе, гепатите, аутоиммунных расстройствах, доброкачественных заболеваниях яичников и молочной железы. При других опухолях, таких как карцинома яичников, шейки матки, эндометрия, повышенный уровень СА 15-3, повышается только на поздних стадиях заболевания.

СА 19-9

СА 19-9 представляет собой углеводный антиген групп крови Lewis и в норме присутствует на мембране лейкоцитов. Молекула ответственна за адгезию лейкоцитов к эндотелию сосудов и выход клетки к очагам воспаления. Гиперэкспрессия СА 19-9 клетками приводит к увеличению их злокачественного потенциала за счет большей способности к метастазированию.

От 5 до 10% популяции не экспрессирует Lewis антигены. В этом случае на мембране опухолевых клеток антигена не будет. Определение концентрации СА 19-9 применяют для диагностики, мониторинга лечения и раннего обнаружения метастазирования опухолей поджелудочной железы, желудка, толстой и прямой кишки. СА 19-9 выводится из организма только с желчью. Поэтому даже незначительный холестаз приводит к увеличению содержания маркера в крови. Повышение концентрации СА 19-9

может также наблюдаться при доброкачественных и воспалительных заболеваниях ЖКТ и печени, муковисцидозе.

СА 242

СА 242 – это муциновый антиген. Он является предшественником Lewis антигена. В зависимости от природы опухоли – доброкачественной или злокачественной – экспрессии эпитопов СА 242 различаются: при доброкачественных заболеваниях экспрессия СА 242 ниже по сравнению с СА 19-9, поэтому и специфичность СА 242 по сравнению с СА 19-9 выше. СА 242 используется для диагностики и мониторинга рака поджелудочной железы и прямой кишки.

Простат-специфичный антиген (ПСА)

ПСА – это гликопротеид, секретируемый клетками эпителия канальцев простаты. Он относится к семейству калликреиновых сериновых протеаз и является химотрипсинподобной гликопротеазой. Синтез белка контролируется андрогенами через рецепторы эпителиальных клеток протоков предстательной железы. Синтезируемый ПСА поступает непосредственно в кровяное русло, где находится в свободном и связанном состоянии.

Исследования ПСА применяют для диагностики и мониторинга лечения рака простаты. С возрастом содержание ПСА увеличивается. Подъем уровня ПСА наблюдается после таких процедур, как пальцевое ректальное исследование, цистоскопия, колоноскопия, тепловые процедуры, трансуретральная биопсия, лазерная терапия и др. Забор крови на исследование ПСА в этих случаях следует проводить не ранее, чем через 5-6 дней, и не ранее, чем через несколько недель после лечения простатита или инфекции мочеполовых путей.

Нейрон-специфическая енолаза (NSE)

NSE – гликолитический нейрон-специфический изофермент енолазы. Енолаза участвует в образовании высокоэнергетической фосфатной связи, катализируя обратимое превращение в гликолизе 2-фосфоглицерата и фосфоенолпирувата. Существует несколько димерных изоферментов, среди которых димеры $\alpha\gamma$ и $\gamma\gamma$

известны как NSE. Название связано с тем, что впервые экспрессия NSE была выявлена в нейронах, нейроэндокринных клетках или злокачественных опухолях, происходящих из этих клеток. Фермент присутствует в клетках нейроэктодермального происхождения, нейронах головного мозга и периферической нервной ткани.

Исследование NSE применяется для диагностики и мониторинга эффективности терапии, а также как прогностический фактор нейробластомы. Повышенное содержание маркера в сыворотке наблюдается и при развитии опухолей нейроэктодермального или нейроэндокринного происхождения, лейкозах, после лучевой или рентгенотерапии, рентгеновского обследования.

Незначительное повышение концентрации NSE может наблюдаться при доброкачественных заболеваниях легких. При заборе крови необходимо помнить, что фермент содержится в эритроцитах и тромбоцитах, следовательно, гемолиз значительно завышает результаты анализа, а центрифугирование необходимо проводить не позднее чем через час после взятия пробы.

По разным данным, исследование NSE можно также проводить и в спинномозговой жидкости. При заболеваниях или повреждениях ЦНС наблюдается значительное увеличение содержания фермента в ликворе. Уровень NSE может повышаться и при таких неврологических процессах, как эпилепсия и субарахноидальное кровоизлияние.

Белок S-100

S-100 – это семейство кислых Ca^{2+} -связывающих белков. Белок S-100 представляет собой гомо- или гетеродимер, состоящий из двух субъединиц: β или α , в комбинациях: $\alpha\alpha$, $\alpha\beta$ и $\beta\beta$. Белки S-100 обнаружены в клетках различных тканей: нервной системы, мышечной, в тканях внутренних органов (печень, почки и др.). Каждая субъединица содержит два сайта связывания для кальция и один – для цинка. S-100 активно участвуют в процессах клеточного деления, дифференцировки, гомеостаза ионов кальция.

Увеличение уровня S-100 в СМЖ и плазме является маркером повреждения головного мозга. Рост концентрации белка наблюдается при различных опухолях, таких как глиома, высоко-

дифференцированная нейробластома. Серийные исследования S-100 при меланоме позволяют производить мониторинг за эффективностью лечения и выявлять рецидивы на ранней стадии.

Кальцитонин

Кальцитонин первично синтезируется в парафолликулярных С-клетках щитовидной железы как препрогормон. После отщепления короткого N-концевого сигнального пептида кальцитонин находится в секреторных гранулах. Основная функция кальцитонина – уменьшение концентрации кальция в плазме. Увеличение уровня внеклеточного кальция стимулирует секрецию кальцитонина. Он ингибирует активность остеокластов, в результате чего уменьшается мобилизация кальция из кости.

Определение кальцитонина имеет важное значение для диагностики медуллярного рака щитовидной железы. Обычно повышение в сыворотке крови как базального, так и стимулированного уровня кальцитонина при провокационном тесте с внутривенным введением кальция служит основным диагностическим критерием медуллярной карциномы щитовидной железы даже при отсутствии данных радиоизотопной диагностики.

Стойкое повышение содержания кальцитонина после удаления опухоли у пациентов с медуллярным раком щитовидной железы может указывать на неэффективность операции или наличие отдаленных метастазов. Быстрый подъем уровня кальцитонина после операции свидетельствует о рецидиве заболевания. Определение кальцитонина используется в качестве скринингового теста у членов семьи пациентов, страдающих этим видом рака. Повышение уровня гормона может также наблюдаться при беременности и доброкачественных заболеваниях легких.

ЛАБОРАТОРНАЯ ОЦЕНКА ФУНКЦИЙ ПОЧЕК

Лабораторная оценка парциальных функций почек

Важное диагностическое значение при многих заболеваниях почек имеют раздельная количественная оценка уровня фильтрации в клубочках, реабсорбции и секреции в канальцах, а также величины почечного плазмотока и кровотока. Современные методы определения функций почек основаны на вычислении так называемого **клиренса** (коэффициента очищения).

Клиренс – это объем плазмы крови в мл, который при прохождении через почки полностью освобождается (очищается) от какого-либо эндогенного или экзогенного вещества за 1 минуту. Клиренс любого вещества, выделяемого с мочой, рассчитывают по формуле:

$$C = U/P \times V \text{ (мл/мин)}$$

C – клиренс;

U – концентрация исследуемого вещества в моче;

P – концентрация исследуемого вещества в плазме крови;

V – количество мочи, выделенной за 1 мин. (минутный диурез).

Определение скорости клубочковой фильтрации

Клубочковая фильтрация (КФ) представляет собой объем (в мл) жидкой части крови, прошедшей через клубочковый фильтр в полость капсулы Шумлянско-Боумана за 1 минуту.

Скорость клубочковой фильтрации (СКФ) – один из лучших индикаторов функции почек. СКФ является достоверным показателем хронического заболевания почек. Поскольку общая почечная СКФ равна сумме скоростей фильтрации в каждом из функционирующих нефронов, этот показатель можно использовать в качестве маркера функционирующей почечной массы. Снижение СКФ предшествует почечной недостаточности при всех формах прогрессирующих заболеваний почек. Уровень СКФ является достоверным предиктором времени начала почечной недостаточ-

ности, равно как и риска осложнений хронического заболевания почек. Кроме того, расчет СКФ в клинической практике позволяет правильно дозировать препараты, экскретируемые за счет клубочковой фильтрации, для предотвращения их потенциальной токсичности.

Состояние фильтрации в клубочках наиболее полно отражает клиренс *инулина*, который считается эталоном для сравнения скорости КФ, определяемой по клиренсу других веществ. Это объясняется тем, что молекулы инулина по размерам меньше диаметра пор в базальных мембранах капилляров клубочков, поэтому они легко проникают в полость капсулы. Количество инулина, профильтрованного в клубочке, равно СКФ, умноженной на концентрацию инулина в плазме ($СКФ \times P_{in}$). Количество выведенного инулина равно концентрации инулина в моче (U_{in}), умноженной на скорость образования мочи (V , объем мочи, выведенный за единицу времени).

Поскольку количество профильтрованного инулина равно количеству выведенного инулина ($СКФ \times P_{in} = U_{in} \times V$), СКФ можно рассчитывать по следующей формуле:

$$СКФ = (U_{in} \times V) / P_{in}$$

Выражение $(U_{in} \times V) / P_{in}$ определяется как клиренс инулина и является точной оценкой СКФ. Клиренс инулина (в мл/мин) рассматривается как объем плазмы, который очищается от инулина в единицу времени за счет почечной экскреции.

В результате концентрация инулина в клубочковом фильтрате полностью соответствует таковой в плазме крови. Клиренс инулина у здоровых молодых мужчин составляет в среднем **127 мл/мин/1,73 м²**, у женщин – **118 мл/мин/1,73 м²** со стандартным отклонением 20 мл/мин/1,73 м². После 20-летнего возраста СКФ снижается примерно на 1,0 мл/мин/1,73 м².

Однако в клинической практике клиренс инулина не нашел широкого применения по причине необходимого внутривенного капельного введения этого вещества на протяжении всего исследования, а также высокой вероятности развития аллергических реакций. Данное обстоятельство стало поводом для разработки альтернативных методов оценки СКФ.

Мочевой клиренс экзогенных радиоактивных меток (^{125}I -иоталамат и $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -ДТПА) представляет собой достоверный метод измерения СКФ, но в настоящее время он недоступен для рутинного применения. Использовались также плазменные клиренсы таких экзогенных веществ, как *iohexol* и $^{51}\text{Cr-EDTA}$, но они требуют расчетов размера тела, что снижает точность метода. Капиллярный электрофорез позволил измерять содержание иоталамата без радиоактивных меток в крови и моче с обещающими результатами. Для расчета СКФ использовалось измерение содержания цистатина С, но были получены противоречивые данные.

Клиническое применение СКФ

Расчеты СКФ, основанные на определении креатинина сыворотки с использованием соответствующих формул у взрослых и детей, дают основу для классификации хронического поражения почек и выявления его прогрессирования. В зависимости от выраженности снижения СКФ можно установить стадию заболевания (табл. 29).

Таблица 29. – Стадии хронического заболевания почек

Стадия	Характеристика	СКФ (мл/мин/1,73 м ²)
1	Повреждение почки с нормальной СКФ	≥ 90
2	Повреждение почки с легким снижением СКФ	60-89
3	Умеренное снижение СКФ	30-59
4	Тяжелое снижение СКФ	15-29
5	Почечная недостаточность	<15 (или диализ)

Хроническое заболевание почек устанавливается либо по непосредственному выявлению поражения органа (например при использовании методов инструментальной диагностики), либо по снижению СКФ ниже 60 мл/мин/1,73 м² в течение трех месяцев.

Лица с СКФ от 60 до 89 мл/мин/1,73 м² без выявленного повреждения почек классифицируются как имеющие «сниженную СКФ». Причинами хронически сниженной СКФ без почечного повреждения у взрослых является вегетарианская диета, односто-

ронняя нефрэктомия, снижение объема экстраклеточной жидкости, системная патология, связанная со снижением почечной перфузии, – например, сердечная недостаточность и цирроз печени. В настоящее время ведутся дискуссии по вопросу: находятся ли лица с хронически сниженной СКФ (60 до 89 мл/мин/1,73 м²) без почечного повреждения в группе повышенного риска развития неблагоприятных исходов, таких как токсичность лекарств, выделяемых почками, или острая почечная недостаточность. После многочисленных исследований сделано заключение о том, что предпосылок для этого недостаточно.

Сниженную СКФ определяют при значениях <90 мл/мин/1,73 м². Нижний предел нормальной СКФ зависит от возраста. Например, СКФ <90 мл/мин/1,73 м² будет субнормальной у молодых людей (табл. 2.). С другой стороны, СКФ в 60-89 мл/мин/1,73 м² может быть нормальной в возрасте примерно от 8 недель до 1 года и у пожилых людей. Возможно также, что и СКФ от 30 до 59 мл/мин/1,73 м² может быть нормальной у лиц в крайних возрастных группах, у вегетарианцев, после односторонней нефрэктомии. Однозначно, СКФ <30 мл/мин/1,73 м² является ненормальной для всех возрастов, кроме новорожденных. По этой причине в определении хронического заболевания почек в качестве ключевого критерия рекомендуется использовать уровень СКФ ниже 60 мл/мин/1,73 м², в то время как лица с СКФ от 60 до 89 мл/мин/1,73 м² признаются имеющими хроническое заболевание почек, только если у них есть маркер почечного повреждения.

Снижение СКФ может быть острым или хроническим. Острое снижение не обязательно указывает на наличие почечного повреждения. Например, хорошо известно, что короткий период незначительного снижения почечного кровотока или преходящая обструкция мочевых путей могут вызвать снижение СКФ без почечного повреждения. Однако существенное снижение кровотока или длительная обструкция чаще связаны с почечным повреждением. Хроническое снижение СКФ чаще связано с почечным повреждением.

Экспертами NKDEP (Национальный комитет по клинико-лабораторным стандартам) в качестве критического срока в определении наличия хронического заболевания почек рассматривает

период понижения СКФ более 3 месяцев. Лиц со сниженной СКФ следует обследовать на маркеры почечного повреждения для того, чтобы определить, имеют ли они хроническое заболевание почек, и какова причина снижения почечной функции. Даже если нет признаков почечного повреждения, лица со сниженной СКФ находятся в группе высокого риска по причине влияния таких неблагоприятных факторов, как токсичность лекарственных препаратов, выводимых почками, а также возникновение острой почечной недостаточности.

Снижение СКФ ассоциирует с широким спектром осложнений в других органах и системах (табл. 30).

Таблица 30. – Связь СКФ с различными осложнениями

Вид осложнения	Связь с СКФ	Лечебно-диагностические мероприятия
Гипертензия	Является как причиной, так и осложнением хронического заболевания почек. Как осложнение, артериальная гипертензия может развиваться на ранней стадии течения заболевания	<ul style="list-style-type: none"> • Мониторинг артериального давления. • Лечение артериальной гипертензии с использованием нефармакологической коррекции и специфических препаратов для предотвращения прогрессирования заболевания почек и развития сердечно-сосудистой патологии
Анемия	Развивается при прогрессировании хронического заболевания почек	<ul style="list-style-type: none"> • Всех пациентов с СКФ <60 мл/мин/1,73 м² необходимо обследовать на предмет диагностики анемии
Нутриционный статус	Белково-энергетическая недостаточность развивается при прогрессировании хронического заболевания почек. Низкое потребление белков – важная причина белково-энергетической недостаточности при хроническом заболевании почек	<ul style="list-style-type: none"> • У пациентов с СКФ <60 мл/мин/1,73 м² следует проводить оценку потребления белков, калорийности питания и нутриционного статуса (масса тела, общий белок, альбумин, азотистые основания). • Пациентам со сниженным потреблением белков и калорий или с белково-энергетической недостаточностью следует корректиро-

		<p>вать диету, проводить диетологическое консультирование и обучение или применять специализированную нутриционную терапию.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Пациентам с ХПН (СКФ <25 мл/мин), которым не проводится диализ, назначение плановой низкобелковой диеты, содержащей 0,6 г/кг/день белка
Патология костей, связанная с нарушением метаболизма кальция и фосфора	Развивается в ходе прогрессирования хронического заболевания почек	<ul style="list-style-type: none"> • Пациентов со СКФ <60 мл/мин/1,73 м² следует обследовать для выявления костной патологии и нарушений метаболизма кальция и фосфора
Неврологические расстройства	Развиваются в ходе прогрессирования хронического заболевания почек	<ul style="list-style-type: none"> • Пациентов с хроническим заболеванием почек следует периодически обследовать на предмет нарушений со стороны центральной и периферической нервной системы. • Специальные тесты для диагностики неврологических расстройств у пациентов с хроническим заболеванием почек показаны только при наличии соответствующей симптоматики

Критерии функционального состояния почек по регуляции осмотического гомеостаза

Почки играют важную роль в регуляции объема внеклеточной жидкости и ее осмотического давления. Под осмолярностью понимают концентрацию в одном литре биологических жидкостей осмотически активных веществ (ОАВ), главными из которых являются ионы натрия, калия и хлора, в меньшей степени – глюкоза и мочевины. У практически здоровых людей осмолярность крови составляет 275-300 мосм/л, в моче – 50-1500 мосм/л.

Осмоляльность – это концентрация ОАВ в одном кг воды. Утренняя порция мочи у здорового человека должна иметь осмоляльность не менее 600 мосм/кг воды.

Менее точно содержание ОАВ характеризует **относительная плотность мочи**. Утренняя порция должна иметь плотность не менее 1020. Если последние 2 цифры относительной плотности умножить на 26, получится приблизительная осмоляльность мочи.

Одним из наиболее распространенных в клинике исследований, позволяющих оценить концентрационную способность почек, является **проба по Зимницкому**: в восьми 3-часовых порциях мочи определяются относительная плотность и объем, отношение дневного и ночного диуреза (в норме 3:1, 4:1) и колебания относительной плотности в течение суток (в норме не менее 8-12 ед.). Сбор начинается в 9 часов утра и продолжается до 9 часов следующего утра.

Осмоляльный индекс (осмоляльный коэффициент) – это отношение осмоляльности мочи к осмоляльности плазмы.

Референтный уровень – $2,8 \pm 0,1$.

Показатель используется для выявления причин нарушения концентрационной функции почек:

- = 1 осмотический диурез (сахарный диабет);
- 0,5-1 нарушение, связанное с патологией почек (ХПН, пиелонефрит и др.);
- <0,5 несахарный диабет (снижение выработки АДГ например после ЧМТ)

Осмоляльный клиренс ($C_{осм}$) – это объем плазмы, который, проходя через почки, полностью очищается от всех ОАВ за 1 минуту:

$$C_{осм} = (U_{осм} \times V) / P_{осм}, \text{ мл/мин}$$

Референтный уровень – до 3 мл/мин.

Вода, выделяемая почками, условно делится на 2 фракции:

1. Осмотически связанная вода ($C_{осм}$). Содержит ОАВ в концентрации, аналогичной плазме.

2. Осмотически свободная вода. Остается в канальцах после реабсорбции ОАВ через стенку почечных канальцев, не проницаемых для воды.

Клиренс осмотически связанной воды характеризует способность почек очищать плазму от ОАВ, а $C_{\text{св.}}$ воды характеризует способность почек очищать плазму от избытка воды:

$$\text{Минутный диурез (V)} = C_{\text{осм}} + C_{\text{св. воды}}$$

С целью оценки способности почек концентрировать мочу в клинических условиях применяют ряд функциональных исследований:

1. Проба с водной нагрузкой (на разведение мочи).
2. Проба с сухоедением (на концентрирование).

Проба с водной нагрузкой используется для оценки концентрационной способности почек в условиях гипергидратации: пациент утром натощак выпивает 20-22 мг/кг жидкости (вода, чай без сахара) и мочится в унитаз. В течение последующих 2-х часов собирается моча. Здоровый человек при этом выделяет не менее 1 л мочи с относительной плотностью не более 1002-1005 ед., осмоляльный клиренс должен быть в районе 10 мл/мин.

Проба с сухоедением проводится с целью оценки концентрационной способности почек при искусственно созданной дегидратации: пациенту в течение 16-18 ч запрещается принимать жидкость и жидкую пищу. В течение данного промежутка времени собирают мочу (так же как и при проведении пробы по Зимницкому). Обязательным условием выполнения данного исследования является назначение диеты с высоким содержанием белка. При сохраненной концентрационной функции почек общее количество мочи составляет 500-600 мл, относительная плотность мочи – не менее 1028 ед. При умеренном снижении концентрационной функции относительная плотность не выше 1028 ед., а данный показатель ниже 1020 ед. указывает на выраженное нарушение способности почек концентрировать мочу.

Определение канальцевой реабсорбции

Канальцевую реабсорбцию можно рассчитать по следующей формуле:

$$R = F - V/F \times 100\%$$

R – канальцевая реабсорбция;

F – клубочковая фильтрация;

V – минутный диурез.

В норме при обычном водном режиме канальцевая реабсорбция составляет 98-99%.

Данный показатель преимущественно используется для дифференциальной диагностики заболеваний клубочкового и канальцевого аппарата почек. При *тубулоинтерстициальных поражениях* (пиелонефрит, гидронефроз, поликистоз почек и др.) снижение реабсорбции наблюдается на ранних стадиях, а при *заболеваниях клубочков* (гломерулонефрит, диабетический гломерулосклероз и др.) это происходит позже.

Оценка секреторной функции почек

Для оценки секреторной функции почек используются методики по определению клиренса веществ, выводящихся из организма преимущественно путем канальцевой секреции. Чаще всего для этого используют экзогенно вводимый феноловый краситель (фенолрот), 95% которого выводится из организма с мочой путем канальцевой секреции.

Методика определения клиренса фенолрота выглядит следующим образом: утром натощак пациент выпивает 400 мл воды и через 15-20 мин. мочится в унитаз. После этого ему внутримышечно вводится 1 мл 6% раствора фенолрота и собираются 2 часовые порции мочи. В каждой из них колориметрическим способом определяют концентрацию красителя.

В норме за первый час с мочой должно выделиться 40-60% фенолрота, за второй – еще 20-25% (суммарно 60-85%).

При пониженной секреторной функции канальцев выведение красителя замедляется и максимум выведения приходится на вторую порцию мочи.

Для исследования данной функции почек можно использовать и ряд других веществ, которые активно секретируются ка-

нальцевым эпителием (диодраст, парааминогиппуровая кислота и др.).

Оценка эффективного почечного плазмотока и кровотока

Оценка эффективного почечного плазмотока проводится с помощью определения клиренса веществ, которые не только фильтруются в клубочках, но и секретируются в почечных канальцах (диодраст, парааминогиппуровая кислота и др.). По клиренсу этих веществ можно рассчитать количество плазмы, которая протекает через клубочки и канальцы за единицу времени (1 мин.), т.е. **эффективный почечный плазмоток**.

Референтный уровень – 550-680 мл/мин.

Определив эффективный почечный плазмоток и гематокрит, можно рассчитать **почечный кровоток**.

Референтный уровень – 1000-1300 мл/мин.

Определение данных показателей в динамике имеет большое значение для объективной оценки эффективности лечения пациентов с разного рода почечной патологией.

Оценка выведения натрия с мочой

В физиологических условиях почки эффективно сберегают натрий, а его выделение целиком зависит от канальцевой реабсорбции. У здоровых лиц ограничение натрия в диете до 10 ммоль приводит к снижению его выведения с мочой приблизительно до 10 ммоль/сут в течение 7 дней. Если при таком поступлении натрия его выделение будет больше 10 ммоль/сут, это свидетельствует о нарушенной способности почечных канальцев его реабсорбировать.

У пациентов с олигурией, но с нормальной функцией канальцев, моча должна концентрироваться, а выведение натрия должно быть равным его поступлению. Если олигурия является следствием почечной недостаточности, осмоляльность мочи будет приближаться к осмоляльности плазмы, а выведение натрия будет превышать его поступление.

В клинике для оценки выведения натрия с мочой используется **показатель фракционной экскреции**:

$$Fe_{Na} = ([Na^{+}_{\text{мочи}}] : [Na^{+}_{\text{плазмы}}]) \times ([\text{Креатинин}_{\text{плазмы}}] : [\text{Креатинин}_{\text{мочи}}]) \times 100\%$$

Диагностически значимое увеличение – более 1,5%.

Почки участвуют в поддержании гомеостаза ионов водорода посредством трех основных механизмов:

- реабсорбции гидрокарбоната в проксимальных канальцах;
- регенерации гидрокарбоната в дистальных канальцах;
- выведения ионов водорода с мочой.

В физиологических условиях моча практически не содержит ионов гидрокарбоната (<1 ммоль/л), так как он практически полностью реабсорбируется в канальцах почек. Количество реабсорбируемого HCO_3^- в почечных канальцах составляет 26 ммоль на литр первичной мочи. Эта величина прямо зависит от величины pCO_2 и находится в обратной зависимости от содержания ионов хлора и калия в сыворотке крови. Около 90% гидрокарбоната реабсорбируется именно в проксимальных канальцах.

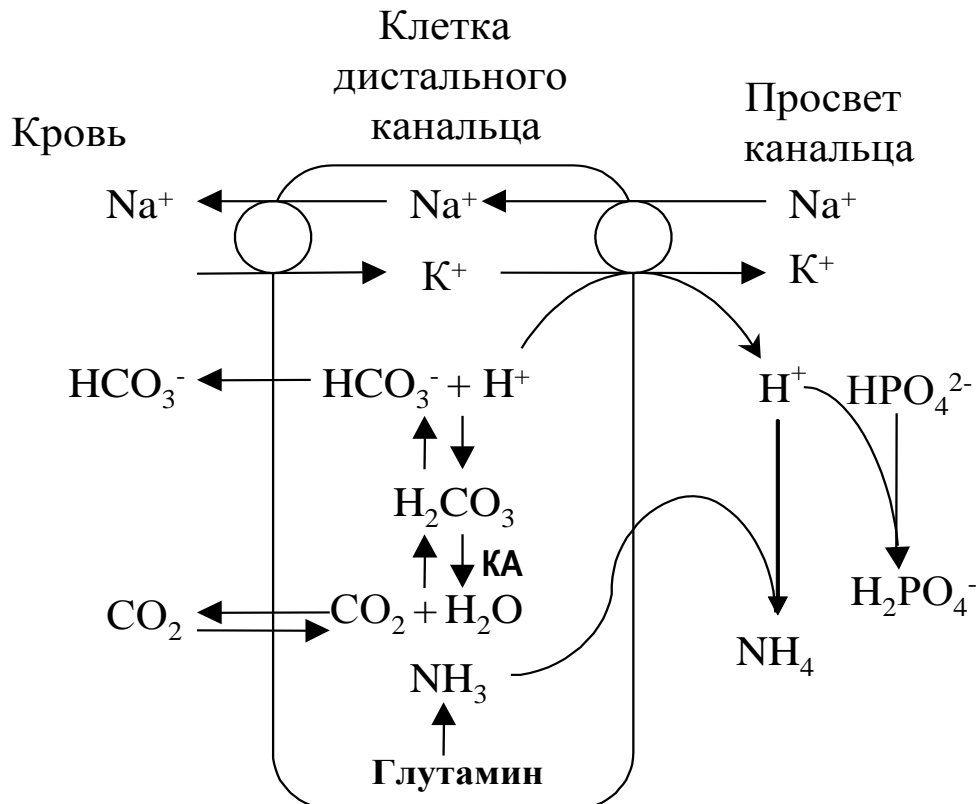


Рисунок 38. – Участие дистального канальца в регуляции КОС

Для транспорта гидрокарбоната используется энергия, аккумулированная в виде градиента электрохимического потенциала ионов натрия между просветом канальцев и клеткой. Этот градиент поддерживается Na/K-АТФазой, расположенной на антилюминальной цитоплазматической мембране клеток канальцев. Вход ионов натрия в клетку со стороны просвета канальца сопряжен с выходом ионов водорода в первичный фильтрат. Этот процесс катализируется натрий-водородным обменником.

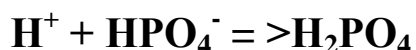
В просвете канальца выделенный ион водорода реагирует с ионом гидрокарбоната, образуя угольную кислоту. В результате дегидратации угольной кислоты на люминальной мембране при участии карбоангидразы образуется диоксид углерода. CO_2 диффундирует в клетки канальцев, где образуется гидрокарбонат, проникающий затем в кровь. Закон electroneutrality реализуется на уровне проксимальных канальцев следующим образом: суммарный положительный заряд реабсорбируемого в этом отделе нефрона натрия эквивалентен суммарному отрицательному заряду анионов Cl^- и гидрокарбоната, подвергающихся реабсорбции в проксимальном канальце.

Регенерация бикарбонат иона происходит на уровне дистального канальца и связана с процессом секреции иона водорода в мочу. В клетки дистальных канальцев диффундирует диоксид углерода, из которого при участии карбоангидразы образуется угольная кислота. Последняя диссоциирует с образованием иона гидрокарбоната, поступающего затем в кровь, и иона водорода, который секретируется в мочу. Выход каждого иона водорода в просвет канальцев сопряжен с образованием и переходом в кровь одного иона гидрокарбоната. Этот процесс зависит от активности карбоангидразы (рис. 38).

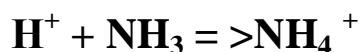
Ионы водорода с мочой выводятся главным образом в виде **дифосфат-аниона** (образование титруемой кислотности) и ионов **аммония** (амониогенез).

Выделенный в просвет канальцев ион водорода связывается с HPO_4^{2-} , образуя дифосфат-анион, который выводится с мочой. Количество H^+ , реагирующего с монофосфат-анионом, соответствует количеству эквивалентов гидроксида натрия, которое следует добавить к моче, чтобы довести ее pH до pH первичного

фильтрата (pH=7,4). Этот показатель называется *титруемой кислотностью*:



Аммонιοгеноз: из глутамина с участием глутаминазы и глутаматдегидрогеназы в дистальных канальцах образуется α-кетоглутарат и аммиак. Последний диффундирует в просвет канальцев, где образуется ион аммония:



На уровне дистального канальца *суммарный положительный* заряд реабсорбируемого натрия *эквивалентен суммарному* отрицательному заряду, регенерируемого здесь гидрокарбоната и положительного заряда калия и водорода, секретируемых в мочу.

В результате почка выделяет ион водорода в трех формах:

- свободный ион водорода (pH_{мочи});
- в забуференной форме как титруемая кислотность (H₂PO₄⁻);
- ионы аммония (NH₄⁺).

Моча в норме имеет слабокислую реакцию, в среднем около **6,2 (4,5-7,5 ед.)**. Общее суточное выделение H⁺ составляет **40-80 ммоль**, титруемая кислотность – **10-30 ммоль**, выделение ионов аммония – **30-50 ммоль**.

Выведение титруемой кислотности и ионов аммония с мочой у лиц с нормальной почечной функцией тесно сопряжено с кислотно-основным состоянием организма: внутриклеточный ацидоз стимулирует наработку H⁺, увеличивает активность ферментов (глутаминазы), принимающих участие в образовании аммиака, благоприятствует реабсорбции бикарбоната и увеличивает выведение фосфатов с мочой. При нарушенной секреции H⁺, особенно при дистальном канальцевом ацидозе, способность почек к закислению мочи и выведению титруемой кислотности и иона аммония весьма ограничена. Уровень значений титруемой кислотности соответствует количеству гидрокарбоната натрия, необходимому для приведения pH мочи к pH крови. Значение это

будет снижено на количество иона бикарбоната, содержащегося в моче.

Нарушения КОС при патологии почек

Нарушения кислотно-основного состояния организма, развивающиеся по причине патологических процессов в почках, получили общее название **почечные ацидозы**. Это патологические состояния, обусловленные недостаточным выведением ионов водорода из организма почками. Их причиной может стать уменьшение общего числа функционирующих нефронов (**уремический ацидоз**) или нарушение экскреции ионов водорода почечными канальцами при нормальном количестве почечных нефронов (**канальцевые ацидозы**).

Уремический ацидоз в зависимости от активности течения классифицируют следующим образом:

- почечный азотный ацидоз, обусловленный хронической почечной недостаточностью;
- почечный азотный ацидоз, обусловленный острой почечной недостаточностью.

Азотный ацидоз является одним из синдромов хронической почечной недостаточности и протекает с увеличением анионного промежутка. Обычно анионный промежуток у пациентов с уремией не превышает 25 мЭкв/л. Увеличение этого показателя более 25 мЭкв/л свидетельствует о присоединении сопутствующей патологии. Основной причиной развития ацидоза в этом случае является уменьшение количества нормально функционирующих почечных нефронов. Это приводит к уменьшению выводимых с мочой ионов водорода, преимущественно за счет снижения интенсивности аммонิโอгенеза в дистальных канальцах. В меньшей степени происходит снижение титруемой кислотности мочи, так как организм, пытаясь компенсировать объем выводимых ионов водорода, увеличивает выведение фосфатов с мочой, что обеспечивается увеличением секреции паратгормона.

Хроническая почечная недостаточность обычно сопровождается вторичным гиперпаратиреозом. Кроме активации буферного действия костной ткани, паратгормон уменьшая реабсорбцию гидрокарбоната в проксимальных канальцах, обуслав-

ливает увеличение рН мочи в дистальном канальце, что в свою очередь ингибирует аммонιοгенез и усугубляет ацидоз. Нарушение эндокринной функции почек приводит к снижению интенсивности образования 1,25-гидроксиколекальциферола, что вместе с гиперфосфатемией приводит к гипокальциемии. Для количественной оценки адаптационных механизмов почек пользуются методом пересчета количества образующейся титруемой кислотности и аммиака на 1 мл клубочкового фильтрата. Полученные результаты показывают, что интактные нефроны на начальных этапах болезни значительно увеличивают образование аммиака и титруемой кислотности, компенсируя тем самым функцию погибших. Однако в процессе прогрессирования болезни компенсаторные механизмы почки истощаются и стимулируется буферное действие костной ткани. Благодаря достаточно большой буферной емкости костей, состояние основных параметров кислотно-основного равновесия организма при азотном ацидозе долгое время сохраняется стабильным, несмотря на положительный баланс ионов водорода.

Канальцевыми ацидозами называют такие состояния, при которых на фоне нормального уровня клубочковой фильтрации наблюдается нарушение выделения ионов водорода и/или реабсорбции гидрокарбоната в почке. На основании исследования функции почек данные нарушения классифицируют на два основных типа:

1. Гипокалиемический тубулярный ацидоз:

- дистальный канальцевый ацидоз;
- проксимальный канальцевый ацидоз.

2. Гиперкалиемический тубулярный ацидоз:

- чувствительный к минералокортикоидам канальцевый ацидоз;
- нечувствительный к минералокортикоидам канальцевый ацидоз.

По этиологии эти нарушения могут быть **первичными** (генетически обусловленными) и **вторичными**.

Первичный дистальный канальцевый ацидоз характеризуется нарушением нормального градиента концентрации ионов водорода между кровью и канальцевой жидкостью. В основе

данной патологии лежит генетический дефект мембраны клеток канальцев. Наследуется заболевание по аутосомно-доминантному типу.

Патологические процессы, наблюдаемые при первичном и вторичном дистальном канальцевом ацидозе, в общем схожи. Нарушение выведения ионов водорода в дистальных канальцах ведет за собой торможение наработки гидрокарбоната в этом отделе нефрона. Поэтому на фоне нормальной реабсорбции гидрокарбоната в проксимальном канальце будет наблюдаться снижение концентрации HCO_3^- , что ведет к избыточной задержке ионов хлора в организме и гиперхлоремии. Кроме того, в дистальном канальце происходит реабсорбция ионов натрия и выведение ионов калия и водорода. Заряд реабсорбируемого натрия компенсируется в большей степени за счет увеличения выведения калия, чем водорода, что приводит к гипокалиемии и ацидозу. В процессе прогрессирования заболевания развивается гиперфосфатурия и гипофосфатемия, а также гиперкальциурия, и в дальнейшем – нефрокальциноз.

Главной и, вероятно, единственной причиной **первичного проксимального канальцевого ацидоза** является нарушение обратного всасывания гидрокарбоната в проксимальном отделе нефрона. Этот тип нарушений отмечается главным образом у новорожденных мужского пола и сопровождается нарушением развития и ацидозом.

До недавнего времени считалось, что в норме реабсорбция гидрокарбоната в проксимальных канальцах нефрона полностью связана с активностью карбоангидразы, однако последние исследования показали участие активного АТФ-зависимого транспорта гидрокарбоната из первичного почечного фильтрата в кровь, не связанного с карбоангидразой.

Нарушение реабсорбции гидрокарбоната приводит к увеличению его потери с мочой и увеличению обратного всасывания хлоридов.

Основной диагностический прием, позволяющим дифференцировать дистальный канальцевый ацидоз от проксимального – определение фракционной экскреции бикарбоната. В норме и при дистальном канальцевом ацидозе фракционная экскреция би-

карбонатов составляет не более 5%, а при проксимальном канальцевом ацидозе эта величина превышает 15%.

Для оценки канальцевой функции почек применяют ряд **функциональных нагрузочных тестов**:

- **Тест на способность почек к закислению мочи.** Пациенту дают выпить раствор хлорида аммония в количестве 0,1 г/кг массы тела. Затем собирают мочу через 4 и 8 часов. В этих порциях определяют рН, титруемую кислотность, концентрацию ионов аммония. В норме после нагрузки хлоридом аммония рН мочи становится ниже 5,5 и в 2-3 раза увеличивается выделение ионов водорода в виде титруемой кислотности и ионов аммония. В случае дистального канальцевого ацидоза рН в пробах мочи будет больше, чем 5,5, и выведение ионов водорода существенно не изменится.

- **Тест нагрузки гидрокарбонатом натрия.** Пациенту внутривенно вводят раствор гидрокарбоната натрия до тех пор, пока уровень HCO_3^- не достигнет 24 ммоль/л. В крови определяют концентрацию креатинина и гидрокарбоната. Затем в порции мочи, взятой через два часа, также определяют концентрацию креатинина и гидрокарбоната. Затем рассчитывают **фракционную экскрецию гидрокарбоната (Fe HCO_3^-)** по формуле:

$$\text{Fe HCO}_3^- = (\text{HCO}_3^-_{\text{мочи}} : [\text{HCO}_3^-_{\text{плазмы}}]) \times ([\text{креатинин}_{\text{плазмы}}] : [\text{креатинин}_{\text{мочи}}]) \times 100 \%$$

У здорового человека показатель Fe HCO_3^- не превышает 3%. В случае развития дистального канальцевого ацидоза фракционная экскреция гидрокарбоната незначительно увеличивается и составляет 3-5%. Значительное увеличение Fe HCO_3^- (до 15% и более) наблюдается при проксимальном канальцевом ацидозе.

Для оценки структурной целостности почечных канальцев выполняется определение в моче активности фермента **β -N-ацилглюкозаминидаза (β -NAG)**. Он появляется в моче при остром канальцевом некрозе.

Референтный уровень – <5 Ед/л.

Лабораторная диагностика ОПН

Острая почечная недостаточность (ОПН) – внезапное, потенциально обратимое нарушение функции почек с гиперазотемией, у ряда пациентов – с олигурией (часовой диурез менее 20 мл) и гиперкалиемией (калий плазмы выше 5,2 ммоль/л).

ОПН диагностируется у 5% пациентов, обращающихся за терапевтической или хирургической помощью, и у 30% из числа пациентов отделений интенсивной терапии.

По причинам развития ОПН условно делится на 3 вида:

- преренальная (около 70% случаев ОПН);
- ренальная (25%);
- постренальная (5%).

Половина пациентов имеют смешанный характер ОПН. ОПН на фоне ХПН диагностируется в 13% случаев.

Преренальная ОПН – физиологический ответ на снижение перфузии почек, выражающийся в снижении КФ, гиперазотемии, олигурии.

Основные причины данного вида ОПН:

- гиповолемия (обезвоживание, кровотечение, излишняя стимуляция диуреза, рвота, диарея, перераспределение в «третье пространство»);
- низкий сердечный выброс (застойная сердечная недостаточность);
- системная вазодилатация (сепсис, нейрогенный шок);
- прием лекарств (НПВС у пациентов с уменьшенным ОЦК, ингибиторов АПФ при стенозе почечных артерий или малом ОЦК, других антигипертензивных средств, циклоспорина, амфотерицина В).

Таким образом, не реализуется компенсаторное расширение (миогенное, за счет простагландинов и оксида азота) прегломерулярных сосудов и сужение (под влиянием ангиотензина II) постгломерулярных артериол.

Таблица 31. – Диагностика преренальной ОПН

Клиника	Анализ мочи
Признаки снижения ОЦК (жажда, ортостатическая или постоянная артериальная гипотония и тахикардия, спадение шейных вен, потребление жидкости превышает диурез), прием НПВС, ингибиторов АПФ	<ul style="list-style-type: none"> • гиалиновые цилиндры • $Fe_{Na} < 1\%$, • $Na < 20$ ммоль/л, • отн. плотность > 1018 ед.

В ряде случаев диагностическая ценность определения фракционной экскреции натрия снижается.

Ложное повышение Fe_{Na} более 1%:

- сочетание преренальной ОПН с ХПН;
- на фоне приема диуретиков;
- острое увеличение ОЦК.

Ложное снижение Fe_{Na} менее 1%:

- острый гломерулонефрит с олигурией;
- васкулит с сохраненной функцией канальцев;
- в некоторых случаях острого тубулоинтерстициального нефрита;
- ОПН на рентгенконтрастные вещества, гемсодержащие пигменты;
- первые 48 ч перехода преренальной ОПН в острый тубулярный некроз.

Диагностика ренальной ОПН

Ренальная ОПН – следствие паренхиматозного заболевания почек (ОГН, ОТИН) и/или тубулярного некроза (ишемического, нефротоксического).

Основные причины ***ишемического тубулярного некроза***:

- длительная гипоперфузия почек (исход преренальной ОПН);
- реперфузионное повреждение (образование радикалов кислорода, разрывов клеточных мембран, поступления кальция и др. катионов в клетку, уменьшение запасов макроэргов, фосфатов, дисфункция митохондрий).

Нефротоксический тубулярный некроз развивается:

- при действии экзотоксинов (рентгенконтрасты, аминогликозиды, противоопухолевые препараты, фторсодержащие анестетики, соли тяжелых металлов, органические растворители);
- под влиянием эндотоксинов (миоглобин при рабдомиолизе, гемоглобин, синдром распада опухоли, миелома, гиперкальциемия).

Летальность при остром тубулярном некрозе составляет 50-70%. Основные причины:

- инфекции (30-70%);
- сердечно-сосудистые осложнения (5-30%);
- желудочно-кишечные, легочные, неврологические осложнения (7-30%);
- гиперкалиемия или технические проблемы диализа (1-2%).

Таблица 32. – Дифференциальная диагностика преренальной и ренальной ОПН

Показатели	Преренальная ОПН	Ренальная ОПН
Относительная плотность мочи	1,018 ед. и более	Около 1010 ед.
Натрий мочи	Менее 20 ммоль/л	Более 40 ммоль/л
Фракционная экскреция натрия	Менее 1%	Более 1,5%
Осмоляльность мочи	Более 500 мосм/кг воды	Менее 300 мосм/кг воды
Осадок мочи	Нормальный либо с примесью гиалиновых цилиндров	Клетки почечных канальцев и «грязно-бурые» гранулярные цилиндры

Постренальная (обтурационная) ОПН

Механизмы развития постренальной ОПН:

- обструкция уретры или мочеоточника ведет к росту почечного кровотока более чем на 40%, после чего кровоток падает в результате ответной вазоконстрикции;

- проксимальнее места обструкции повышается внутриканальцевое давление, из-за чего уменьшается фильтрационное давление и скорость клубочковой фильтрации.

Таблица 33. – Диагностика постренальной ОПН

Причины ОПН	Клинические данные	Анализ мочи
<ul style="list-style-type: none"> • Мочекаменная болезнь; • опухоли мочеточников, органов малого таза; • фиброз забрюшинного пространства 	В анамнезе – приступы почечной колики, указание на опухоль, чередование анурии с полиурией. Боль в животе, пояснице, специфическая симптоматика со стороны органов малого таза	Часто в норме; гематурия при мочекаменной болезни, кровотечении, раке и аденоме предстательной железы

КЛИНИКО-БИОХИМИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ПЕРИОДА БЕРЕМЕННОСТИ

При беременности в организме женщины происходит целый ряд адаптационно-приспособительных процессов, охватывающих многие органы и системы. Эти физиологические изменения направлены на обеспечение адекватного течения гестационного периода, роста и развития плода, а также готовят организм к родам и лактации. С одной стороны, эти процессы обусловлены повышенной нагрузкой на разные системы, что у здоровых женщин в связи с механизмами адаптации не проявляется соответствующей симптоматикой, с другой стороны, различные патологические состояния могут развиваться во время беременности даже при скрытом их течении до ее наступления. Мать доставляет плоду все необходимые питательные вещества и выводит продукты обмена, что обуславливает повышенную нагрузку на большинство органов и систем. Степень этой нагрузки меняется в течение беременности и нарастает с увеличением ее срока.

Беременность – состояние длительной физиологической адаптации организма женщины, которая необходима для удовлетворения потребностей растущего плода. Выраженность данной адаптации несколько превышает потребности плода, что позволяет создать значительные резервы, позволяющие переносить разные стрессовые ситуации, сохраняя развитие беременности и жизнедеятельность плода. Превышение функциональных возможностей организма матери приводит к формированию признаков патологической беременности, что может закончиться ее прерыванием.

Изменения в организме женщины во время беременности связаны с процессами интенсивного развития плода и проявляются ростом интенсивности выработки гормонов, появлением новых биологически активных веществ, которые не вырабатываются во внебеременном состоянии. Значительная перестройка жизнедеятельности организма беременной сопровождается изменениями в системах крови, гемостаза, эндокринной, иммунной, а также биохимического состояния организма.

Лабораторные показатели беременных и небеременных женщин отличаются друг от друга, поэтому очень важно опреде-

лить их «нормы». Знание показателей «нормы беременности» гомеостаза и функций всех систем организма необходимо для оптимизации диспансерного наблюдения беременных, а также эффективной профилактики различных осложнений у матери.

В настоящее время отсутствуют полноценные источники по нормативам метаболических показателей, оценивающих физиологическое состояние беременных женщин. Несмотря на наличие разрозненных данных по изменению отдельных лабораторных показателей при беременности, существует необходимость их обобщения и дополнения. Актуальность данной работы подтверждается еще и фактом частого использования «норм», характерных для небеременных женщин, что может привести к неверной интерпретации результатов.

Биохимические показатели крови при физиологической беременности

При физиологической беременности в организме матери отмечаются выраженные сдвиги гомеостаза, направленные на обеспечение нормального развития плода. Обмен веществ у беременных характеризуется преобладанием анаболических процессов, что сопровождается увеличением продуктов катаболизма (CO_2 , азотистые соединения и др.). Отмечается увеличение объема циркулирующей крови, которое рассматривается как компенсаторная реакция организма на предполагаемую в родах кровопотерю. Одновременно с этим происходит усиление кровоснабжения жизненно важных органов, таких как печень, почки и эндокринные железы.

Наиболее выраженные изменения происходят в матке, что связано с гипертрофическими и гиперпластическими перестройками гладкомышечных элементов и ростом плодного яйца. У беременных отмечается увеличение скорости клубочковой фильтрации, начиная с 15-17-й недели беременности, которое достигает максимума к 20-25-й неделе. Далее клубочковая фильтрация стабилизируется и в некоторых случаях, даже несколько снижается.

Физиологическая беременность сопровождается существенными изменениями в эндокринной системе. Наблюдается увеличение гормональной функции гипофиза, особенно его передней

доли. Отмечается усиление выработки фолликулостимулирующего гормона и АКТГ. Увеличение эндокринной деятельности гипофиза нередко сопровождается умеренными признаками акромегалии. В яичниках беременной вырабатываются эстрогены и прогестерон, способствующий формированию децидуальной оболочки, гиперплазии мышц, а также снижению сократительной функции матки. Все это направлено на обеспечение благоприятных условий для развития плода. Достаточно высокой гормональной активностью обладает плацента, где вырабатываются прогестерон, плацентарный лактоген, эстрогены и хорионический гонадотропин. В первой половине беременности отмечается гиперфункция щитовидной железы. Повышение при этом концентрации общего тироксина плазмы связано с увеличением уровня тироксинсвязывающего глобулина, содержание свободного гормона остается при этом в пределах нормы.

Таким образом, физиологическая беременность сопровождается многочисленными изменениями в организме. Ниже рассматриваются изменения основных обменных процессов, происходящих в организме беременных.

Белковый спектр крови

При беременности достаточно часто наблюдается снижение концентрации общего белка в плазме, которое, по-видимому, обусловлено как частичным разведением крови вследствие задержки жидкости в организме, так и понижением концентрации альбумина, что связано с усиленным его использованием в биосинтетических процессах. Как один из влияющих факторов при этом может рассматриваться изменение проницаемости сосудистых мембран и перераспределение жидкости и белка в экстраклеточном пространстве. Изменение гормонального статуса при беременности приводит к увеличению содержания многих специфических белков-переносчиков, что сопровождается пропорциональным увеличением уровней связанных с ними соединений. При этом концентрация данного вещества, не связанного с белком, не изменяется, а именно она определяет биологические эффекты.

Изменения концентрации отдельных белков крови при беременности обнаруживаются и на протеинограмме (рис. 39-40).

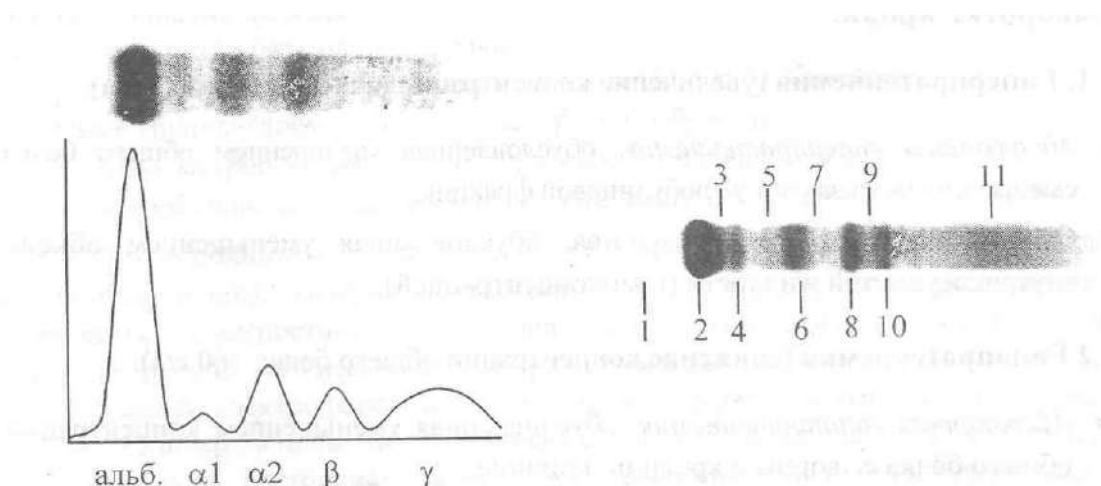


Рисунок 39. – Нормальная протеинограмма сыворотки крови
 1 – преальбумин, 2 – альбумин, 3 – α -липопротеин, 4 – Gc-глобулин,
 5 – α 1-антитрипсин, 6 – α 2-макроглобулин, 7 – гаптоглобин, 8 – β -
 липопротеины, 9 – трансферрин, 10 – комплемент, 11 – γ -глобулины

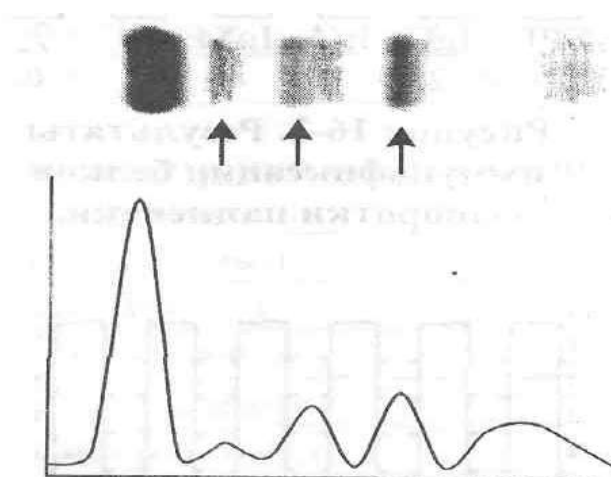


Рисунок 40. – Протеинограмма при физиологической беременности

В I и во II триместрах беременности отмечается снижение фракции альбумина, а в последнем триместре выявляется увеличение α 1-глобулиновой фракции, главным образом за счет роста уровня α 1-антитрипсина (его уровень может повышаться в 2 раза), α 1-кислого гликопротеида и α -фетопротеина.

Содержание α 2-глобулиновой фракции может быть увеличено за счет белков, повышение которых связано с развитием беременности – α 2-макроглобулин, церулоплазмин. Концентрации этих протеинов начинают повышаться с 8-12-й недели и достигают максимума к III триместру. Увеличение фракции α -глобулинов происходит из-за роста концентрации α 1-

гликопротеида, что коррелирует с массой плаценты, а также α -липопротеидов и трансферрина.

Основные белковые фракции сыворотки крови у небеременных

Вид белка	% от общего белка	г/л
альбумин	52-65	35-50
α 1-глобулин	2-4,5	1-3
α 2-глобулин	10-15	6-9
β -глобулин	6-13	4-9
γ -глобулин	10-19	6-13
общий белок		65-82

Белковые фракции крови при физиологической беременности

Вид белка	% от общего белка	г/л
альбумин	46,4	32
α 1-глобулин	5,7	4
α 2-глобулин	14,5	10
β -глобулин	16	11
γ -глобулин	17,4	12
общий белок		69

Незначительные изменения уровня С-реактивного белка (СРБ), наблюдаемые чаще в ранние сроки беременности, могут быть реакцией организма на процессы пролиферации. Изменение объема циркулирующей крови и кровоснабжения почек приводит к изменению азотовыделительной функции. Происходит задержка и накопление в крови азотистых веществ, однако концентрация остаточного азота не изменяется за счет некоторого снижения уровня мочевины, особенно в поздние сроки беременности, что связано с повышенной утилизацией белка (положительный азотистый баланс). Понижение концентрации креатинина наблюдается преимущественно в I и во II триместрах беременности. Одна из причин снижения уровня метаболитов азотистого обмена – увеличение почечного клиренса, что является результатом усиления кровоснабжения данного органа. Концентрация мочевой кислоты понижается за счет преобладания процессов ассимиля-

ции, но даже незначительные нарушения функции почек могут привести к ее увеличению. Усиление белкового обмена сопровождается образованием значительного количества промежуточных токсических продуктов (молекул средней массы), накопление которых приводит к появлению симптомов токсемии у беременных.

Липидный обмен

Липидный обмен у беременных претерпевает существенные изменения. Интенсификация окислительных процессов приводит к увеличению утилизации холестерина в надпочечниках и плаценте для синтеза стероидных гормонов, а также кальцитриола в почках. Следствием этого является развивающаяся при беременности компенсаторная транзиторная гиперхолестеролемиа. Помимо роста уровня общего холестерина, в крови происходит также увеличение концентрации холестерина ЛПНП. Уровень α -холестерола (холестерина ЛПВП) при этом практически не изменяется. Увеличение уровня эстрогенов в организме беременной приводит к развитию гипертриглицеридемии, чему также способствует гипопропротеинемия и функциональный холестаз. Развивающееся при беременности регионарное отложение жира в молочных железах и подкожно-жировой клетчатке связано с увеличением перехода углеводов в жиры под влиянием гиперинсулинемии.

Углеводный обмен

Углеводный обмен у беременных интенсифицирован в связи с увеличением активности энергоемких биосинтетических процессов в организме. Углеводы хорошо усваиваются, откладываясь в виде гликогена в печени, мышцах, плаценте и децидуальной оболочке матки. Начинает преобладать аэробный гликолиз, активизируется гликогенолиз и глюконеогенез. Так как у плода преобладает анаэробный гликолиз, в организме беременной происходит накопление молочной кислоты и других недоокисленных продуктов, что истощает общую буферную емкость крови и приводит к развитию метаболического ацидоза, который осложняется дыхательным алкалозом вследствие усиленной альвеолярной гипервентиляции.

Уровень гликемии при физиологической беременности меняется неоднозначно и может как оставаться в пределах нормы, так и снижаться или несколько повышаться. Изменения уровня глюкозы крови у беременной связаны с эндокринными сдвигами в организме: секреция плацентой кортизола и плацентарного лактогена, которые являются контринсулярными гормонами, и изменение метаболизма самого инсулина. Для физиологической беременности характерно развитие инсулинорезистентности и, как следствие этого, компенсаторного роста секреции гормона. Изменение резистентности периферических тканей у беременных зависит от величины капиллярного кровотока и определяется нарушением трансэндотелиального обмена инсулина с клетками-мишенями и изменением пострецепторного эффекта гормона. Баланс этих процессов и определяет в итоге уровень глюкозы в крови при физиологической беременности.

В организме беременных происходит повышение проницаемости эпителия почечных канальцев и увеличение скорости клубочковой фильтрации, что периодически сопровождается кратковременной физиологической глюкозурией. Примерно у 50-60% женщин максимальная реабсорбция глюкозы снижена в первые 3 месяца беременности, повышаясь затем по мере увеличения скорости клубочковой фильтрации. Наиболее часто глюкозурия появляется при беременности сроком 27-36 недель.

Гликированный гемоглобин (HbA_{1c}) как маркер контроля метаболизма глюкозы у беременных является неадекватным. Это объясняется как снижением общего уровня глюкозы крови, так и падением срока полужизни эритроцитов по причине развития анемии во время беременности.

Кислотно-основное состояние, водно-электролитный и минеральный обмен

При физиологической беременности происходит увеличение интенсивности газообмена, что связано с ростом потребности органов и тканей материнского организма в кислороде, который необходим в больших количествах и развивающемуся плоду. Одновременно с этим происходит накопление в крови углекислоты, что сопровождается развитием легочной гипервентиляции. Увеличение в организме беременной содержания продуктов метабо-

лизма белков, липидов и углеводов, а также CO_2 приводит к развитию физиологического метаболического ацидоза, сопровождающегося нарушениями водного-электролитного обмена.

Содержание гидрокарбоната в крови в третьем триместре беременности несколько снижается и составляет $20,4 \pm 0,77$ против $22 \pm 0,19$ ммоль/л в первом триместре. Изменяется также показатель избытка или недостатка буферных оснований (ВЕ), он составляет, соответственно, -4 и $-2,1$ ммоль/л. Наблюдаемая у беременных гипокапния ($\text{pCO}_2 = 31,3 \pm 0,67$ мм рт. ст.) носит компенсаторный характер и является следствием легочной гипервентиляции. Во время физиологических родов в крови здоровой женщины увеличивается концентрация недоокисленных продуктов углеводного обмена, количество лактата при этом не изменяется. В процессе родов постепенно снижается уровень гидрокарбоната (с $19,6 \pm 0,78$ в начале родов до $14,8 \pm 0,79$ ммоль/л во второй период), а также развивается дефицит буферных оснований (до $-8,83$ ммоль/л).

Характерные сдвиги кислотно-основного состояния наблюдаются и у плода. Возникающий к концу физиологической беременности ацидоз носит метаболический характер с колебаниями рН артериальной крови от $7,26$ до $7,35$ ед. Умеренно выраженные явления ацидоза, некоторый дефицит кислородного снабжения плода, наблюдающиеся к концу беременности, особенно в период родов, полностью компенсируются и не приводят к развитию внутриутробной гипоксии.

Рождение ребенка сопровождается усилением признаков ацидоза, что проявляется даже при удовлетворительной легочной вентиляции и продолжается несколько минут. Умеренно выраженный метаболический ацидоз сохраняется в организме новорожденного в течение нескольких часов после рождения. К концу первых суток жизни рН возвращается к нормальным значениям, а присутствующий дефицит буферных оснований нивелируется и достигает нормы к концу шестых суток.

Физиологическая беременность отличается выраженными изменениями состояния гидратации в связи с повышенной потребностью в воде организма матери и плода. Важную роль при этом играют гормональные сдвиги у беременных. В частности, происходит избыточное образование антидиуретического гормо-

на (АДГ), которое приводит к изменению величины осмолальности плазмы крови. В материнском организме преобладает тенденция к задержке воды и образованию отеков. Наблюдается также гиперфосфатемия и изменение обмена кальция. Рост концентрации фосфора в крови согласуется с повышением активности щелочной фосфатазы, свидетельствующей о повышенном метаболизме костной ткани. Увеличение активности фермента происходит в основном за счет нарастания термостабильной плацентарной и костной изоформ, однако некоторый прирост может происходить и за счет печеночной изоформы, что связано с явлениями холестаза, наблюдаемыми во второй половине беременности.

При физиологически протекающей беременности наблюдаются определенные изменения минерального обмена. При этом наиболее высока потребность в солях кальция, необходимого для формирования скелета плода, что нередко вызывает кальциевый дефицит в организме беременной. Недостаток кальция может сопровождаться явлениями спазмофилии, судорожными сокращениями икроножных мышц и др. Гипокальциемия, развивающаяся в период беременности, способствует гипопротеинемии, изменению функции паратгормона и определенный дефицит кальцитриола. В целом потребность в кальции при физиологической беременности повышается на 700-6000 мг в день. Развивающаяся у женщин гипокальциемия, возможно, связана как с нарушением канальцевого транспорта кальция, так и со снижением функциональной активности нефронов почек по мере повышенного расходования минерала. Увеличение расхода железа во время беременности (об этом свидетельствует снижение уровня сывороточного железа, сывороточного ферритина, повышение общей железосвязывающей способности сыворотки) создает условия к развитию анемии у будущей матери.

Таким образом, физиологическая беременность сопровождается изменением функционального состояния многих систем организма, что направлено на поддержание жизнедеятельности плода. Данные основных биохимических показателей крови у женщин при физиологически протекающей беременности представлены в табл. 3.

**Биохимические показатели крови у небеременных
и беременных женщин**

Показатели	Небеременные	Беременные (II-III триместр)
Белки		
Общий белок, г/л	60-85	N или снижен
Альбумин, г/л	35-50	28-40
С- реактивный белок, мг/л	до 10	до 10
Тимоловая проба, ед.	0-4	
Углеводы		
Глюкоза, ммоль/л	4,0-6,1 3,3-5,5	3,8-5,7
сыворотка		3,3-5,0
капиллярная кровь		
HbA1c	4,0-6,5% от общего Hb	
Пигменты		
Билирубин, мкмоль/л	8,5-20,5 2,1-5,1	
общий		
прямой		
Азотистые компоненты		
Мочевина, ммоль/л	2,5-8,3	2,8-7,1
Креатинин, мкмоль/л	44-97	39,8-72,8
Мочевая кислота, ммоль/л	0,16-0,4	0,12-0,28
Электролиты		
Натрий, ммоль/л	135-145	Умеренно снижен
Калий, ммоль/л	3,5-5,2	4,55-6,63
Хлор, ммоль/л	97 – 108	
Кальций, ммоль/л	2,2-2,6	2,0-2,4
Магний, ммоль/л	0,66-0,99	Снижен
Сывор. железо, ммоль/л	10,22-22,0	4,61-20,24
ОЖСС, мкмоль/л	44,8-76,1	Повышена
Сывор. ферритин, нг/мл	28,3-97,7	7-36,8
Трансферин, мг/100 мл	189,4-294,8	263,6-418,2
Ферменты		
АлАТ, Ед/л	5-40	
АсАТ, Ед/л	5-45	
Щелочная фосфатаза, Ед/л	70 – 260	Повышается в 2 раза

Липиды		
Общий холестерол, ммоль/л	до 5,2	Повышается в 2 раза
Триглицериды, ммоль/л	0,55-2,29	Постепенно повышается
Холестерол ЛПВП, ммоль/л	0,9-1,9	

Большинство биологически активных компонентов содержится в амниотической жидкости. Их количество определяет ее коллоидно-осмотическое состояние и меняется в течение беременности, так как вначале данная жидкость больше подобна плазме крови, а в конце – является первичной мочой плода.

Состав амниотической жидкости в норме

Показатели	Триместр беременности		
	I	II	III
Осмоляльность, мосм/кг	281±12,5	272±4,3	254±16
Натрий, ммоль/л	136±5,1	134±3,4	125±5,0
Калий, ммоль/л	3,9±0,18	4±0,1	4,3±0,4
Хлор, ммоль/л	109±3,9	107±1,6	104±3,7
Кальций, ммоль/л	1,67±0,12	1,9±0,21	1,9±0,34
Магний, ммоль/л	0,7±0,2	0,6±0,07	0,55±0,17
Мочевина, ммоль/л	3,8±0,9	4±0,8	6,3±1,6
Креатинин, ммоль/л	70±9,0	88±12,0	192±44
Глюкоза, ммоль/л	2,67±0,65	2±0,4	1,5±0,5
Общий белок, г/л	5,0±2,0	8±4,0	3±1,0

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Бышевский, А. Ш. Биохимия для врача /А. Ш. Бышевский, О. А. Терсенов. – Екатеринбург: Уральский рабочий, 1994. – 394 с. : ил., цв. ил.
2. Долгов В. В., Мошкин А. В. и др. Обеспечение качества в лабораторной медицине – М.: РМАПО, 1997. – 90 с.
3. Иванов, Е. П. Руководство по гемостазиологии: (нормальные нарушения функции системы гемостаза, клинико-лабораторная диагностика кровотечений, тромбозов и ДВС-синдрома): руководство / Е. П. Иванов. – Минск: Беларусь, 1991. – 302 с.: ил.
4. Кишкун, А. А. Руководство по лабораторным методам диагностики / А. А. Кишкун. – М.: ГЭОТАР-МЕД., 2007. – 780 с.
5. Меньшиков В. В. Обеспечение качества лабораторных исследований. – М.: Лабинформ, 1999. - 320 с.
6. Методы клинических лабораторных исследований: учебник / под ред. В. С. Камышникова. – 3-е изд., перераб. и доп. – Минск: Белорусская наука, 2002, 2009. – 752 с. : ил., цв. ил.
7. Назаренко, Г. И. Клиническая оценка результатов лабораторных исследований / Г. И. Назаренко, А. А. Кишкун. – М.: Медицина, 2000. – 544 с.
8. Новикова, И. А. Клиническая биохимия. Основы лабораторного анализа : учеб. пособие для студ. учрежд., обеспечивающих получение высш. мед. образ. по спец. «Мед.-диагност. дело» / И. А. Новикова, А. С. Прокопович. - 2-е изд., стереотип. - Гомель: ГомГМУ, 2012. - 167 с.: ил.
9. Ткачук, В. А. Клиническая биохимия/В. А. Ткачук. – М.: ГЭОТАР-МЕД., 2004. – 512 с.
10. Управление качеством клинических лабораторных исследований. Нормативные документы / Под редакцией В. В. Меньшикова. – М.: Лаб-пресс, 2000. - 202 с.
11. Цыганенко, А. Я. Клиническая биохимия: учебное пособие / А. Я. Цыганенко, В. И. Жуков, В. В. Мясоедов, И. В. Завгородний. – М.: Триада, 2002. – 502 с.

Сергей Владимирович ЛЕЛЕВИЧ
КЛИНИЧЕСКАЯ БИОХИМИЯ
Учебное пособие
Издание второе, стереотипное

Зав. редакцией
медицинской литературы *В. Л. Михалева*

ЛР № 065466 от 21.10.97
Гигиенический сертификат 78.01.10.953.П.1028
от 14.04.2016 г., выдан ЦГСЭН в СПб

Издательство «ЛАНЬ»
lan@lanbook.ru; www.lanbook.com
196105, Санкт-Петербург, пр. Ю. Гагарина, д. 1, лит. А.
Тел./факс: (812) 336-25-09, 412-92-72.
Бесплатный звонок по России: 8-800-700-40-71

ГДЕ КУПИТЬ

ДЛЯ ОРГАНИЗАЦИЙ:

*Для того, чтобы заказать необходимые Вам книги, достаточно обратиться
в любую из торговых компаний Издательского Дома «ЛАНЬ»:*

по России и зарубежью
«ЛАНЬ-ТРЕЙД». 196105, Санкт-Петербург, пр. Ю. Гагарина, д. 1, лит. А.
тел.: (812) 412-85-78, 412-14-45, 412-85-82; тел./факс: (812) 412-54-93
e-mail: trade@lanbook.ru; ICQ: 446-869-967

www.lanbook.com
пункт меню «Где купить»
раздел «Прайс-листы, каталоги»

в Москве и в Московской области
«ЛАНЬ-ПРЕСС». 109263, Москва, 7-я ул. Текстильщиков, д. 6/19
тел.: (499) 178-65-85; e-mail: lanpress@lanbook.ru

в Краснодаре и в Краснодарском крае
«ЛАНЬ-ЮГ». 350901, Краснодар, ул. Жлобы, д. 1/1
тел.: (861) 274-10-35; e-mail: lankrd98@mail.ru

ДЛЯ РОЗНИЧНЫХ ПОКУПАТЕЛЕЙ:

интернет-магазин
Издательство «Лань»: <http://www.lanbook.com>
магазин электронных книг
Global F5: <http://globalf5.com/>

Подписано в печать 26.03.18.
Бумага офсетная. Гарнитура Школьная. Формат 60×90^{1/16}.
Печать офсетная. Усл. п. л. 19,00. Тираж 100 экз.

Заказ № 200-18.

Отпечатано в полном соответствии
с качеством предоставленного оригинал-макета
в АО «Т8 Издательские Технологии».
109316, г. Москва, Волгоградский пр., д. 42, к. 5.