

Министерство здравоохранения Российской Федерации

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ДОПОЛНИТЕЛЬНОГО ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО ОБРАЗОВАНИЯ
РОССИЙСКАЯ МЕДИЦИНСКАЯ АКАДЕМИЯ НЕПРЕРЫВНОГО
ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО ОБРАЗОВАНИЯ

УТВЕРЖДЕНО
Решением Учебно-методического
совета ФГБОУ ДПО РМАНПО
Минздрава России
« 28 » ноября 2016г.

КЛИНИЧЕСКАЯ ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА

Учебник

Москва

2016

УДК 616-071:371.3(075.8)

ББК 53.4я7

Д64

Клиническая лабораторная диагностика: учебник / Под ред. В.В. Долгова, ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования». – М.: ФГБОУ ДПО РМАНПО, 2016. – 668 с. ISBN 978-5-7249-2608-9

Учебник по клинической лабораторной диагностике создан согласно учебному плану и программе подготовки врачей клинической лабораторной диагностики в ординатуре. Первый том включает главы по правовым, организационным, экономическим основам лабораторной службы, действиям лабораторных специалистов на преаналитическом, аналитическом и постаналитическом этапах лабораторного анализа и таким субдисциплинам как лабораторная гематология, общеклинические (химико-микроскопические) исследования и клиническая биохимия. Эти разделы лабораторных исследований являются базовыми для лабораторных специалистов, используются на всех уровнях лабораторных исследований: в лабораториях первичного амбулаторно-поликлинического звена, в диагностических центрах, централизованных лабораториях, в клинико-диагностических лабораториях стационаров. В учебнике сделан акцент на разъяснение диагностической значимости лабораторных показателей и на комплексной оценке результатов лабораторных исследований при системных и органических патологиях. В учебнике приведены сведения, которые заложены в контрольно-измерительные материалы по специальности 31.08.05 «Клиническая лабораторная диагностика», которые применяются при сертификационных экзаменах.

Учебник может быть использован студентами медицинских ВУЗов при подготовке к первичной аккредитации по специальности клиническая лабораторная диагностика и при подготовке клинических ординаторов.

Рубрикация по МКБ-10: Класс XVIII. Симптомы, признаки и отклонения от нормы, выявленные при клинических и лабораторных исследованиях, не классифицируемые в других рубриках.

УДК 616-071:371.3(075.8)

ББК 53.4я7

Табл. 5 . Ил. 31. Библиогр.: 21 назв.

Рецензенты: д.м.н., профессор, заведующая кафедрой клинической лабораторной диагностики ФУВ ГБУЗ МО «МОНИКИ им. М.Ф. Владимирского»

- С.Н. Шатохина

д.б.н., профессор кафедры общей и биологической химии, клинической лабораторной диагностики ФГБОУ ВО «Алтайский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ

- С.А. Ельчанинова

д.м.н., профессор, заведующий кафедрой клинической лабораторной диагностики ФГБОУ ВО СЗГМУ им. И.И. Мечникова Минздрава России

- А.В. Козлов

ISBN 978-5-7249-2608-9

© ФГБОУ ДПО РМАНПО, 2016

АВТОРСКИЙ КОЛЛЕКТИВ 1 ТОМА УЧЕБНИКА КЛИНИЧЕСКАЯ ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА

- | | | |
|--|---|--|
| Бугров
Алексей
Викторович | — | к.м. н., доцент кафедры клинической лабораторной диагностики ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия последипломного образования Минздрава РФ», Москва |
| Долгов
Владимир
Владимирович | — | д.м.н., профессор, заведующий кафедрой клинической лабораторной диагностики ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия последипломного образования Минздрава РФ», профессор кафедры общей и медицинской биофизики Российского национального исследовательского медицинского университета им. Н.И. Пирогова, Москва |
| Казаков
Сергей
Петрович | — | д.м.н., профессор, заведующий кафедрой иммунологии ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия последипломного образования Минздрава РФ», начальник Центра клинической лабораторной диагностики Главного военного клинического госпиталя им. Н.Н. Бурденко, Москва |
| Луговская
Светлана
Алексеевна | — | д.м.н., профессор кафедры клинической лабораторной диагностики ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия последипломного образования Минздрава РФ», Москва |
| Миронова
Ирина
Ивановна | — | к.м.н., доцент кафедры клинической лабораторной диагностики ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия последипломного образования Минздрава РФ», Москва |
| Почтарь
Маргарита
Евгеньевна | — | к.м.н., доцент кафедры клинической лабораторной диагностики ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия последипломного образования Минздрава РФ», Москва |
| Ракова
Наталия
Геннадиевна | — | к.м.н., доцент кафедры клинической лабораторной диагностики ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия последипломного образования Минздрава РФ»
доцент кафедры общей и медицинской биофизики Российского национального исследовательского медицинского университета им. Н.И. Пирогова, Москва |
| Ройтман
Александр
Польевич | — | д.м.н., профессор кафедры клинической лабораторной диагностики ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия последипломного образования Минздрава РФ», Москва |
| Романова
Людмила | — | к.м.н., доцент кафедры клинической лабораторной диагностики ФГБОУ ДПО «Российская медицинская |

Андреевна	академия последипломного образования Минздрава РФ», Москва
Селиванова	к.м.н., старший лаборант кафедры клинической лабораторной диагностики ФГБОУ ДПО «Российская
Анна	– медицинская академия последипломного образования
Владимировна	Минздрава РФ», врач-эндокринолог, Медицинский центр «Здоровье» Королев, Московская область
Соснин	д.м.н., доцент кафедры клинической лабораторной диагностики дополнительного профессионального
Дмитрий	– образования ФГБОУ ВО «Пермский государственный
Юрьевич	медицинский университет им. академика Е.А. Вагнера» Минздрава РФ
Шабалова	д.м.н., профессор кафедры клинической лабораторной диагностики ФГБОУ ДПО «Российская медицинская
Ирина	– академия последипломного образования Минздрава
Петровна	РФ», Москва
Шевченко	д.м.н., профессор, заместитель директора по научной работе ФГБУ «Федеральный научный центр
Ольга	– трансплантологии и искусственных органов им. акад.
Павловна	В.И. Шумакова» Минздрава РФ, Москва
Щетникович	к.м.н., доцент кафедры клинической лабораторной диагностики ФГБОУ ДПО «Российская медицинская
Клавдия	– академия последипломного образования Минздрава
Александровна	РФ», Москва

ОГЛАВЛЕНИЕ

Введение.....	28
Глава 1. Правовые, организационные и экономические основы лабораторной службы России (В.В. Долгов).....	31
1.1. Законодательство по охране здоровья граждан в Российской Федерации.....	31
1.1.1. Правовые, организационные и экономические основы охраны здоровья. Система медицинского страхования.....	31
1.1.2. Права и обязанности медицинских организаций.....	33
1.1.3. Права и обязанности врача.....	34
1.1.4. Стандарты и порядки оказания медицинской помощи.....	34
1.1.5. Программа государственных гарантий.....	36
1.1.6. Профессиональные правонарушения медицинских работников, ответственность за их совершение.....	36
1.2. Правовые, организационные и экономические аспекты деятельности клинических лабораторий.....	38
1.2.1. Правовые основы деятельности клинико-диагностических лабораторий.....	38
1.2.2. Типы клинико-диагностических лабораторий.....	38
1.2.3. Задачи клинической лабораторной диагностики в сфере охраны здоровья.....	39
1.2.4. Профилактика заболеваний. Профилактические лабораторные обследования. Программы скрининга и лабораторные исследования...	41
1.2.5. Цели и задачи диспансеризации. Роль клинических лабораторий в диспансерном обследовании.....	42
1.2.6. Номенклатура клинических лабораторных исследований.....	42
1.2.7. Кадровое обеспечение клинических лабораторий.....	43
1.2.8. Требования к материально-техническому оснащению клинических лабораторий.....	44
1.2.9. Экономические основы деятельности клинической лаборатории.....	45
1.2.10. Охрана труда в клинических лабораториях.....	46
1.2.11. Санитарно-противоэпидемический режим в клинических лабораториях.....	46
1.3. Контрольные материалы к главе 1.....	48
Контрольные вопросы.....	48
Тесты.....	48

Глава 2. Действия медицинского персонала на этапах лабораторного анализа (И.И. Миронова, Л.А. Романова, С.П. Казаков, А.В. Бугров, С.А. Луговская, И.П. Шаболова, А.П. Ройтман).....	51
2.1. Преаналитический этап лабораторного анализа	51
Назначение анализа клиницистом.....	52
Получение материала для исследования.....	56
Получение биоматериала и подготовка препаратов для морфологического исследования из органов систем:	
— Бронхо-легочной системы.....	57
— Органов пищеварительной системы.....	58
— Органов мочевыделительной системы.....	60
— Лимфатических узлов, молочной, щитовидной и других желез.....	63
— Материала из женских половых органов.....	65
— Материала из мужских половых органов.....	67
2.2. Взятие крови для исследований:	
— Капиллярной, венозной крови для выполнения клинического анализа ручными методами.....	70
— Для исследования на автоматических гематологических анализаторах.....	73
— Сыворотки и плазмы крови.....	74
— Для приготовления толстой капли.....	76
— Из вены для обнаружения LE-клеток.....	77
2.3. Получение материала для цитологического исследования:	78
— Получение спинномозговой жидкости.....	78
— Материала для цитологического исследования выпотных жидкостей.....	79
— Материалов для паразитологического исследования.....	80
— Материала для исследования кожи и волос.....	81
— Биоматериала для микробиологических исследований.....	83
— Стабилизация, транспортировка, хранение биоматериала.....	86
2.4. Преаналитический лабораторный этап	88
2.4.1. Приготовление препаратов из крови, мочи, мокроты, кала, ликвора, выпотных и других жидкостей для микроскопии:	
— Нативного препарата.....	88
— Окрашенного препарата.....	90
— Толстой капли.....	91
2.4.2. Обогащение препаратов методами флотации, седиментации	92
2.4.3. Цитоцентрифугирование	93
2.4.4. Автоматизация этапа пробоподготовки	94

2.5. Аналитический этап лабораторного анализа	96
2.5.1. Техника основных манипуляций при выполнении лабораторного анализа:	
— Дозирования жидкостей.....	96
— Взвешивания.....	99
— Фильтрации.....	100
— Центрифугирование.....	100
— Дистилляция.....	101
— Приготовления растворов.....	103
2.6. Методы клинических лабораторных исследований:	
— Фотометрические.....	105
— Иммунохимические фотометрические.....	114
— Микроскопические.....	127
— Особенности микроскопических методов при микробиологических (бактериоскопических), цитологических исследованиях.....	129
— Иммуноцитохимические исследования.....	133
— Ионоселективный анализ.....	133
— Анализ газов крови и гемоксиметрия.....	134
— Молекулярно-генетические методы анализа.....	138
— Клоттинговые методы исследования гемостаза.....	142
— Автоматизированный подсчет клеток крови.....	146
— Проточная цитофлуориметрия.....	151
— Электрофорез.....	154
— Хроматографические методы.....	156
— Микрочиповая технология.....	157
— Культуральный метод.....	159
— Методы экспресс-анализа.....	160
2.6.1. Стандарты лабораторных медицинских технологий (стандарты аналитического этапа лабораторного анализа)	163
2.7. Постаналитический этап лабораторного анализа	165
2.7.1. Внутрилабораторная часть постаналитического анализа	165
— Проверка результата анализа специалистом лаборатории.....	165
— Формирование лабораторного заключения.....	166
— Консультирование лечащего врача по результатам лабораторных исследований.....	169
2.7.2. Внелабораторная часть постаналитического анализа	171
2.8. Контрольные материалы к главе 2	173
Контрольные вопросы.....	173
Тесты.....	174

Глава 3. Общие вопросы гематологии (С.А. Луговская, М.Е. Почтарь)	176
3.1. Современные представления о кроветворении	176
3.2. Структурная организация костного мозга, гемопоэз	178
3.2.1. Эритропоэз	179
— Морфологическая и функциональная характеристика клеточных элементов эритроидного ряда.....	179
— Понятие об эффективном, неэффективном и терминальном эритропоэзе.....	182
— Иммунология эритроцитов.....	183
— Обмен витамина В12, фолиевой кислоты, профиринов.....	184
— Обмен железа.....	187
— Обмен гемоглобина.....	192
— Обмен желчных пигментов.....	193
3.2.2. Гранулоцитопоэз	194
— Морфологическая и функциональная характеристика клеточных элементов гранулоцитарного ряда.....	195
3.2.3. Моноцитопоэз	199
— Морфологическая и функциональная характеристика клеточных элементов моноцитарного ряда.....	200
3.2.4. Мегакариоцитопоэз	203
— Морфологическая и функциональная характеристика клеточных элементов мегакариоцитарного ряда.....	203
3.2.5. Лимфоцитопоэз	205
— Морфологическая и функциональная характеристика клеточных элементов лимфоидного ряда.....	207
3.3. Исследования в лабораторной гематологии	212
3.3.1. Общий анализ крови	212
3.3.2. Автоматизированное исследование клеток крови	214
— Эритроцитарные параметры.....	214
— Ретикулоцитарные параметры.....	221
— Тромбоцитарные параметры.....	222
— Лейкоцитарные параметры.....	223
— Подсчет лейкоцитарной формулы.....	224
3.3.3. Оценка скорости оседания эритроцитов (далее – СОЭ)	225
3.3.4. Исследование пунктата костного мозга	226
— Микроскопическое исследование костного мозга (миелограмма).....	227
— Клинико-диагностическое значение миелограммы.....	232

3.3.5. Цитохимические исследования гемопоэтических клеток.....	235
— Миелопероксидаза.....	235
— Липиды.....	236
— PAS-реакция.....	238
— Неспецифические эстеразы.....	239
— Кислая фосфатаза.....	240
— Щелочная фосфатаза.....	241
— Окраска на сидеробласты.....	241
— Оценка результатов цитохимических реакций. Значение цитохимических реакций в онкогематологии.....	242
3.3.6. Проточная цитофлюориметрия, ее диагностическое значение.....	243
3.3.7. Цитогенетические и молекулярные исследования, диагностическое значение.....	247
3.4. Реактивные изменения крови.....	250
— Лейкоцитоз.....	250
— Лейкопения.....	251
— Нейтрофилез и нейтропения.....	252
— Эозинофилия и эозинопения.....	254
— Базофилия.....	256
— Моноцитоз и моноцитопения.....	257
— Лимфоцитоз и лимфоцитопения.....	257
— Эритроцитоз.....	259
— Эритроцитопения.....	260
— Тромбоцитоз.....	260
— Тромбоцитопения.....	261
3.5. Заболевания системы кроветворения.....	263
3.5.1. Анемии, классификации анемий.....	263
Постгеморрагическая анемия.....	266
Гипохромные анемии.....	267
— Железодефицитная анемия.....	267
— Анемии, связанные с нарушением синтеза порфиринов (сидеробластные анемии).....	271
Нормохромные анемии.....	272
— Анемии хронических заболеваний.....	272
— Анемия при хронической почечной недостаточности.....	274
— Апластические анемии.....	275
Мегалобластные анемии.....	276
— В12 – дефицитная анемия.....	276
— Фолиеводефицитная анемия.....	277
Гемолитические анемии.....	278

— Наследственные гемолитические анемии, обусловленные дефектом мембраны эритроцитов.....	278
— Наследственные гемолитические анемии, обусловленные нарушением синтеза глобиновых цепей.....	280
— Наследственные гемолитические анемии, обусловленные носительством аномального гемоглобина.....	281
— Наследственные гемолитические анемии, обусловленные дефицитом ферментов эритроцитов.....	283
— Анемии, обусловленные внеэритроцитарными факторами...	285
— Иммунные гемолитические анемии.....	285
— Аутоиммунные гемолитические анемии.....	285
— Гемолитические анемии, обусловленные соматической мутацией клеток-предшественников гемопоэза. Пароксизмальная ночная гемоглобинурия (болезнь Маркиафава-Микели).....	286
— Гемолитические анемии, обусловленные механическим повреждением эритроцитов.....	287
3.5.2. Гемобластозы.....	288
— Острые лейкозы. Классификации острых лейкозов.....	289
— Острые миелоидные лейкозы.....	289
— Острые лимфобластные лейкозы.....	293
— Смешанные острые лейкозы.....	295
3.5.3. Миелодиспластические синдромы.....	296
3.5.4. Миелопролиферативные заболевания. Классификация миелопролиферативных заболеваний.....	300
— Хронический миелолейкоз.....	301
— Сублейкемический миелоз.....	302
— Эритремия (истинная полицитемия).....	303
— Хронический мегакариоцитарный лейкоз.....	304
3.5.5. Лимфопролиферативные заболевания.....	305
— Классификация лимфопролиферативных заболеваний.....	305
— Лимфоидные опухоли из клеток-предшественников.....	307
— В-клеточные опухоли из зрелых (периферических) клеток...	308
— Т-клеточные опухоли из зрелых (периферических) Т-клеток.....	313
— Агрессивный НК-клеточный лейкоз.....	314
3.6. Контрольные материалы к главе 3.....	315
Контрольные вопросы.....	315
Тесты.....	317
Глава 4. Общеклинические (химико-микроскопические) исследования (И.И. Миронова Л.А. Романова, Д.Ю. Соснин).....	320

4.1. Заболевания бронхо-легочной системы.....	320
4.1.1. Исследование мокроты.....	320
— Исследование физических свойств мокроты.....	320
— Морфологическое и бактериоскопическое исследование мокроты при неспецифических процессах, хронических инфекциях, аллергических заболеваниях, микозах.....	322
— Бактериоскопическое исследование препаратов, окрашенных по Цилю-Нильсену.....	336
4.1.2. Клиническое значение химико-микроскопических лабораторных исследований.....	338
— Туберкулез легких.....	341
— Бронхиальная астма.....	341
4.2. Исследование содержимого желудочно-кишечного тракта.....	344
4.2.1. Заболевания органов пищеварительной системы.....	344
— Исследование физических и химических свойств желудочного содержимого.....	344
— Кислото-, ферменто-, белковообразующие и эвакуаторная функции желудка.....	345
— Сок поджелудочной железы.....	346
— Исследование дуоденального содержимого, физические свойства.....	347
— Микроскопическое исследование дуоденального содержимого при заболеваниях двенадцатиперстной кишки и желчевыделительной системы.....	348
— Клиническое значение химико-микроскопических лабораторных исследований.....	352
4.2.2. Заболевания кишечника.....	354
— Исследование физических и химических свойств кишечного содержимого.....	354
— Микроскопическое исследование отделяемого кишечника.....	361
— Интерпретация результатов копрологического исследования при ахилии-ахлоргидрии, гиперхлоргидрии, ахолии, быстрой эвакуации пищи из желудка.....	362
— Особенности копрограмм при заболеваниях поджелудочной железы, тонкой и толстой кишки, нарушения эвакуаторной функции кишечника и врожденной патологии.....	363
4.3. Исследование мочи.....	368
4.3.1. Технология исследования мочи.....	368
— Исследование физических и химических свойств мочи.....	368

— Микроскопическое исследование осадка мочи. Автоматизированный анализ мочевого осадка.....	390
— Особенности осадка мочи при поражении клубочков, канальцев и интерстициальной ткани почек. Отражательная фотометрия с использованием тест-полосок «сухая химия».....	392
4.3.2. Диагностическое значение элементов мочевого осадка.....	393
— Эритроциты и продукты их распада.....	393
— Лейкоциты.....	394
— Цилиндры.....	395
— Эпителий.....	397
4.3.3. Диагностическое значение исследования мочи.....	399
— Нефриты, нефрозы.....	399
— Острая почечная недостаточность.....	401
— Хроническая почечная недостаточность.....	403
4.4. Диагностика заболеваний женских половых органов.....	404
4.4.1. Исследование вагинального отделяемого.....	404
— Микроскопическое исследование вагинального отделяемого.....	404
4.4.2. Оценка гормонального профиля женщин.....	406
4.4.3. Выявление дисбиоза влагалища.....	409
— Выявление патогенной бактериальной флоры, признаков вирусной инфекции, микозов в отделяемом влагалища.....	410
4.5. Диагностика заболеваний мужских половых органов.....	411
4.5.1. Исследование семенной жидкости (эякулята).....	411
— Исследование физических и химических свойств.....	412
— Биохимическое исследование спермы.....	414
— Микроскопическое исследование спермы.....	415
— Иммунологическое исследование спермы.....	420
— Бактериоскопическое исследование спермы.....	421
4.5.2. Исследование секрета предстательной железы.....	422
— Материал из простаты.....	422
— Оценка диагностической значимости результатов.....	422
4.5.3. Оценка репродуктивной функции.....	423
4.5.4. Оценка воспалительного процесса.....	425
4.6. Диагностика заболеваний центральной нервной системы.....	426
4.6.1. Исследование ликвора.....	426
— Исследование физических и химических свойств спинномозговой жидкости.....	428
— Биохимическое исследование спинномозговой жидкости.....	431

— Микроскопическое исследование клеточного состава спинномозговой жидкости.....	434
— Клиническое значение химико-микроскопических лабораторных исследований.....	436
4.6.2. Исследование выпотных жидкостей.....	437
4.6.2.1. Серозные оболочки и серозная жидкость.....	437
— Патогенез возникновения трансудатов и экссудатов.....	439
4.6.2.2. Исследование физических и химических свойств выпотных жидкостей.....	440
— Физические свойства выпотных жидкостей.....	440
— Биохимические показатели серозной жидкости.....	442
4.6.2.3. Микроскопическое исследование клеточного состава выпотных жидкостей.....	445
4.6.2.4. Клиническое значение химико-микроскопических лабораторных исследований.....	449
— Опухолевые маркеры.....	449
— Цитологическое исследование.....	450
— Асцитическая жидкость.....	452
4.7. Контрольные материалы к главе 4.....	453
Контрольные вопросы.....	453
Тесты.....	455
Глава 5. Биохимические исследования (В.В. Долгов О.П. Шевченко, А.П. Ройтман, Н.Г. Ракова, К.А. Щетникович, А.В. Селиванова).....	459
5.1. Биохимия и патобиохимия белков и аминокислот.....	459
5.1.2. Функции белков.....	459
— Транспортные белки.....	460
— Структурные белки.....	461
— Белки и пептиды как биологически активные вещества.....	462
— Иммунные свойства белка.....	463
5.1.3. Особенности метаболизма отдельных аминокислот.....	464
— Образование и обезвреживание аммиака.....	464
— Образование мочевины.....	465
— Образование креатинина.....	466
— Клиническое значение определения креатинина и мочевины. Клиренс креатинина.....	467
— Образование мочевой кислоты. Гиперурикемия при подагре.....	469
— Нарушения обмена отдельных аминокислот.....	470
5.1.4. Белки плазмы крови.....	473
— Состав и функции белков плазмы крови.....	473

— Общий белок.....	473
— Альбумин.....	476
— Гипопротеинемия, гиперпротеинемия, диспротеинемия, парапротеинемия. Причины развития.....	478
— Электрофорез белков сыворотки крови.....	481
5.1.5. Специфические белки плазмы крови. Клиническое значение определения белков плазмы крови.....	485
— Белки острой фазы воспаления.....	485
— Белки системы комплемента.....	489
— Транспортные белки.....	492
— Иммуноглобулины.....	495
— Апобелки липопротеидов.....	498
5.1.6. Клиническое значение определения маркерных белков и пептидов.....	500
— Миоглобин.....	500
— Тропонины.....	501
— Мозговой натрийуретический пептид.....	504
— Терминальные пептиды коллагена.....	504
— Прокальцитонин.....	505
— Пресепсин.....	506
5.2. Лабораторная энзимология.....	506
5.2.1. Структура и характеристика ферментов.....	506
— Структура ферментов.....	506
— Кинетика ферментативных реакций.....	507
— Специфичность действия ферментов.....	509
— Классификация ферментов. Типы катализируемых реакций.....	509
— Органные особенности биосинтеза и локализации ферментов.....	511
— Изоферменты.....	513
5.2.2. Клинико-диагностическое значение определения активности отдельных ферментов.....	514
— Лактатдегидрогеназа и ее изоферменты.....	514
— Аланинаминотрансфераза.....	515
— Аспаратаминотрансфераза.....	517
— Креатинкиназа и ее изоферменты.....	518
— Гамма-глутамилтранспептидаза.....	519
— Альфа-амилаза.....	521
— Холинэстераза.....	522
— Кислая фосфатаза.....	523
— Щелочная фосфатаза и ее фракции.....	524
— Липаза.....	525

5.2.3. Диагностическое значение профилей ферментов при патологии.....	526
— Заболевания сердечно-сосудистой системы.....	527
— Заболевания печени.....	528
— Заболевания поджелудочной железы.....	530
— Заболевания скелетных мышц.....	531
5.3. Основы биохимии и патофизиология углеводов.....	532
5.3.1. Обмен глюкозы.....	532
— Регуляция обмена глюкозы в организме.....	532
— Гипо- и гипергликемии. Причины развития.....	534
— Глюкозурии. Клиническое значение определения глюкозы в крови и моче.....	536
5.3.2. Метаболический синдром.....	537
— Критерии метаболического синдрома.....	537
— Патогенез метаболического синдрома.....	538
— Критерии лабораторной диагностики метаболического синдрома.....	539
5.3.3. Сахарный диабет.....	541
— Нарушения углеводного, липидного, белкового обменов при сахарном диабете.....	541
— Лабораторная диагностика нарушений обмена глюкозы, диагностика сахарного диабета.....	544
— Тест толерантности к глюкозе. Выполнение и интерпретация результатов.....	545
— Гликированные белки, контроль за компенсацией сахарного диабета.....	546
— Лабораторная диагностика осложнений сахарного диабета.....	548
— Гестационный сахарный диабет. Лабораторная диагностика.....	551
5.3.4. Обмен дисахаридов и его нарушения.....	552
— Непереносимость лактозы.....	552
— Непереносимость сахарозы.....	553
5.3.5. Обмен гликогена.....	554
— Гликогеновая болезнь. Типы гликогенозов. Механизм развития.....	554
— Лабораторная диагностика гликогенозов.....	555
5.4. Основы биохимии и патофизиология липидов.....	556
5.4.1. Обмен липидов.....	556
— Регуляция обмена липидов.....	556
— Липопротеиды, их строение, функции в организме.....	558

— Метаболизм липопротеинов в крови и органах.....	560
5.4.2. Типы дислипидемий.....	563
— Первичные и вторичные дислипидемии.....	564
— Лабораторные исследования, выявляющие дислипидемии.....	566
— Клиническое значение типирования дислипидемий.....	567
— Характер изменений липопротеинов при некоторых заболеваниях.....	567
5.4.3. Диагностическое значение определения показателей липидограммы.....	568
— Холестерин общий.....	568
— Холестерин липопротеинов высокой плотности.....	569
— Холестерин липопротеинов низкой плотности.....	570
— Холестерин липопротеинов очень низкой плотности.....	571
— Триглицериды.....	571
— Свободные жирные кислоты.....	572
— Фосфолипиды.....	573
5.4.4. Нарушения обмена липидов.....	574
— Перекисное окисление липидов мембран, лабораторные показатели.....	574
— Нарушения обмена липидов при заболеваниях печени и желчевыводящих путей.....	575
— Нарушения обмена липидов при атеросклерозе.....	575
— Нарушения обмена липидов при сахарном диабете.....	576
— Патобиохимия ожирения.....	577
— Наследственные нарушения липидного обмена.....	579
5.5. Биохимия поддержания гомеостаза гормонами и биологически активными веществами.....	580
5.1.1. Биологически активные вещества. Химическая природа, физиологические и возможные патологические эффекты, клиническое значение определения.....	580
— Ренин и ангиотензин.....	580
— Серотонин.....	581
— Гистамин.....	582
— Простагландины и лейкотриены.....	583
— Интерлейкины.....	584
— Калликреин и брадикинин.....	585
5.1.2. Лабораторная оценка функционального состояния эндокринной системы.....	586
— Каскадный принцип строения гормональной системы.....	586

— Релизинг-факторы гипоталамо-гипофизарной системы.....	587
— Тропные гормоны гипофиза.....	587
— Гормоны задней доли ипофиза.....	589
— Лабораторная оценка гормональной активности щитовидной железы.....	590
— Лабораторная оценка гормональной активности паращитовидных желез.....	593
— Лабораторная оценка гормональной активности поджелудочной железы.....	594
— Лабораторная оценка гормональной активности надпочечников.....	596
— Лабораторная оценка гормональной активности женских половых желез.....	599
— Лабораторная оценка гормональной активности мужских половых желез.....	600
— Лабораторная оценка гормональной активности фетоплацентарного комплекса.....	601

5.6. Химия и патохимия водно-электролитного и кислотно-основного гомеостаза.....

5.6.1. Обмен жидкостей в организме.....

— Распределение воды в жидкостных пространствах. Понятие об осмотическом давлении.....	604
— Факторы, влияющие на перемещение воды и электролитов между клеткой и внеклеточным пространством.....	605
— Роль почек в поддержании баланса воды и натрия.....	608
— Участие ренин-ангиотензин-альдостероновой системы, натрийуретического и антидиуретического гормонов в осмо- и волюморегуляции.....	608
— Гипо-, изо-, гиперосмотическое изменение объема внеклеточной жидкости.....	610

5.6.2. Регуляция обмена, клинические проявления и лабораторные показатели нарушений обмена электролитов и минеральных веществ...611

— Лабораторные методы и диагностическое значение определения калия.....	612
— Лабораторные методы и диагностическое значение определения натрия.....	614
— Лабораторные методы и диагностическое значение определения кальция.....	616
— Лабораторные методы и диагностическое значение определения магния.....	619
— Лабораторные методы и диагностическое значение определения фосфора.....	620

— Лабораторные методы и диагностическое значение определения хлора.....	621
— Лабораторные методы и диагностическое значение определения меди.....	623
5.6.3. Кислотно-основное состояние.....	624
— Образование кислот и оснований в процессе обмена веществ и выделение их из организма.....	624
— Механизмы регуляции рН крови.....	625
— Легочная система регуляции КОС.....	626
— Почечная система регуляции КОС и электролитов.....	626
— Желудочно-кишечная система и ее роль в поддержании постоянства КОС.....	627
— Референтные показатели КОС, изменения КОС при патологических состояниях.....	628
— Показатели КОС на анализаторах.....	629
— Клинико-диагностическое значение определяемых показателей КОС.....	630
— Лабораторные показатели при ацидозе и алкалозе.....	631
— Лабораторные показатели при респираторных и метаболических нарушениях КОС.....	632
5.6.4. Обмен порфиринов и желчных пигментов. Лабораторная диагностика нарушений обмена порфиринов.....	634
— Содержание порфиринов в эритроцитах, моче, кале.....	634
— Порфирии.....	635
— Лабораторная диагностика эритропоэтических порфирий....	636
— Лабораторная диагностика печеночных порфирий.....	638
— Порфиринурии и их лабораторная диагностика.....	639
5.6.5. Лабораторная диагностика нарушений обмена желчных пигментов.....	640
— Образование, транспорт и выделение желчных пигментов....	640
— Клиническое значение определения билирубина, его фракций и продуктов обмена.....	641
— Дифференциальная диагностика желтух.....	643
5.7. Биохимические исследования при отдельных заболеваниях, их осложнениях, синдромах.....	645
5.7.1. Лабораторные маркеры заболеваний печени.....	645
— Гепатит, цирроз, дистрофия.....	645
— Печеночная кома.....	647
— Рак печени.....	648
5.7.2. Лабораторные маркеры заболеваний поджелудочной железы.....	649
— Панкреатит, панкреонекроз.....	649

— Сахарный диабет.....	651
5.7.3. Лабораторные маркеры заболеваний сердечно-сосудистой системы.....	651
— Инфаркт миокарда.....	651
— Сердечная недостаточность.....	654
— Инсульт.....	656
— Артериальная гипертензия (гипертоническая болезнь).....	657
— Атеросклероз.....	659
5.7.4. Лабораторные маркеры заболеваний почек.....	663
— Нефриты.....	663
— Нефрозы.....	665
— Острое почечное повреждение.....	666
— Хроническое почечное повреждение.....	667
5.7.5. Лабораторные маркеры метаболических заболеваний костной ткани.....	670
— Остеопороз.....	671
— Рахит, остеомалация.....	673
— Метастазы опухоли в кость.....	675
— Лабораторные исследования для диагностики метаболических заболеваний костной ткани.....	675
5.8. Контрольные материалы к главе 5.....	678
Контрольные вопросы.....	678
Тесты.....	680

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- BNP – мозговой натрийуретический пептид
- BE – bases excess, избыток буферных оснований
- CD – кластеры дифференцировки
- Clt – общий клиренс
- CV – коэффициент вариации
- FITC – флюоресцеинизотиоционат
- GPI – гликозилфосфатидилинозитол
- Hb – гемоглобин
- HbA_{1c} – гликированный гемоглобин
- HbO₂, HbCO, MetHb – фракции гемоглобина: окси-, карбокси-, метгемоглобин
- HCT (*hematocrit*) – гематокрит
- HLA – лейкоцитарные антигены человека, система тканевой совместимости человека
- hs-СРБ – уровень С-реактивного белка, определенный высокочувствительным методом
- Ig – иммуноглобулин
- LE-клетка – клетка красной волчанки (Lupus Erythematosus Cells)
- MALT – экстранодальная лимфома маргинальной зоны
- MB – макроглобулинемия Вальденстрема
- MCH – среднее содержание гемоглобина в эритроците
- MCHC – средняя концентрация гемоглобина в эритроците
- MCV – средний объём эритроцита
- NGAL – липокалин, ассоциированный с нейтрофильной желатиназой
- NK – натуральные (естественные) киллеры
- NTproBNP – аминотерминальный фрагмент BNP
- PAI-1/ИАП-1 – *plasminogen activator inhibitor 1*, ингибитор активатора плазминогена 1

PCT – *platelet crit* – тромбоцит

PDGF – *platelet-derived Growth Factor*, фактор роста тромбоцитарный

PDW – *platelet distribution width*, ширина гистограммы по объёму тромбоцитов, степень тромбоцитарного анизоцитоза)

PLT (*platelet*) – тромбоцит

proBNP – прогормон мозгового натрийуретического пептида

pO₂ pCO₂ – напряжение кислорода, углекислого газа

RBC – эритроциты (

RDW – ширина распределения эритроцитов по объёму

RET – ретикулоцит

RQ-PCR – ПЦР в реальном времени

SAA – амилоидный белок А сыворотки

sTfR – растворимые рецепторы к трансферрину

SB – стандартный избыток оснований

TGF – тромбоцитарный фактор роста

TORCH – английская аббревиатура инфекций токсоплазмоз, краснуха, корь, герпес

ТРКФ – костная тартрат-резистентная кислая фосфатаза

WBC (white blood cells) – лейкоциты

AA – апластическая анемия

АГ – антиген

АДФ – аденозин дифосфат

АИГА – аутоиммунные гемолитические анемии.

АКТГ – адренкортикотропный гормон

АЛК – аминоклевулиновая кислота

АЛТ – аланинаминотрансфераза

Анти-рец. ТТГ, α -RTSH – антитела к рецептору ТТГ

АПК – антигенпредставляющие клетки

АпоА-1 – аполипротеин А-I

АпоА-II – аполипротеин А-II

АПФ – ангиотензин-превращающий фермент
АСТ – аспартатаминотрансфераза
АТ – антитело
АТППК1 – аминотерминальные пропептиды проколлагена I типа
АТТК1 – аминотерминальные телопептиды коллагена I типа
АФП – α -фетопротеин
АХЗ – анемия хронических заболеваний
БАЛ – бронхоальвеолярный лаваж
БОЕ-Э – бурстобразующие единицы эритропоэза
БТХ – белок Тамма-Хорсфалла
ВИЧ – вирус иммунодефицита
ВОЗ – всемирная организация здравоохранения
ВПЧ – вирус папилломы человека
ВФ – внутренний фактор Касла
ВЭЖХ (HPLC) – высокоэффективная газовая хроматография
Г-6-ФД – глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа
ГГТ – гаммаглутамилтранспептидаза
ГГЦ – гипергомоцистеинемия
Г-КСФ – гранулоцитарный колониестимулирующий фактор
ГлДГ – глутаматдегидрогеназа
ГЛП – гиперлиппротеидемия
ГМГ-КОА – гидроксиметилглутарил-КоА
ГМ-КСФ – гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор
ГСПГ – глобулин, связывающий половые гормоны
ГТТ – глюкозотолерантный тест
ГХ – газовая хроматография
ГЭБ – гемато-энцефалический барьер
ДВС – диссеминированное внутрисосудистое свертывание
ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ДПИД – дезоксипиридинолин
ЖДА – железодефицитная анемия.
ЖК – жирные кислоты
ЖКТ – желудочно-кишечный тракт
ЖХ–МС – жидкостная хроматография–масс-спектрометрия
ИБ – история болезни
ИБС – ишемическая болезнь сердца
ИЛ (IL) – интерлейкин
ИМ – инфаркт миокарда
ИМБСТ – инфаркт миокарда без подъема ST интервала
ИППП – инфекция, передаваемая половым путем
ИСН – индекс созревания нейтрофилов
ИСЭ – индекс созревания эритрокариоцитов
ИФА – иммуноферментный анализ
ИФЛ – иммунофлюоресценция
ИХЛ – иммунохемилюминесценция
КДЛ – клиничко-диагностическая лаборатория
КК – креатинкиназа
ККС – калликреин - кининовая система
КОЕ – колониеобразующие единицы
КОЕ-Г – колониеобразующая единица гранулоцитопоеза
КОЕ-ГМ – колониеобразующая единица грануломоноцитопоеза
КОЕ-ГЭММ – колониеобразующая единица гранулоцитарно-эритроцитарно-макрофагально-мегакариоцитарная
КОЕ-Э – колониеобразующие единицы эритроидного ряда
КОС – кислотно-основное состояние
КС – кортикостероид
КТШК1 – карбокситерминальные пропептиды проколлагена I типа
КТТК1 – карбокситерминальные телопептиды коллагена I типа
КУМ – кислотоустойчивые микобактерии

КФ – кислая фосфатаза
КЩФ – костный изофермент щелочной фосфатазы\
ЛАС – лабораторная автоматизированная система
ЛГ – лютеинизирующий гормон
ЛДГ – лактатдегидрогеназа
ЛП – липопротеин
ЛПВП – липопротеиды высокой плотности
ЛПЗ – лимфопролиферативные заболевания
ЛПНП – липопротеиды низкой плотности
ЛПОНП – липопротеиды очень низкой плотности
ЛППП – липопротеиды промежуточной плотности
ЛПУ – лечебно-профилактическое учреждение
ЛП-ФЛА2 – липопротеин-ассоциированная фосфолипаза А2
ЛТ – лейкотриены
ЛУ – лимфатический узел
ЛХАТ – лецитинхолестеринацилтрансфераза
МАР-тест – тест на смешанную антиглобулиновую реакцию
МАТ – моноклональные антитела
МГ – миоглобин
МДС – миелодиспластический синдром
МПЗ – миелолифферативное заболевание /
МПО – миелопероксидаза
МС – метаболический синдром
МФА – метод флуоресцентного анализа
НАД – никотинамидадениндинуклеотид
НСЕ – нейроспецифическая енолаза
НТЖ – насыщение трансферрина железом
НУФ – натрийуретический фактор
НЭ – неспецифическая эстераза
ОЖСС – общая железосвязывающая способность.

ОИМ – острый инфаркт миокарда
ОК – остеокальцин
ОКС – острый коронарный синдром
ОЛ – острый лейкоз.
ОЛЛ – острый лимфобластный лейкоз
ОМЛ – острый миелолейкоз.
ОП – оксипролин
ОПН – острая почечная недостаточность
ОПП – острое повреждение почек
ОРВИ – острая респираторная вирусная инфекция.
ОСН – острая сердечная недостаточность
ОТ – объем талии
ОЦК – объем циркулирующей крови
ПА – преренальная азотемия
ПААГ – полиакриламид
ПГ – простагландин
ПГТТ – пероральный глюкозотолерантный тест
ПГХС – полигенная гиперхолестеринемия
ПИД – пиридинолин
ПИФ – прямая иммунофлуоресценция
ПКТ – прокальцитонин
ПНГ – пароксизмальная ночная гемоглобинурия
ПСА – простатспецифический антиген
ПСП – пресепсин
ПТГ – паратиреоидный гормон
ПТГЛ – печеночная триглицеридлипаза
ПЦР – полимеразная цепная реакция
РАИБ – рефрактерная анемия с избытком бластов
РАКС – рефрактерная анемия с кольцевидными сидеробластами
РИА – радиоизотопный анализ

РИФ – реакция иммунофлуоресценции
РНК – рибонуклеиновая кислота
РЦМД – рефрактерная цитопения с многоростковой дисплазией
РЭА – раково-эмбриональный антиген
СА – раковый антиген
сБСЖК – сердечный белок, связывающий жирные кислоты
СД – сахарный диабет
СЖК – свободные жирные кислоты
СКК – стволовые кроветворные клетки
СКФ – скорость клубочковой фильтрации
СМЖ – спинномозговая жидкость
СМФ – система мононуклеарных фагоцитов
СОП – стандартная операционная процедура
СОЭ – скорость оседания эритроцитов
СРБ – С-реактивный белок
СРГ – соматотропин релизинг-гормон
ССЗ – сердечно-сосудистое заболевание
СТГ – соматотропный гормон
СЦК – средний цитохимический коэффициент
Т3 – трийодтиронин
Т4 – тироксин
ТГ – триглицериды
Тн – тропонин
ТСГ – тироксин связывающий глобулин
ТСИ – тиреоид-стимулирующий иммуноглобулин
ТТГ – тиреотропный гормон
ФАБ-классификация – Франко–Американо–Британская классификация
ФДК – фолликулярные дендритные клетки
ФЗ – федеральный закон
ФЛ – фосфолипиды

ФНО – фактор некроза опухоли
ФСГ – фолликулостимулирующий гормон
ФХ – фосфатидилхолин
ХГЧ – хорионический гонадотропин человека
ХЛЛ – хронический лимфолейкоз
ХМ – хиломикроны
ХМЛ – хронический миелолейкоз
ХММЛ – хронический миеломоноцитарный лейкоз
ХМПЗ – хронические миелопролиферативные заболевания
ХПН – хроническая почечная недостаточность
ХС-ЛПВП – холестерин липопротеидов высокой плотности
ХЭ – холинэстераза
ЦМВ – цитомегаловирус
ЦНС – центральная нервная система
ЩФ – щелочная фосфатаза
ЭДТА – этилендиаминтетраацетат
ЭПО – эритропоэтин
ЭТ – эндотелин
эЭПО – эндогенный эритропоэтин

ВВЕДЕНИЕ

В России в клинико-диагностических лабораториях системы здравоохранения работает около 15 тысяч специалистов с высшим медицинским образованием. Готовятся врачи клинической лабораторной диагностики на последипломном этапе в клинической ординатуре. Тем не менее, до настоящего времени не создано учебника по клинической лабораторной диагностике. В основном материал для подготовки врачей изложен в многочисленных учебных пособиях, руководствах, справочниках. Создание настоящего учебника заполняет этот пробел и предоставляет учебным организациям, участвующим в подготовке специалистов по лабораторной медицине полноценный учебник по клинической лабораторной диагностике.

Актуальность создания учебника по клинической лабораторной диагностике связана также с переходом системы подготовки врачей на новый образовательный стандарт, в основе которого лежит профессиональный стандарт. Согласно этим документам врачом клинической лабораторной диагностики смогут работать выпускники медицинских институтов, успешно прошедшие первичную аккредитацию соответственно по клинической лабораторной диагностике. Отсутствие учебника ставит в затруднительное положение, как преподавателей медицинских институтов, так и учащихся при подготовке аккредитации на врача клинической лабораторной диагностики.

Настоящий учебник создан коллективом профессиональных преподавателей в основном ФГБОУ ДПО Российская медицинская академия последипломного образования Министерства здравоохранения Российской Федерации, имеющих богатый опыт работы в системе последипломного образования. В основу учебника положена учебная программа подготовки ординаторов по клинической лабораторной диагностике. Учебник состоит из 11 глав, разделенных на 2 тома.

В первый том вошло 5 глав. В 1 главу включены разделы, касающиеся законодательных основ деятельности клиничко-диагностических лабораторий (КДЛ) и работы врачей клинической лабораторной диагностики. Материал изложен с позиции логики построения работы КДЛ, а не конкретных приказов или стандартов, так как эти подзаконные акты систематически обновляются в соответствии практикой перестройки здравоохранения и подготовки кадров. Во второй главе представлены материалы по организации лабораторных исследований на преаналитическом, аналитическом и постаналитическом этапах. Подробно изложены материалы подготовки биопроб к исследованиям на долабораторном этапе, на котором в настоящее время происходит наибольшее количество погрешностей, влияющих на весь результат лабораторного исследования. Авторы раздела старались учесть различные варианты подготовки биопроб для выполнения анализа. Аналитическая работа в КДЛ подробно изложена в описании принципов и методов лабораторных исследований. Особенностью этого раздела является отсутствие интерпретации получаемых результатов при использовании различных технологий. Это же сказалось и на изложении послеаналитического этапа, так как в последующих главах фактически излагается клиничко-диагностическое значение и дается интерпретация результатов лабораторных исследований, что является задачей послеаналитического этапа и фактически определяет врача клинической лабораторной диагностики как диагноста. Третья глава – изложение основ лабораторной гематологии. Анализ крови является практически обязательным при самом широком перечне заболеваний, используется повсеместно на любом из уровней лабораторного обследования. В анализе крови за последнее время произошли значимые изменения: помимо микроскопии внедрены в лаборатории автоматические гематологические анализаторы. Тем не менее, как микроскопия препаратов, так и анализ гемограмм являются обязательными для врачей клинической лабораторной диагностики. Авторы учебника намеренно ушли от включения в материалы

микрофотографий крови и результатов с гематологических анализаторов. Эти материалы подробно изложены в учебных пособиях «Гематологический атлас», методических рекомендациях «Гематологические анализаторы, интерпретация анализа крови» авторов данного раздела учебника. Четвертая глава представляет раздел общеклинические (химико-микроскопические) исследования. Это также обязательные исследования в клинко-диагностических лабораториях: анализ мочи, кала, мокроты, ликвора, выпотных жидкостей. Этот материал также изложен с позиции интерпретации результатов анализа и ожидаемых патологических результатов при заболеваниях органов и систем. Конкретные морфологические микроскопические примеры патологии при анализе вышеперечисленных биопроб изложены в учебно-практическом руководстве «Общеклинические исследования: моча, кал, ликвор, мокрота» авторов этого раздела. Пятый раздел – биохимические исследования. В этом разделе подробно представлено клинко-диагностическое значение отдельных анализов и характерные изменения лабораторных маркеров при заболеваниях печени, поджелудочной железы, почек, сердечнососудистой системы, костной ткани.

Материалы первого тома могут быть использованы при модульном обучении по перечисленным разделам, которые можно обозначить как субспециальности клинической лабораторной диагностики. Если принять за основу идею о модульном освоении специальности клиническая лабораторная диагностика, то материалы 1 тома можно рассматривать как необходимые по подготовке к первичной аккредитации по специальности клиническая лабораторная диагностика.

За последнее время существенно расширились объем и информативность объективных сведений о состоянии организма обследуемого пациента, которые лабораторная медицина может предоставить лечащему врачу. Эти сведения также представлены в учебнике. Хочется предположить, что учебник будет полезен и при подготовке врачей

клинических специальностей, расширит их знания о диагностических возможностях современной лабораторной службы, диагностической значимости лабораторных технологий и лабораторных показателей.

ГЛАВА 1. ПРАВОВЫЕ, ОРГАНИЗАЦИОННЫЕ И ЭКОНОМИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ЛАБОРАТОРНОЙ СЛУЖБЫ РОССИИ

1.1. Законодательство по охране здоровья граждан в Российской Федерации

1.1.1. Правовые, организационные и экономические основы охраны здоровья. Система медицинского страхования

Важнейшей целью государственной политики в области здравоохранения является обеспечение доступности и качества медицинской помощи. В Российской Федерации действующее законодательство приводится в соответствие с международными нормами и правилами. Законодательная и исполнительная власть РФ в целях дальнейшего совершенствования законодательства по охране здоровья населения приняли федеральный закон от 21.11.2011 № 323-ФЗ (ред. от 31.12.2014) «Об основах охраны здоровья граждан в Российской Федерации», где ввели понятие «охрана здоровья» и основные принципы охраны здоровья граждан. Охрана здоровья граждан – система мер политического, экономического, правового, социального, научного, медицинского, в том числе санитарно-противоэпидемического (профилактического), характера, осуществляемых органами государственной власти Российской Федерации, органами государственной власти субъектов Российской Федерации, органами местного самоуправления, организациями, их должностными лицами и иными лицами, гражданами в целях профилактики заболеваний, сохранения и укрепления физического и психического здоровья каждого человека, поддержания его долголетней активной жизни, предоставления ему

медицинской помощи. Охрана здоровья граждан является правом всех граждан без исключения.

Соблюдение прав человека и гражданина в области охраны здоровья и обеспечение связанных с этими правами государственных гарантий; приоритет профилактических мер в области охраны здоровья граждан; доступность медико-социальной помощи; социальная защищенность граждан в случае утраты здоровья; ответственность органов государственной власти и управления, предприятий и организаций независимо от формы собственности, должностных лиц за обеспечение прав граждан в области охраны здоровья. Основополагающими законами и подзаконными актами, обеспечивающими охрану здоровья населения России являются: Конституция Российской Федерации, федеральный закон от 21.11.2011 № 323-ФЗ (ред. от 31.12.2014) «Об основах охраны здоровья граждан в Российской Федерации», федеральный закон от 29.11.2010 № 326-ФЗ (ред. от 01.12.2014) «Об обязательном медицинском страховании в Российской Федерации». Конституция Российской Федерации является основой правового обеспечения охраны здоровья граждан, в которой определено, что «человек, его права и свободы являются высшей ценностью...». Важной особенностью Конституции РФ является разграничение ответственности за охрану здоровья населения между федеральными органами, субъектами РФ и местными (муниципальными) органами. Каждый гражданин имеет право на благоприятную окружающую среду, достоверную информацию о ее состоянии, право на труд в условиях, отвечающих требованиям безопасности и гигиены. Каждому гражданину гарантируется социальное обеспечение по возрасту, в случае болезни и инвалидности, потери кормильца, для воспитания детей.

Система медицинского страхования является основанием возникновения обязательства по оказанию медицинской помощи гражданам нашей страны. Она выступает в качестве формы социальной защиты интересов населения в области охраны здоровья. Правовые, экономические и

организационные основы медицинского страхования населения в РФ устанавливает Федеральный закон от 29.11.2010 № 326-ФЗ (ред. от 30.12.2015) «Об обязательном медицинском страховании в Российской Федерации» Медицинское страхование осуществляется в двух видах: обязательном и добровольном. В России ОМС является государственным и всеобщим для населения. Обязательное страхование обеспечивает всем гражданам страны равные возможности в получении медицинской помощи, предоставляемой за счет средств обязательного медицинского страхования в пределах базовой программы обязательного медицинского страхования. Добровольное медицинское страхование осуществляется на основе соответствующих государственных программ и обеспечивает гражданам получение дополнительных медицинских и иных услуг сверх установленных программами обязательного медицинского страхования. Оно может быть коллективным и индивидуальным.

1.1.2. Права и обязанности медицинских организаций

Медицинской организацией признается юридическое лицо, осуществляющее в качестве основной формы деятельности медицинскую деятельность на основании выданной в установленном порядке лицензии. Медицинские организации имеют право участвовать в оказании медицинской помощи в соответствии с программой государственных гарантий, получать средства за оказанную медицинскую помощь. Медицинские организации обязаны выполнять обязанности в соответствии с Федеральным законом «Об основах охраны здоровья граждан в Российской Федерации» и иными нормативными правовыми актами РФ, в том числе стандартами и порядками оказания медицинской помощи, бесплатно оказывать застрахованным лицам медицинскую помощь в рамках программ обязательного медицинского страхования.

1.1.3. Права и обязанности врача

Лечащий врач организует своевременное квалифицированное обследование и лечение пациента, устанавливает диагноз, который является основанным на всестороннем обследовании пациента. Врач имеет право на работу по трудовому договору (право на обеспечение условий и объёма деятельности в соответствии с требованиями охраны труда); право на переподготовку и на совершенствование профессиональных знаний; право на защиту своей профессиональной чести и достоинства; право на получение квалификационных категорий в соответствии с достигнутым уровнем теоретической и практической подготовки; право на страхование профессиональной ошибки не связанное с небрежным или халатным выполнением им профессиональных обязанностей. Врач должен удовлетворять необходимым требованиям для осуществления медицинской деятельности (специальное образование, соответствующие диплом, звание, сертификат (аккредитация) специалиста); добросовестно исполнять свои служебные обязанности (оказание пациентам медицинской помощи соответствующего объёма и качества); соблюдать врачебную тайну (состоянии здоровья гражданина, диагноз его заболевания и иных сведений, полученных врачом при обследовании и лечении пациента).

1.1.4. Стандарты и порядки оказания медицинской помощи

Согласно Федеральному закону 323-ФЗ «Об основах охраны здоровья граждан Российской Федерации» медицинская помощь организуется и оказывается в соответствии с порядками оказания медицинской помощи, обязательными для исполнения на территории Российской Федерации всеми медицинскими организациями, а также на основе стандартов медицинской помощи.

Стандарты медицинской помощи представляют собой перечни диагностических и лечебных услуг (включая лабораторные услуги), признанных ведущими специалистами соответствующей отрасли медицины

минимально необходимыми и достаточными для оказания медицинской помощи пациенту при определенной форме патологии в ее типичных вариантах. Стандартам медицинской помощи придано значение официальных документов для определения затрат на лечение. Каждый из них утверждается приказом Министра здравоохранения и развития Российской Федерации. Они имеют единую структуру, включающую характеристику модели пациента, формы оказания медицинской помощи и таблицы медицинских услуг в периоды диагностики и лечения болезни. Стандарт медицинской помощи является государственным документом, в котором федеральный орган исполнительной власти в сфере здравоохранения формулирует перечень медицинских услуг, необходимых для оказания медицинской помощи при определенной форме патологии. Другими словами, стандарт представляет собой форму конкретизации прав гражданина на оказание помощи при определенном заболевании, что гарантировано Конституцией Российской Федерации и Основами законодательства Российской Федерации по охране здоровья граждан. В стандартах указываются диагностические и лечебные процедуры, которые необходимо исполнить при оказании медицинской помощи при соответствующем заболевании в рамках государственных гарантий.

Порядки и клинические рекомендации оказания медицинской помощи разрабатываются профессиональными сообществами по соответствующим медицинским специальностям и нозологическим формам заболеваний, утверждаются уполномоченным федеральным органом исполнительной власти. В порядках указываются штатные нормативы, структура соответствующих отделений и другие характеристики функционирования медицинских подразделений по профилю. Для лечения конкретных заболеваний врачам рекомендуется использовать клинические рекомендации.

1.1.5. Программа государственных гарантий

В соответствии с Федеральным законом №323-ФЗ «Об основах охраны здоровья граждан в Российской Федерации» Правительство России утверждает программу государственных гарантий бесплатного оказания гражданам медицинской помощи. Цель Программы – обеспечение конституционных прав граждан на медицинскую помощь за счёт финансовых средств бюджетной системы, в том числе бюджетов фондов обязательного медицинского страхования. Программа устанавливает перечень видов, форм и условий оказываемой бесплатно медицинской помощи, перечень заболеваний и состояний, медицинская помощь при которых оказывается бесплатно, нормативы объёма медицинской помощи. На основе статистических данных о динамике заболеваемости и смертности населения периодически уточняются данные об объёмах медицинской помощи, оказываемой в амбулаторных условиях в неотложной форме, в условиях стационаров и дневных стационаров. Принятые решения направлены на обеспечение конституционных прав граждан на получение гарантированной бесплатной медицинской помощи, повышение эффективности её организации и управления ресурсами здравоохранения.

1.1.6. Профессиональные правонарушения медицинских работников, ответственность за их совершение

За нарушения прав граждан в области охраны здоровья и противоправные действия при оказании медицинской помощи, равно как и бездействие при необходимости её оказания, повлекшие за собой вред и ущерб здоровью граждан или смерть, медицинские и фармацевтические работники несут ответственность в порядке, установленном законодательством россиянин Федерации. Правонарушения могут носить характер преступления или проступка. Последние могут быть трех видов: административные, дисциплинарные и гражданско-правовые (неисполнение обязанностей, предусмотренных Гражданским кодексом и т.д.). Видом

проступков определяются и формы соответствующих за них наказаний. Административным правонарушением называется противоправное виновное действие или бездействие, которое посягает на государственный или общественный порядок права и свободы граждан, на установленный порядок управления. Административными правонарушениями являются, в частности, сокрытие источника заражения ВИЧ – инфекцией, венерической болезнью, производство либо оборот этилового спирта, алкогольной продукции, не соответствующих требованиям государственным стандартам. Дисциплинарные проступки – это нарушения служебной, трудовой, исполнительской, учебной и др. дисциплин. К ним относят: прогул, опоздание на работу, невыполнение распоряжений главного врача, заведующего отделением, нетрезвое состояние при исполнении своих служебных обязанностей. Ответственность заключается в применении дисциплинарных взысканий: замечания, выговор, увольнение по соответствующим основаниям в соответствии с Трудовым Кодексом РФ. Гражданские проступки – причинение неправомерными действиями вреда личности или имуществу гражданина, заключение противозаконной сделки, невыполнение договорных обязательств, нарушение права собственности, авторских и изобретательских прав. В лечебном учреждении гражданские проступки сводятся к причинению имущественного ущерба лечебному учреждению. В случае нарушения прав граждан в области охраны здоровья вследствие недобросовестного выполнения медицинскими работниками своих профессиональных обязанностей предусмотрено возмещение ущерба потерпевшему (пациенту). Это нашло отражение в Гражданском кодексе РФ, где приравнивается оказание медицинской помощи к разряду медицинской услуги.

1.2. Правовые, организационные и экономические аспекты деятельности клинических лабораторий

1.2.1. Правовые основы деятельности клиничко-диагностических лабораторий

Клиническая лабораторная диагностика представляет собой медицинскую диагностическую специальность, состоящую из совокупности исследований *in vitro* биоматериала человеческого организма, основанных на использовании гематологических, общеклинических, паразитарных, биохимических, иммунологических, серологических, молекулярно-биологических, коагулологических, бактериологических, генетических, цитологических, токсикологических, вирусологических методов, сопоставления результатов этих методов с клиническими данными и формулирования лабораторного заключения. Клиничко-диагностическая лаборатория является диагностическим подразделением лечебно-профилактического учреждения и создается на правах отделения. КДЛ, независимо от подчиненности и формы собственности, должна быть указана на избранный вид деятельности в лицензии ЛПУ.

1.2.2. Типы клиничко-диагностических лабораторий

Клиничко-диагностические лаборатории подразделяются:

- лаборатории общего типа, многопрофильными – для разных видов исследований;
- специализированные лаборатории для одно вида исследований;
- экспресс-лаборатории – для экстренного круглосуточного выполнения исследований;
- централизованные – для выполнения исследований от нескольких ЛПУ.

Структура лабораторной службы в основном соответствует потребностям учреждений здравоохранения в лабораторной диагностике и мониторинге за терапией больных, обеспечивая повседневные запросы

лечащих врачей в наиболее распространенных исследованиях (КДЛ общего типа), экстренном их выполнении в ургентной практике (экспресс-лаборатории), а также серийное производство наиболее сложных исследований. Этим занимаются специализированные лаборатории (гематологические, цитологические, биохимические, иммунологические). В крупных стационарах лаборатории могут подразделяться для выполнения определенных исследований (при отделениях гемодиализа, гипербарической оксигенации, в приемном отделении и т.д.).

Централизованные КДЛ создаются по указанию соответствующих территориальных органов управления здравоохранением для выполнения, как различных видов исследований, так и одного их вида (биохимические, иммунологические, цитологические, микробиологические и другие исследования). Организационная структура и порядок финансирования централизованных КДЛ устанавливаются органом управления здравоохранением с учетом выполняемых ими задач и в соответствии с договором об участии лабораторий в осуществлении территориальных медицинских программ. КДЛ независимо от подчиненности и формы собственности должна иметь сертификат на избранный вид деятельности.

1.2.3. Задачи клинической лабораторной диагностики в сфере охраны здоровья

Клиническая лабораторная диагностика носит комплексный характер. Несмотря на существование нескольких субдисциплин лабораторной диагностики, тем не менее, это единая специальность (служба), основной характеристикой которой является исследование биопроб человека в условиях *in vitro* с диагностическими целями. Лабораторная диагностика имеет собственный предмет исследования – биологический материал от пациента. Методы исследования могут быть разнообразными, цель едина – комплексная диагностика состояния пациента. Основными задачами клинической лабораторной диагностики являются:

- проведение клинических лабораторных исследований в соответствии с профилем согласно заявленной номенклатуре исследований при аккредитации КДЛ в соответствии с лицензией ЛПУ;
- внедрение прогрессивных форм работы, новых методов исследований, имеющих высокую аналитическую точность и диагностическую надежность;
- повышение качества лабораторных исследований путем систематического проведения внутрिलाбораторного контроля качества лабораторных исследований и участия в программах внешней оценки качества;
- оказание консультативной помощи врачам лечебных отделений в выборе наиболее диагностически информативных лабораторных тестов и трактовке данных лабораторного обследования больных;
- обеспечение клинического персонала, занимающегося сбором биологического материала, детальными инструкциями о правилах взятия, хранения и транспортировки биоматериала, обеспечивающими стабильность образцов и надежность результатов. Ответственность за точное соблюдение этих правил клиническим персоналом несут руководители клинических подразделений;
- повышение квалификации персонала лаборатории;
- проведение мероприятий по охране труда персонала, соблюдение техники безопасности, производственной санитарии, противоэпидемического режима в КДЛ;
- ведение учетно-отчетной документации в соответствии с утвержденными формами.

1.2.4. Профилактика заболеваний. Профилактические лабораторные обследования. Программы скрининга и лабораторные исследования

Профилактика заболеваний включает систему социальных, экономических, законодательных, воспитательных, санитарно-технических, санитарно-гигиенических, противоэпидемических и медицинских мероприятий, планомерно проводимых государственными институтами и общественными организациями с целью обеспечения всестороннего развития физических и духовных сил граждан, устранения факторов, вредно действующих на здоровье населения.

Лабораторные исследования являются необходимым и первейшим мероприятием в постановке точного диагноза и последующем назначении адекватного и правильного лечения. По данным ВОЗ, при помощи лабораторных анализов специалист получает примерно до 80% точной информации о состоянии здоровья пациента. Особенно важное значение имеют профилактическая диагностика. При помощи анализов проведенных в лаборатории, можно обнаружить начальные стадии болезни, когда самих симптомов ещё нет. Профилактические лабораторные исследования — это залог ранней своевременной диагностики и адекватной терапии. Лабораторные исследования занимают особое место в диагностике хронических заболеваний и инфекций.

В России действуют несколько федеральных и имеются региональные программы скрининга заболеваний, в которых лабораторные исследования неотъемлемая часть. В частности при неонатальном скрининге федеральные программы включают исследования на фенилкетонурию, врожденный гипотиреоз, адреногенитальный синдром, муковисцидоз и галактоземию. В России принята национальная политика в области скрининга донорской крови, регламентирующая общенациональные требования к скринингу на гемотрансмиссивные инфекции всей заготовленной цельной крови и донаций. При плановой госпитализации обязательным является исследование крови пациентов а ВИЧ, гепатиты В и С, сифилис.

1.2.5. Цели и задачи диспансеризации. Роль клинических лабораторий в диспансерном обследовании

Диспансеризация – система медицинских мероприятий, осуществляемая лечебными учреждениями в целях профилактики и своевременного лечения заболеваний. В России разработаны и реализуются ряд программ диспансерного наблюдения. Это лабораторный контроль беременных на группу TORCH-инфекций, показатели тиреоидного статуса, исследование опухолевых маркеров в группах риска (ПСА у мужчин, СА-125 и цитологический скрининг патологии шейки матки у женщин), скрининг на выявление сахарного диабета, нарушения липидных показателей и др. В некоторых территориях приняты региональные программы скрининга, в частности, в Ханты-Мансийском национальном округе – Югре проводится скрининг на колоректальный рак мужчин и женщин в возрасте 55-70 лет по исследованию гемоглобина и трансферрина в кале. Скрининговые программы позволяют практически исключить 3-4 стадии онкологии, так как патология выявляется на ранних стадиях заболевания, эффективность лечения на которых значительно выше.

1.2.6. Номенклатура клинических лабораторных исследований

Это совокупность названий, употребляемых в перечне клинических лабораторных исследований, она утверждена приказом Минздрава РФ и включает следующие разделы:

- химико-микроскопическое исследование биологических жидкостей;
- гематологические исследования;
- цитологические исследования;
- биохимические исследования;
- коагулологические исследования;
- иммунологические исследования;
- химико-цитологические исследования;

- лекарственный мониторинг;
- микробиологические исследования.

1.2.7. Кадровое обеспечение клинических лабораторий

Клинико-диагностическая лаборатория должна располагать необходимыми ресурсами персонала: возглавляться лицом, обладающим ответственностью за исполнение обязанностей и компетентностью для обеспечения выполнения предоставляемых лабораторией услуг, руководство лабораторией должно гарантировать компетентность сотрудников лаборатории, выполняющих преаналитические процедуры, измерение аналитов, оценку качества результатов и приемлемость выдаваемой лабораторной информации. В штатном расписании КДЛ как медицинском подразделении должны работать медицинские работники: заведующий лабораторией, врач клинической лабораторной диагностики, на должность биолога может быть зачислен специалист с высшим образованием с биологической квалификацией. Для специалистов со средним медицинским образованием предусмотрены должности медицинский технолог, медицинский лабораторный техник (фельдшер-лаборант), лаборант. В лаборатории должен быть установлен порядок, который определяет, кто может пользоваться компьютерной системой, кто имеет доступ к данным пациентов и кому разрешено вводить и изменять результаты исследований пациентов, модифицировать компьютерные программы.

В «Руководстве по качеству» должны быть данные о персонале лаборатории: состав, базовая профессиональная подготовка, квалификация, сведения о прохождении различных форм обучения, данные по аккредитации каждого сотрудника.

1.2.8. Требования к материально-техническому оснащению клинических лабораторий

Клинико-диагностическая лаборатория должна быть оснащена в соответствии с видами проводимых исследований и установленными стандартами. Современное лабораторное оборудование способно обеспечить полную автоматизацию процессов, простоту и удобство эксплуатации приборов, их совместимость с компьютерными системами, экономичный расход реагентов. Полностью автоматизированный процесс гарантирует высокую точность исследований за короткие сроки. Оборудование лаборатории – это изделия медицинского назначения. В целях обеспечения эффективности и безопасности применения изделий медицинского назначения отечественного и зарубежного производства разрешается после проведения в установленном порядке их государственной регистрации. При выборе технических средств в конкретной КДЛ рекомендуется учитывать следующие критерии:

- мощность медицинской организации;
- профиль медицинской организации;
- перечень запрашиваемых клиницистами исследований;
- возможность выполнения микроанализа;
- производительность;
- возможность реализации внутрिलाбораторного и внешнего контроля качества;
- требования к потребляемой воде;
- организацию технического обслуживания;
- организацию обучения персонала, выполняющего исследования;
- уровень профессиональной подготовки персонала.

1.2.9. Экономические основы деятельности клинической лаборатории

Клиническая лабораторная диагностика – одна из медицинских специальностей, которая имеет все условия для развития на хозрасчетных условиях. Тем не менее, номенклатура и объем исследований становятся все больше предметом управленческих решений. Сам факт существования КЛД в составе ЛПУ все больше определяется экономическими расчетами. Материальные затраты и стоимость лабораторных услуг просчитываются на основе данных о стоимости оборудования и его амортизации, лабораторных реагентов, трудовых затрат, объем исследований, накладных расходов и других факторов. Анализ использования медико-экономических стандартов показал, что в тех случаях, когда оплата лабораторных услуг не была ниже себестоимости исследований, лабораторные исследования были одним из источников поступлений средств в лечебные учреждения при оплате как по системе обязательного (ОМС), так и добровольного медицинского страхования (ДМС). Очевидно, что перевод лабораторной службы на хозрасчетные отношения внутри системы здравоохранения – реальный путь развития клинической лабораторной диагностики.

Материальная заинтересованность в результатах работы должна быть использована для стимулирования и повышения эффективности работы штатного персонала лабораторий. Следует стремиться к такой организации труда, при которой материально стимулировались экономия материальных затрат, внедрение новых экономичных производительных технологий и другие мероприятия сотрудников, повышающие эффективность лабораторного исследования с точки зрения конечного результата – эффективности лечебного процесса в целом. Результаты деятельности коммерческих лабораторий показывают, что при использовании современной производительной лабораторной техники, хорошо налаженных технологических процессах, получении качественных результатов запросы на выполнение лабораторных исследований стабильные и оплачиваемые населением. Рациональные схемы организации лабораторных потоков с

ориентацией на рациональную централизацию лабораторных исследований с обязательным обеспечением требуемого качества лабораторных исследований – путь повышения экономической эффективности клинико-диагностических исследований.

1.2.10. Охрана труда в клинических лабораториях

К работе в ДЛ допускаются лица не моложе 18 лет, получившие законченное медицинское образование. Все вновь поступающие на работу, независимо от занимаемой должности, должны пройти вводный инструктаж у инженера по организации труда и первичный инструктаж на рабочем месте. Персонал КДЛ обязан руководствоваться в работе своей должностной инструкцией; владеть приемами оказания первой медицинской помощи; знать правила пожарной безопасности. Администрация учреждения обязана бесперебойно обеспечивать работников отделения санитарной одеждой, спецодеждой и др. Нарушение техники безопасности может рассматриваться как административное правонарушение. Законодательство в области техники безопасности на производстве разрабатывается и утверждается Государственной Думой, поэтому в случаях, повлекших материальный ущерб или жертвы, виновные могут привлекаться к уголовной ответственности, как нарушившие Государственный Закон.

Льготы по работе во вредных для здоровья условиях труда распространяются на работников КДЛ после аттестации рабочего места, при котором установлено наличие профессиональной вредности.

1.2.11. Санитарно-противоэпидемический режим в клинических лабораториях

Санитарно-противоэпидемический режим в клинических лабораториях регулируется согласно «Санитарно-эпидемиологическим требованиям к организациям, осуществляющим медицинскую деятельность» (СанПиНы), которые разрабатываются и вводятся в соответствии с Федеральным законом

«О санитарно-эпидемиологическом благополучии населения», постановлением Правительства Российской Федерации «Об утверждении Положения о государственной санитарно-эпидемиологической службе Российской Федерации и Положения о государственном санитарно-эпидемиологическом нормировании»

Ряд санитарно-эпидемиологических правил и нормативов устанавливают санитарно-эпидемиологические требования к размещению, устройству, оборудованию, содержанию, противоэпидемическому режиму, профилактическим и противоэпидемическим мероприятиям, условиям труда персонала, хранению материалов и утилизации отходов ЛПУ. При лицензировании медицинской деятельности, в том числе работы КДЛ, обязательным условием для принятия решения о выдаче лицензии является санитарно-эпидемиологическое заключение о соответствии санитарным правилам зданий, строений, сооружений, помещений, оборудования и иного имущества, которые предполагается использовать для осуществления деятельности.

Клинико-диагностические, микробиологические и другие диагностические лаборатории должны размещаться в изолированных непроходных отсеках зданий. Помещение для забора материала располагают за пределами блока помещений для исследований. Размещение и состав помещений микробиологической лаборатории (отделения) определяется с учетом требований санитарных правил по безопасности работы с микроорганизмами 3-4 групп патогенности (опасности) и возбудителей паразитарных болезней. Доставка материала в лаборатории из сторонних организаций осуществляется через самостоятельный вход. Перчатки необходимо надевать во всех случаях, когда возможен контакт с кровью или другими биологическими субстратами, потенциально или явно загрязненными микроорганизмами, слизистыми оболочками, поврежденной кожей.

Санитарно-противоэпидемический режим в клинических лабораториях документируется и обязателен для исполнения.

1.3. Контрольные материалы к главе 1

Контрольные вопросы:

1. Что обеспечивают «государственные гарантии в области здравоохранения»?
2. Какова иерархия в законодательных актах в области здравоохранения?
3. Что такое подзаконные акты в здравоохранении?
4. Какое значение в первую очередь выполняют стандарты медицинской помощи?
5. Какую функцию несут порядки оказания медицинской помощи? В чем заключаются отличия созревающих и зрелых клеток крови?
6. Какое назначение имеют клинические рекомендации?
7. На правах какого подразделения работает клинико-диагностическая лаборатория?
8. Какие должности могут быть в штатном расписании клинико-диагностической лаборатории
9. Какие задачи решает клинико-диагностическая лаборатория при диспансеризации?
10. Какие законодательные акты определяют работу клинико-диагностических лабораторий с разными группами патогенности микроорганизмов?

ТЕСТЫ

Инструкция: Выбрать один правильный ответ

01.01 Государственную политику по охране здоровья населения осуществляет:

- А) Президент Российской Федерации
- Б) Правительство Российской Федерации
- В) Государственная дума

- Г) Совет Федераций
- Д) Медицинская палата

01.02. Лицензирование медицинского учреждения представляет собой:

- А) определение соответствия качества медицинской помощи установленным стандартам с выдачей государственного разрешения на осуществление определенных видов деятельности
- Б) систематическую проверку качества оказания медицинской помощи
- В) процедуру предоставления медицинскому учреждению статуса юридического лица
- Г) конкурс на оказание медицинских услуг
- Д) предоставление лечебному учреждению статуса государственного

01.03. Медицинское страхование - это

- А) оплата медицинских услуг через страховую организацию
- Б) форма социальной защиты интересов населения в области охраны здоровья
- В) оплата лечения и лекарств за счет накопленных средств
- Г) медицинское обслуживание населения за счет страховой организации
- Д) документ оформляемый при выезде за границу

01.04. Охрана здоровья населения является задачей:

- А) международной
- Б) государственной
- В) территориальной
- Г) ведомственной
- Д) личной

01.05. Финансовое обеспечение клинико-диагностической лаборатории, входящей в состав лечебного учреждения осуществляет:

- А) фонд обязательного медицинского страхования (ОМС)
- Б) территориальный орган управления
- В) лечебное учреждение, имеющее статус юридического лица
- Г) сама клинико-диагностическая лаборатория
- Д) спонсорская поддержка

01.06. Экономическая эффективность работы клинико-диагностической лаборатории:

- А) получение ценной клинической информации с наименьшими финансовыми и прочими затратами
- Б) работа в рамках бюджетного финансирования
- В) выполнение работы минимальным числом штатных сотрудников
- Г) работа лаборатории по нормативам обязательного медицинского страхования

Д) систематическое снижение затрат на лабораторные исследования

01.07. Допускаются к работе в ночное время

- А) работники моложе 18 лет
- Б) беременные женщины
- В) женщины, имеющие детей в возрасте до 3 лет
- Г) инвалиды без их согласия
- Д) уволенные из вооруженных сил

01.08. Медицинский работник, причинивший ущерб пациенту, не связанный с небрежным отношением медработника к профессиональным обязанностям:

- А) освобождается от ответственности
- Б) увольняется
- В) штрафуется
- Г) несет уголовную ответственность
- Д) несет гражданско-правовую ответственность

01.09. Не допускается увольнение работника по инициативе администрации?

- А) в период пребывания работника в командировке
- Б) в период пребывания работника в ежегодном отпуске (кроме случая ликвидации предприятия), в период временной нетрудоспособности)
- В) в период судебного разбирательства
- Г) до окончания испытательного срока работы на предприятии
- Д) при перемене работником места жительства

01.10. Общие принципы организации деятельности лабораторных структур сформулированы в:

- А) международных и национальных стандартах
- Б) приказах федерального органа исполнительной власти
- В) приказах территориального органа управления здравоохранением
- Г) приказах и распоряжениях администрации лечебного учреждения
- Д) методических рекомендациях федерального и территориального уровней

Ответы

01.01	01.02	01.03	01.04	01.05	01.06	01.07	01.08	01.09	01.10
Б	А	Б	Б	В	А	Д	Д	Б	А

немедицинского персонала (водителей, регистраторов) возможно обеспечение правильных и достоверных лабораторных анализов. Лабораторный персонал выполняет необходимые аналитические процедуры, оценивает достоверность результатов исследований, а клинический персонал осуществляет назначение лабораторных тестов, подготовку пациентов к их проведению, взятие образцов биоматериалов, окончательную интерпретацию результатов и принятие на их основе решений. Основа обеспечения качества на преаналитическом этапе – разработка и четкое соблюдение инструкции по качеству проведения этой стадии лабораторного исследования, а также максимальная стандартизация всех основных моментов.

Назначение анализа клиницистом. Подготовка пациента к исследованиям. Подготовка пациента к исследованиям – одна из важных составляющих вне-лабораторной части преаналитического этапа. Врач должен объяснить пациенту необходимость лабораторных исследований и информировать его о том, как нужно подготовиться к исследованиям. С этой целью в лечебном учреждении разрабатываются стандартные операционные процедуры (СОПы) врачам, процедурным (постовым) медсестрам и пациентам коечных отделений госпиталя и пациентам амбулаторно-поликлинического профиля по подготовке пациентов к сдаче лабораторных исследований.

Внелабораторная часть преаналитического этапа начинается с назначения лечащим врачом конкретному пациенту некоторой группы анализов (компонент или характеристика образца, подлежащие измерению), входящих в лабораторное исследование. Именно врач формирует заявку с необходимым ему перечнем аналитов, определяет условия подготовки пациента (например, натощак, время взятия или сбора биоматериала), исследуемый материал (кровь, моча, кал, сперма).

Факторы преаналитического этапа, способные влиять на результаты лабораторных исследований. К числу факторов, вносящих наиболее грубые изменения, часто являющихся основанием для выбраковки пробы и отказа от

выполнения исследования, относят: гемолиз, липемию, наличие сгустков и неправильный выбор консерванта. Однако не во всех случаях удастся своевременно выявить эти ошибки. Только значительный гемолиз или липемия могут быть обнаружены визуально, а большая часть допускаемых ошибок зачастую не выявляется вовсе или выявляется лишь случайно, внося нежелательные влияния в результат исследования. Таковыми являются:

- нарушение подготовки пациента к анализу;
- нарушение правил отбора пробы;
- нарушение соотношения кровь/консервант;
- неверная идентификация пробы пациента;
- нарушение правил хранения и транспортировки;
- поздняя доставка.

Существенное значение имеют время, место, техника и последовательность взятия биоматериала, положение тела во время процедуры, длительность веностаза, правильность выбора консерванта либо транспортной среды (для микробиологических исследований), точность соотношения реагента и крови, адекватная идентификация пробы.

При подготовке пациента к исследованию целый ряд факторов, влияющих на результат (пол пациента, этнографические особенности, масса тела, образ жизни, беременность) невозможно скорректировать. В то же время короткодействующие, легко устранимые факторы должны быть приняты к сведению и скорректированы для получения наиболее достоверных результатов.

Диета оказывает непосредственное влияние на многие биохимические и гормональные показатели пациента. Значение имеет время, прошедшее после приема пищи, и состав пищи. Так, при наличии в рационе чрезмерного количества белков и нуклеиновых кислот в крови и моче растет концентрация азотистых компонентов: мочевины, креатинина, мочевой кислоты. Преимущественное употребление в пищу углеводов и липидов

приводит к повышению уровня общего холестерина и триглицеридов, к сдвигам со стороны липидограммы. Резкие изменения в водно-солевом режиме сказываются на секреции альдостерона, вазопрессина, показателях ренин-ангиотензинной системы, а также на концентрации электролитов. Кроме того, существует целый ряд показателей, требующих временного ограничения приема тех или иных продуктов. Исследование липидограммы в полной мере достоверно при строгом ограничении животных жиров (жирное мясо, масло, майонез, сметана, яйца и др.) не менее чем в течение 3 сут. Это период элиминации из крови экзогенных липидов. Анализ на катехоламины и продукты их деградации (метанефрины, ванилил-миндальная кислота) требует исключения на 3-5 сут продуктов, богатых серотонином либо кофеином, которые стимулируют секрецию мозгового слоя надпочечников. К таковым относятся бананы, сыр, молоко, шоколад, кофе и тонизирующие напитки. Не следует употреблять продукты, содержащие ванилин. Уровень мочевой кислоты следует определять после ограничения употребления пищи, богатой нуклеиновыми кислотами (мясо, субпродукты, вина, орехи и др.). Обмен кальция и фосфора также исследуют в условиях их ограниченного поступления в организм. В течение 5-6 сут следует избегать пищи, чрезмерно богатой этими минеральными компонентами: мясо, молочные продукты, рыба. При этом необходимо помнить, что пищевые фосфаты содержатся в качестве пищевых добавок в колбасных изделиях и газированных напитках. Общим для всех биохимических, клинико-лабораторных, эндокринологических и других тестов является требование отбора материала натощак, спустя 10-12 ч после последнего приема пищи, а для некоторых тестов – и более продолжительное время.

Алкоголь должен быть исключен из рациона не менее чем за 24 часа до взятия биожидкостей. При систематическом употреблении алкоголя у пациентов изменяются соотношения активности ферментов в сыворотке крови: активность ГГТП выше, чем АСТ и АЛТ, наблюдается увеличение активности альфа-амилазы, креатинкиназы.

У курильщиков увеличена активность альфа-амилазы, повышена концентрация раково-эмбрионального антигена, С-реактивного белка, снижена концентрация билирубина, мочевой кислоты, триглицеридов.

Физическая и мышечная нагрузка, тренировки, упражнения приводят к изменению некоторых показателей – увеличению креатинкиназы, повышению активности катехоламинов. Поэтому они должны быть исключены как минимум за 3 дня до взятия биоматериала.

Лекарства существенно влияют на результаты лабораторных исследований различным образом – интерферируют в используемых аналитических реакциях, связывают транспортные белки, влияют через метаболизм в печени и почках, резорбируются в кишке. Поэтому, при подготовке к проведению лабораторных исследований приняты следующие подходы:

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

На этапе доставки пробы в лабораторию решающее значение имеют оперативность, правильный температурный режим и бережное отношение к материалу. Кроме того, окрашенные компоненты крови могут распадаться под действием прямых солнечных лучей, пептидные и белковые гормоны могут подвергаться протеолизу, газы крови – диффузии. В некоторых случаях, при анализе крайне нестабильных соединений, возникает необходимость проведения немедленной пробоподготовки (центрифугирование, отделение сыворотки от форменных элементов, её замораживание).

Все эти факторы находятся в ведении клиницистов и практически не контролируются сотрудниками клинической лабораторной диагностики.

Получение материала на исследование. Качественное взятие материала является одним из стандартизирующих и определяющих моментов всего лабораторного исследования. По данным литературы от 46 до 65% лабораторных ошибок происходит на преаналитическом этапе.

Расходные материал, используемые для взятия биоматериала. Использование вакуумных систем – необходимый шаг в создании стандартных условий взятия, транспортировки и хранения биологических проб пациентов. Вакуумные пробирки (вакутейнеры, вакуэтты, моноветты) предназначены для всех видов исследований, кроме газов крови.

Внедрение пробирок с транспортной средой, контейнеров для мочи, пластиковых пробирок, вакуумных систем, средства для их применения (иглы, держатели, адаптеры) оказывает положительное влияние на все этапы лабораторного исследования и, в целом, переводит организацию работы лаборатории на иной уровень. На все виды микробиологических исследований материал забирается только в стерильные емкости.

Температурный режим. В процедурном кабинете во время взятия крови должен соблюдаться температурный режим от 20 до 24°C, так как нахождение пробирок с биоматериалом в иных условиях может привести к гемолизу крови после ее забора. Краткосрочная транспортировка (не более 15 мин) пробирок при температуре от 4 до 30°C не оказывает существенного воздействия на функциональные свойства продукции. При длительном хранении при температурах выше 40°C может произойти деформация пробирок, а большие перепады температур могут снизить эффективность пробирок за счет потери вакуума и спровоцировать неверные результаты анализов.

Порядок направления на исследования. Правильно заполненный бланк-заказ направления на исследование упрощает технологию взятия биоматериала процедурной (постовой) медицинской сестрой, что сводит к

минимуму вероятность ошибок вследствие «человеческого фактора». Форма бланка-заказа направления разрабатывается сотрудниками лаборатории совместно с клиницистами. При составлении учитывается основное требование: удобство работы для клиницистов, медсестер и лабораторных регистраторов. При наличии лабораторной информационной системы заполненное направление считывается специальным сканером и заявленные анализы автоматически переносятся в лабораторную информационную систему. В бланке указываются: номер истории болезни (ИБ) или амбулаторной карты, номер отделения, фамилия и инициалы больного, вид исследования, дата и время взятия материала, фамилии врача.

При заборе крови используют определенную последовательность взятия крови в вакуумные пробирки: 1) флаконы для гемокультуры; 2) пробирки без добавок (пластик, стекло); 3) пробирки с цитратом для коагулологии и для определения СОЭ; 4) пробирки (пластик) с активатором свертывания (и гелем) для сыворотки; 5) пробирки с гепарином (и гелем) для плазмы; 6) пробирки с ЭДТА для цельной крови (гематология); 7) пробирки с фторидом/ЭДТА для исследования глюкозы, лактата, HbA1c, этанола, гомоцистеина.

Получение биоматериала и подготовка препаратов для морфологического исследования из органов систем:

Получение материала из бронхо-легочной системы. Материал для исследования желательно собирать во время приступа кашля, обязательно в чистую, широкогорлую, хорошо закрывающуюся посуду. Лучше всего это делать утром, когда бронхи максимально заполнены отделяемым. Чтобы исследование было точным, а процесс сбора материала легким, рекомендуется:

- Пить много воды в течение дня за сутки до проведения анализа.
- Предварительно прополоскать рот кипяченой водой с 2% раствором соды.
- Непосредственно перед сбором материала сделать 3 глубоких вдоха.

- Собрать в емкость мокроту, а не слюну.

Для полноценного исследования необходимо 3-5 мл материала, но провести анализ можно и при меньшем количестве мокроты. Емкость следует доставить в лабораторию сразу же после сбора материала, так как его анализ нужно проводить не позже чем через 2 часа после отхаркивания.

При микроскопическом исследовании мокроты повышение результативности исследования мокроты больше зависит от увеличения числа порций, из которых берут материал, чем от увеличения числа приготовленных препаратов.

Клеточные и неклеточные элементы в мокроте распределяются неравномерно, поэтому необходимо исследовать несколько нативных препаратов или два, составленных из всех частей мокроты. Из составных частей полиморфной мокроты нужно сделать не менее 2-х, а при необходимости 3-4 комплексных препарата. Из нативного препарата, в котором обнаружены клеточные элементы, вызвавшие интерес микроскописта, следует готовить препарат для окраски азур-эозином и/или по Цилю-Нильсену. Нельзя готовить препарат для окраски путем растирания отобранного материала между двумя предметными стеклами.

Получение материала из органов пищеварительной системы.

Предварительная подготовка обследуемого для проведения копрологического анализа (макроскопическое, химическое и микроскопическое исследования) состоит из употребления пищи с дозированным содержанием белков, жиров и углеводов в течение 3-4 дефекаций. Этим требованиям отвечает диета Певзнера.

Диета Певзнера основана на принципе максимальной пищевой нагрузки для здорового человека. Она является обычным пищевым рационом здоровых людей. В ее дневной рацион входит 400 г белого и черного хлеба, 250 г мяса жаренного куском, 100 г масла, 40 г сахара, гречневая и рисовая каши, жареный картофель, салат, квашеная капуста, компот из сухих фруктов и свежие яблоки. Калорийность достигает 3250 ккал. После ее назначения у

здоровых людей при микроскопическом исследовании кала обнаруживаются лишь единичные в редких полях зрения измененные мышечные волокна. Эта диета позволяет выявить даже небольшую степень нарушения ферментативной, эвакуаторной способности ЖКТ и всасывания в тонкой кишке.

Диета Шмидта – щадящая, лечебная, включает 1-1,5 л молока, 2-3 яйца всмятку, 125 г слабо прожаренного рубленого мяса, 200-250 г картофельного пюре, слизистый отвар (40 г овсяной крупы), 100 г белого хлеба или сухарей, 50 г масла, общая калорийность 2250 ккал. После ее употребления при нормальном пищеварении остатки пищи в кале не обнаруживаются. При наличии патологии со стороны ЖКТ диета Шмидта в течение 3-4-5 дней оказывает лечебное действие, проведенный на фоне этой диеты копрологический анализ может не выявить ожидаемой патологии.

При подготовке больного для исследования кала на скрытое кровотечение из рациона исключается рыба, мясо, все виды зеленых овощей, помидоры, яйца весенней кладки (зародыш), лекарственные препараты, содержащие железо, то есть катализаторы (гемоглобин, хлорофилл, железо), обуславливающие ложно-положительную реакцию на кровь.

Кал собирается после самопроизвольной дефекации в специально предназначенную посуду. Нельзя направлять материал для исследования после клизмы, приема медикаментов, влияющих на перистальтику (белладонна, пилокарпин), после приема касторового или вазелинового масла, после введения свечей, препаратов, влияющих на окраску кала (железо, висмут, сернокислый барий), приносить в КДЛ фекалии в памперсах. Кал не должен содержать мочи. Емкость с фекалиями доставляется в КДЛ сразу после дефекации или не позднее 10-12 час после дефекации при условии хранения в холодильнике при температуре $+3 + 5^{\circ}\text{C}$.

В лаборатории кал подвергается макроскопическому, химическому и микроскопическому исследованию.

Получение биоматериала из органов мочевыделительной системы.

Для сбора мочи важным фактором является качество посуды. Подходящим контейнером для любого образца мочи служит емкость с широким горлом. Контейнер для мочи должен быть или одноразовым, или из него перед использованием должны быть надежно удалены детергенты. По возможности надо собирать мочу в посуду, в которой она будет доставлена в лабораторию. Если назначено микробиологическое исследование мочи, контейнер должен быть стерильным. При исследовании белков и гормонов следует предотвратить абсорбцию аналитов на стенках сосуда. Мочу из судна, утки, горшка брать не рекомендуется, поскольку даже после обработки этих сосудов в них может оставаться осадок фосфатов, способствующих разложению свежей мочи.

Во избежание попадания посторонних примесей мочу нельзя исследовать во время менструации. После проведения цитоскопии анализ можно назначать не ранее, чем через 5-7 дней.

Применяют три вида сбора мочи: утреннюю порцию мочи, случайные пробы мочи (разовая моча), за определенный промежуток времени или суточную мочу.

Первая утренняя порция мочи, которая в течение ночи собирается в мочевом пузыре предпочтительно использовать для общего анализа. Это исключает естественные суточные колебания показателей мочи и тем самым более объективно характеризует исследуемые параметры.

Моча должна быть собрана после тщательного туалета наружных половых органов в сухую, чистую, хорошо отмытую от чистящих и дезинфицирующих средств посуду или в посуду разового пользования, выпускаемую специально для сбора мочи. Для анализа можно собирать всю мочу, однако в нее могут попасть клеточные элементы, не относящиеся к мочеобразовательной и мочевыделительной системе, такие, как клетки ороговеющего плоского эпителия с наружных частей половых органов. Поэтому, как правило, первую порцию мочи не используют. Вторую порцию

мочи собирают в чистую и сухую посуду. В то же время необходимо помнить, что в первой порции мочи могут быть обнаружены диагностически ценные клеточные элементы, свидетельствующие о воспалении уретры (двухстаканная проба).

Посуда с мочой плотно закрывается крышкой и доставляется в клиничко-диагностическую лабораторию. Инструкцию о порядке сбора мочи необходимо довести до сведения каждого пациента, подчеркнув важность этого момента для диагностики патологических процессов. Анализ мочи следует провести в течение 2-х часов после получения материала. При длительном нахождении доставленной мочи в помещении происходит разрушение клеточных элементов, восстановление уробилиногенов в уробилины, приводящее к получению ложно отрицательных результатов, контаминация бактериями, грибами, жизнедеятельность которых приводит к образованию аммиака, ощелачиванию мочи и увеличению значения рН, а при глюкозурии – снижению содержания глюкозы.

Случайные пробы мочи можно собирать в любое время. Случайные пробы используют для общеклинического исследования и пробы Нечипоренко. Перед сбором мочи проводят тщательный туалет наружных половых органов. Лежачих больных предварительно подмывают слабым раствором марганцево-кислого калия, затем промежность вытирают сухим стерильным ватным тампоном в направлении от половых органов к заднему проходу. Быстрота использования имеет существенное значение для морфологической оценки нестабильных компонентов мочевого осадка. Для сбора проб мочи у новорожденных детей применяются мешки с гипоаллергенным приклеивающимся к коже покрытием. Область лобка и промежности должны быть вымыты с мылом.

Пробы за определенный промежуток времени собирают после первого утреннего мочеиспускания. Сбор мочи за определенный промежуток времени используется при проведении пробы Зимницкого, исследовании глюкозурического профиля. Если для анализа требуется собрать мочу за 10-

12 часов, то перед сном пациент должен опорожнить мочевой пузырь и отметить время. Эта порция мочи отбрасывается. Затем больной собирает мочу через 10-12 часов в приготовленную посуду, в которой проба доставляется в КДЛ. Аналогично в дневное время проводится сбор мочи за 2-3 часа.

Катетер или пункция мочевого пузыря могут быть использованы только в крайних случаях – у новорожденных, грудных детей, пациентов с заболеваниями простаты, иногда – для микробиологических исследований. Из длительно стоящего катетера мочу для исследований брать нельзя. Если используется не вся собранная моча, то перед сливанием части ее необходимо тщательное взбалтывание, чтобы осадок, содержащий форменные элементы и кристаллы, не был утрачен.

Для исследования **суточной мочи** пациент собирает мочу в течение 24 часов на обычном питьевом режиме. Для сбора предпочтительнее использовать пластиковую емкость объемом не менее 2 л. Следует напомнить пациенту, что первую утреннюю порцию не берут (нулевое время), эту порцию мочи выливают, а собирают все последующие порции, причем последняя порция берется в то же время, когда накануне был начат сбор. Время начала и конца сбора отмечают. Если не вся моча отправляется в лабораторию, то количество суточной мочи измеряют мерным цилиндром, тщательно перемешивают и отливают около 50 мл в чистый сухой контейнер, который снабжают соответствующей этикеткой с указанием точного суточного диуреза, и направляют на анализ.

Определение глюкозы в моче следует выполнить не позднее 2-х часов после мочеиспускания. В течение 8-12 час (в суточной моче) потеря глюкозы составляет примерно 40 %, если не добавлять стабилизатор. При истинной бактериурии или при загрязнении (контаминации) мочи бактериями и грибами из грязной посуды основной причиной снижения содержания глюкозы в моче у больных сахарным диабетом и полное отсутствие глюкозы в моче здоровых людей является жизнедеятельность бактерий и грибов.

Если проводится исследование глюкозы в суточной моче, то в посуду для сбора мочи необходимо в качестве стабилизатора добавить 0,5 г азида натрия.

Получение материала из лимфатических узлов, молочной, щитовидной и других желез. Материал из лимфатических узлов, молочной, щитовидной железы получают с помощью пункции тонкой иглой или соскоба с удаленной во время операции ткани. Диагностическая пункция тонкой иглой, как правило, проводится при патологических процессах, вызывающих у клинициста предположения о злокачественном характере поражения. Она является единственно возможным методом дооперационной морфологической верификации узловых образований, которые требуют обязательного обследования для исключения их опухолевого характера. Пункция позволяет установить природу поражений, решить вопрос о тактике ведения больного. Если уверенно установить характер процесса не удастся, выполняется интраоперационное цитологическое исследование, как самостоятельный метод или дополнительный к гистологическому исследованию. Технически пункция выполняется по сходной технологии, в качестве примера приведем порядок пункции тонкой иглой щитовидной железы

Основными показаниями к диагностической пункции является узловой зоб. Одиночные «холодные» узлы являются наиболее важным объектом для пункции щитовидной железы. Именно в этой категории больных, благодаря пункции, в большинстве наблюдений удается предотвратить неоправданную операцию или помочь хирургу выработать адекватный план (объем) операции. При множественных узлах обычно пунктируют наиболее выраженные из них или «неблагоприятные» с точки зрения лечащего врача или специалиста по ультразвуковой диагностике.

При диффузном нетоксическом зобе аспирационная пункция позволяет провести дифференциальный диагноз между коллоидным или паренхиматозным зобом и аутоиммунным тиреоидитом. При четких

клинических признаках злокачественного процесса цитологическое исследование позволяет уточнить план ведения больных. В частности, при анаплазированном раке и злокачественной лимфоме оперативное вмешательство не показано, однако, лечебная тактика при этих процессах различна.

Техника выполнения пункции. Первым этапом обследования является пальпация шеи для исключения образований, не связанных со щитовидной железой. Диагностическая пункция щитовидной железы должна выполняться под контролем ультразвукового исследования, которое играет важную роль в локализации узловых образований, позволяет уменьшить вероятность ошибочных, и, что наиболее важно, ложноотрицательных заключений, связанных с тем, что игла не попадает в патологический очаг. Кроме того, сведения о результатах ультразвукового исследования помогают цитологу правильно трактовать клеточный состав мазков.

Пункцию щитовидной железы выполняют в положении больного лежа на спине с небольшой подушкой под шеей и плечами, при этом мышцы шеи расслаблены. Можно использовать местную анестезию лидокаином. Значительно улучшаются результаты исследования, если пунктат сразу оценивается цитологом (срочная цитологическая диагностика): при получении неполноценного материала сразу же выполняется повторная пункция. Для исключения злокачественного характера поражения считают необходимым не менее двух пункций – при первичном осмотре и в динамике. Материал распределяют на стеклах тонким слоем. Если при пункции щитовидной железы получают обильный кровянистый материал (что бывает достаточно часто), его распределяют на нескольких стеклах, готовя тонкие однослойные препараты, как готовят мазки крови. Материал, содержащий жидкость, необходимо центрифугировать и готовить препараты из осадка. Значительно улучшается качество мазков при использовании цитоцентрифуги.

Получение материала из женских половых органов. Минимальная схема обследования женщины должна включать бактериоскопическое исследование мазков из трех биотопов:

- уретры (диагностика ИППП);
- заднего свода влагалища (оценка состояния влагалищного биоценоза, диагностика вагинозов и вагинитов);
- цервикальный канал (диагностика ИППП).

При необходимости, дополнительно отбирают пробы для культурального исследования и ПЦР.

Из вульвы и преддверия влагалища материал забирают ватным тампоном. При воспалении бартолиновых желез проводят их пункцию. Материал из матки получают с помощью специального инструмента – шприца-аспиратора. После прохождения зондом цервикального канала в полости матки раскрывают наружную оболочку зонда и аспирируют шприцем содержимое матки. Взятие для исследования материала из придатков матки проводят во время оперативного вмешательства.

Взятие исследуемого материала из влагалища. Материал для анализа получают до проведения мануального влагалищного исследования. Зеркало и подъемник вводят во влагалище и с помощью стерильной салфетки убирают избыток выделений и слизи. Материал собирают с заднего свода или с патологически измененных участков влагалища двумя стерильными тампонами. Первый тампон помещают в стерильную пробирку и как можно быстрее доставляют в лабораторию для проведения бактериологического исследования. Второй тампон используют для приготовления мазка. Мазок наносят на 2 предметных стекла. Если одновременно планируется исследование материала из цервикального канала или уретры все 2-3 мазка можно сделать на одном стекле (в лабораторию в этом случае доставляют 2 стекла, на каждом из которых находятся мазки из всех обследуемых биотопов). Мазки маркируют, высушивают на воздухе и, поместив в чашки

Петри или специальные транспортные контейнеры, доставляют в лабораторию.

Если планируется исследование на гонорею, материал забирают тампоном, который немедленно после взятия погружают в транспортную среду (например, среду Эймс с углем). Материал должен быть доставлен в лабораторию в течение 12 ч, не допускается его охлаждение ниже 30 С.

При исследовании на уреоплазмы и микоплазмы материал забирают тампоном (ложкой Фолькмана, специальным зондом) и сразу же суспендируют в специальной питательной среде. Можно использовать как единую питательную среду для микоплазм и уреоплазм, так и отдельные питательные среды для каждого микроорганизма. Материал должен быть доставлен в лабораторию в течение 2 ч. Допускается увеличение сроков транспортировки до 48 ч при хранении материала при температуре 4-8 С.

При исследовании на трихомонады для сбора материала используют сухой стерильный тампон. Сразу после взятия материала его суспендируют в пробирке (флаконе) с транспортной средой для трихомонад (раствором Рингера). Материал должен быть доставлен в лабораторию как можно быстрее, его охлаждение не допускается.

Материал из цервикального канала. Показания к проведению исследования – диагностика цервицитов и ИППП.

Взятие исследуемого материала состоит из следующих действий:

Обнажают шейку матки с помощью зеркал, убирают избыток выделений и слизи стерильной марлевой салфеткой или ватным шариком, смоченными стерильным физиологическим раствором или дистиллированной водой и высушивают стерильной сухой марлевой салфеткой.

Если предполагается бактериологическое исследование (например, на гонорею), тонкий стерильный тампон аккуратно вводят в цервикальный канал на глубину 1,0-1,5 см, вращают в течение 10 с, не касаясь стенок

влагалища, и сразу же погружают в транспортную среду (среду Эймс с углем).

Для исследования на хламидии, микоплазмы, уреаплазмы и вирусы материал забирают с помощью специальных цитощеток (зондов).

Порядок дальнейших действий зависит от выбранного метода исследований:

- культуральный метод – материал помещают в питательную среду; можно использовать как единую питательную среду для микоплазм и уреаплазм, так и отдельные питательные среды для каждого микроорганизма; материал должен быть доставлен в лабораторию в течение 2 ч; допускается увеличение сроков транспортировки до 48 ч при хранении материала при температуре 4-8 С;

- ПЦР – материал помещают в микропробирку с лизирующим буфером или физиологическим раствором; зонд несколько раз вращают в пробирке для снятия материала;

- РИФ (ПИФ) – сразу после взятия материала готовят мазки на предметном стекле; лучше использовать специальные стекла с лунками, которые обычно входят в состав диагностических наборов.

Получение материала из мужских половых органов. Получение спермы. Преаналитический этап исследования спермы – один из самых ответственных при проведении лабораторного анализа. Клиницист, назначивший анализ, и врач лаборатории должны совместно правильно ориентировать пациента, избегать погрешности при исследовании эякулята.

Подготовка мужчины к проведению исследования. При направлении на спермограмму врач обязан подробно объяснить пациенту, какие условия подготовки он должен выполнить для получения достоверного результата.

Эякулят должен быть получен после воздержания от семяизвержений в течение 2,5-4,5 суток, но не более 7 дней полового воздержания. Пациент должен обеспечить регулярные семяизвержения в течение 1-2 месяцев перед исследованием эякулята для предотвращения явлений застоя.

Не употреблять алкоголь в любых количествах в течение 6-7 дней. Постараться исключить в течение 2,5 месяцев перед исследованием эякулята токсические факторы. Хронические интоксикации: алкогольная, табачная, наркотическая, производственная, бытовая, лекарственная и другие закономерно приведут к снижению качественных, а иногда и количественных, показателей эякулята.

При наличии воспалительных заболеваний уретры и/или простатовезикулярного комплекса рекомендуется перед исследованием эякулята провести санацию, и для ликвидации медикаментозной интоксикации выждать не менее 2 недель. Необходимо отказаться от исследования эякулята, если в течение 7-10 дней перед анализом были простудные или другие острые заболевания, протекавшие с лихорадкой. Гипертермия при лихорадящих состояниях нарушает процесс сперматогенеза, протекающего нормально при температуре на 2-3°C ниже температуры тела. При гипертермии могут снижаться как количественные, так и качественные показатели спермограммы.

Накануне сдачи эякулята на анализ необходимо исключить тяжелые физические нагрузки, конфликтные ситуации. Психоэмоциональный дискомфорт может привести к нарушению процесса получения эякулята.

Получение эякулята путем мастурбации в условиях медицинского учреждения. Наиболее эффективным является получение эякулята путем мастурбации непосредственно в медицинском учреждении вблизи от лаборатории, которая будет проводить сперматологическое исследование. Для получения эякулята должно быть выделено, по возможности, специальное помещение. Необходимо соблюдать высокий уровень чистоты в помещении, ликвидировать следы предыдущих посещений. Температура в помещении должна быть комфортной, не ниже 20-25°C.

Очень важен психоэмоциональный настрой пациента перед мастурбацией. Поэтому врач должен очень мягко и доброжелательно объяснить пациенту, где и как он будет получать эякулят, при этом снимая, по

возможности, ощущение тревожности и неуверенности. Получение эякулята должно проводиться в идеально чистую сухую стеклянную (или одноразовую пластмассовую) посуду с достаточно широким горлом, нагретую до температуры тела. Использование кремов, масла, вазелина при мастурбации крайне нежелательно. После эякуляции нельзя отжимать в баночку, последние капли эякулята из уретры, стряхивать или смазывать в баночку капли эякулята, попавшие на руки или головку полового члена.

Сразу же после получения эякулята пациент должен доставить полученный материал в лабораторию. Пациент должен сообщить врачу о времени, когда произошла эякуляция, предупредить, если был собран не весь объем или эякуляция, была получена с трудом.

Получение эякулята из кондома. Это наиболее физиологичный способ получения материала, однако резина презерватива и спермицидная смазка моментально приводят к обездвиживанию и гибели сперматозоидов. Поэтому в материале из кондома оцениваются только количественные параметры и морфология, а наиболее важные параметры подвижности сперматозоидов не исследуются. В связи с этим скорость доставки материала в лабораторию не имеет значения. Кондом с полученным эякулятом можно хранить в прохладных температурных условиях (холодильник) сутки и более.

2.2. Взятие крови для исследований

Согласно п.3.2.1 ГОСТ Р 53079.4 – 2008 большая часть клинических лабораторных исследований проводится в образцах крови: венозной, артериальной или капиллярной.

Кровь на все виды исследований берется натощак (последний прием пищи спустя 8-12 ч), до выполнения диагностических (эндоскопическое и лучевые исследование, биопсия, пункция, глубокая пальпация и общий массаж), функциональных (глюкозотолерантный тест, зондирование, введение контрастных веществ) и лечебных (инъекции, гемодиализ, гемосорбция, плазмоферез и др.) процедур. Следует избегать интенсивной

физической нагрузки. Перед взятием крови нельзя курить. При взятии крови важное значение имеет положение пациента (сидя, лежа). Так у стационарных больных кровь забирается в основном в положении лежа, а у пациентов амбулаторно-поликлинического звена – в положении сидя. Поэтому важно при повторных исследованиях забирать кровь у данного пациента в идентичном положении тела.

В настоящее время показаниями для исследования крови из пальца, которая забирается в основном фельдшерами-лаборантами или медсестрами отделений (в соответствии с ГОСТ Р 53079.4-2008), являются: младенческий возраст пациента, ожоги большой площади, труднодоступные или мелкие вены, выраженное ожирение, установленная склонность к венозному тромбозу, а также анализы газов, электролитов, глюкозы и лактата, выполняемые в реанимации у постели больного (Point-of-care testing). Во всех остальных случаях следует забирать венозную кровь. Это связано с лучшей воспроизводимостью результатов исследования, не требует специальных навыков в капиллярном отборе, позволяет избежать ряда осложнений (инфицирование ранки, повреждение надкостницы) и ускоряет процесс исследования в лаборатории за счет применения стандартных пробирок моноветт или вакутейнеров.

Взятую кровь необходимо сохранять в закрытой пробирке, вертикально в штативе и как можно быстрее (не менее 45 мин) доставить в лабораторию. Общее правило получения проб крови – как можно быстрее отцентрифугировать доставленный материал. Длительный контакт сыворотки со сгустком крови приводит к значительным изменениям истинного содержания многих аналитов (калий, глюкоза, АСТ, ЛДГ).

Взятие капиллярной, венозной крови для выполнения клинического анализа ручными методами. *Капиллярную кровь* берут при мелких или труднодоступных венах, при необходимости ежедневного мониторинга за показателями крови, например, у онкологических больных на фоне химиотерапии. В этой связи представляется важным использование

автоматических скарификаторов, гарантирующих низкую травматичность и соблюдение нужной глубины прокола, в зависимости от типа скарификатора. Во многих лабораториях при взятии гематологических проб капиллярной крови считается допустимым нарушать соотношение крови и ЭДТА, что приводит к искажению количества тромбоцитов при подсчете в автоматических анализаторах.

При взятии капиллярной крови возможен ряд особенностей, которые бывает трудно стандартизировать: физиологические – холодные, цианотичные пальцы, методические – малый объем исследуемой крови и в связи с этим необходимость разведения образца для анализа. Непосредственно перед исследованием кровь необходимо тщательно перемешать в течение нескольких минут для разведения антикоагулянта и равномерного распределения форменных элементов в плазме. Длительное постоянное перемешивание образцов до момента их исследований не рекомендовано из-за возможного травмирования и распада патологических клеток. Мазки крови рекомендовано делать не позднее 1-2 ч после взятия крови.

Венозную кровь считают лучшим материалом для клинического исследования крови. Кровь берется из кубитальной вены, жгут накладывается не более 1 мин, кулак разжимается после попадания первых капель крови в пробирку. При более длительном наложении жгута получают завышенные результаты общего белка, альбуминов (+6-12%), более 3 мин – аланинаминотрансферазы (+10%), билирубина (+8%). При наложенном жгуте и сжатом кулаке значительно повышается уровень калия в плазме (+15-25%).

Кровь должна поступать свободным током непосредственно в пробирку, содержащую антикоагулянт. Следует избегать использования шприца с иглой из-за его недостаточной безопасности для медперсонала и невозможности исключения гемолиза крови при переносе ее под давлением в пробирку. Взятие крови шприцем без антикоагулянта с последующим переливанием в пробирку недопустимо из-за формирования микросгустков и

гемолиза. Кроме того, в момент переливания крови в пробирку она подвергается воздействию окружающей среды, что приводит к потере стерильности и снижению качества образца. Данный способ взятия проб венозной крови не может быть стандартизован и не обеспечивает безопасность пациента и медперсонала.

Рекомендуемыми иглами для взятия венозной крови в целях оценки состояния гемостаза являются иглы с маркировкой диаметра просвета (G) 22-19 (чем больше номер, тем меньше диаметр: 0,6-1,0 мм). У детей можно применять размер 23. Очень узкие иглы (более 25 G) применять нельзя, так как при кровотоке через иглу с таким диаметром образуется сгусток и активируется система гемостаза. Иглы с очень широким просветом (менее 16 G) могут вызвать гемолиз отбираемой крови вследствие турбулентности кровотока в канале иглы. После инфузии (трансфузии) наикратчайший срок, после которого можно брать кровь составляет 1 час. При необходимости проведения инфузии следует взять кровь из другой руки. При взятии крови из в/в катетера необходимо промыть его физиологическим раствором, затем первые 3-5 мл крови сбросить в специальные пробирки.

Взятие крови вакуумными системами имеет ряд преимуществ, основными из которых являются обеспечение высокого качества пробы и предотвращение любого контакта с кровью. Вакуумные системы состоят из трех основных элементов, соединяющихся между собой в процессе взятия крови: стерильной одноразовой пробирки с крышкой и дозированным содержанием вакуума; стерильной одноразовой двусторонней иглы или иглы-бабочки, закрытой с обеих сторон защитными колпачками; одно- или многоразового иглодержателя. Под действием вакуума кровь втягивается через иглу и безопасный клапан напрямую из вены в пробирку и сразу же смешивается с химическим реактивом, находящимся как в виде жидкого содержимого, так и нанесенного на внутренние стенки пробирок. В практике широко используются иглы-бабочки вместо обычных игл и держатели,

которые необходимо использовать при взятии крови во флаконы для микробиологических исследований.

Взятие крови для исследования на автоматических гематологических анализаторах. Этилендиаминтетраацетат (ЭДТА- K_2 ЭДТА или K_3 ЭДТА) – предпочтительный антикоагулянт при подсчёте форменных элементов крови с использованием автоматических гематологических анализаторов. Использование Na_2 ЭДТА не рекомендовано вследствие его плохой растворимости. Концентрация ЭДТА во взятой крови должна быть постоянной и составлять 1,5-2,2 мг/мл крови.

Применение в качестве антикоагулянтов гепарина или цитрата натрия сопровождается структурными изменениями клеток, поэтому эти антикоагулянты не рекомендованы для использования как при автоматизированном, так и морфологическом исследовании крови.

Необходимо строго следить за количеством взятой крови, объём которой должен соответствовать указанной отметке на пробирке. Несоблюдение этого условия, а также недостаточно тщательное перемешивание крови приводит к изменению конечной концентрации антикоагулянта, что может повлечь за собой появление микросгустков, неточное определение концентрации клеточных элементов, искажение морфологической структуры клеток. Для обеспечения в пробе точного соотношения кровь/антикоагулянт масса наполнителя в пробирках должна строго соответствовать заданному объёму крови. Пробирки должны заполняться полностью, в пределах $\pm 10\%$ от указанного объёма (т.е. пробирка на 4,5 мл должна заполняться в объёме между 4 и 5 мл). Неправильное соотношение кровь/реагент в пробе ведёт к ошибочным результатам анализа. Сразу после заполнения и извлечения пробирки из держателя ее нужно аккуратно перевернуть несколько раз (количество раз определяется типом наполнителя) на 180° для смешивания пробы с наполнителем. Перемешивание пробирок должно соответствовать определенной кратности и производиться медленными вращательными

движениями сразу после заполнения их кровью и извлечения из держателя. Пробирки должны быть поставлены вертикально в штатив и доставлены в таком виде в лабораторию. В плохо перемешанной пробе образуются микросгустки, ведущие к искажению результатов тестов, а также к поломкам лабораторных анализаторов вследствие закупорки пробозабирающих зондов. Пробу нельзя трясти, ее надо плавно перемешать. При слишком энергичном перемешивании возможны пенообразование и гемолиз, что может негативно сказаться на результатах лабораторных исследований.

При выполнении гематологических исследований на значительном удалении от места взятия крови неизбежно возникают проблемы, связанные с условиями транспортировки. При перевозках пробирок с кровью рекомендовано использовать герметично закрытые пластиковые пробирки и специальные транспортные изотермические контейнеры.

Получение сыворотки и плазмы крови. Основные закономерности при взятии крови для получения сыворотки и плазмы.

Сыворотка. При получении сыворотки основная тенденция – ускорить свертывание крови без повреждения клеток. Для этого кровь пускают по стенке пробирки, чтобы контакт со стенкой уже активировал свертывание. В коммерческих пробирках внутрь помещают полистероловые гранулы для усиления контактной активации свертывания.

В лабораторию может отдаваться как цельная кровь, так и отобранная сыворотка. Венозная кровь после взятия отстаивается в пробирке при комнатной температуре (18-25°C) в течение 30-60 минут (до полного образования сгустка). Пробирки для исследования сыворотки следует центрифугировать не ранее чем через 30 минут после взятия крови, чтобы гарантировать свертывание крови. Сыворотка должна быть отделена от кровяного сгустка не позднее двух часов после взятия крови. Для отделения сыворотки от форменных элементов необходимо: центрифугировать кровь после образования сгустка при 1300g в течение 10 минут; в пробирках с гелем – центрифугировать кровь при 1500-2000g в течение 10 минут, а затем

отобрать сыворотку в одноразовую пластиковую пробирку. Гель обеспечивает стабильный барьер между сывороткой и форменными элементами на 48 часов. Повторное центрифугирование пробирок с гелем не разрешается.

Полученная сыворотка до передачи курьеру должна храниться в холодильнике (от +2°C до +4°C) или в контейнере с хладогеном. Отобранную сыворотку можно хранить в холодильнике в течение 1-2 дней. Для более длительного хранения (что не желательно), сыворотку необходимо заморозить. После размораживания сыворотку необходимо тщательно перемешать. Повторное замораживание недопустимо.

Плазма крови. При взятии крови в пробирку следует обеспечить первичное взаимодействие крови с антикоагулянтом, избегая контактного активирования системы свертывания.

На коагулологические исследования взятие крови осуществляется только из вены. Кровь пациента для определения протромбинового времени и других тестов на его основе до передачи курьеру должна храниться при комнатной температуре (от +20°C до +24°C), центрифугировать не позднее, чем через 45 минут после взятия, само исследование должно быть проведено в течение 2-х часов с момента взятия крови. Хранение в холодильнике или в контейнере с хладогеном категорически запрещено. Для проведения всех прочих тестов плазму следует хранить при температуре от +2°C до +8°C не более 4 часов. Допускается однократное замораживание бедной тромбоцитами плазмы при температуре от -20°C до -40°C на срок до нескольких недель без значительной потери активности факторов свертывания. Размораживание плазмы следует осуществлять при температуре +37°C, повторная заморозка недопустима. Кровь отправляется в лабораторию в день взятия. До следующего дня хранить кровь нельзя! Транспортировка крови на большие расстояния и ее частое встряхивание искажает результаты анализов.

На иммунологический анализы (витамины, гормоны, иммунный статус, электролиты) используются пробирки с лития гепарином (в т.ч. для исследования ионов кальция и магния) или натрия гепарином. При комнатной температуре плазму необходимо использовать для анализа в период от 2 до 6 часов после взятия образца. Плазма отделяется центрифугированием (1000-1500g, 15 минут). Если доставка в лабораторию осуществляется в течение дня, то она хранится при температуре от +4°C до +8°C в холодильнике и доставляется в лабораторию в специальных транспортных контейнерах с хладогеном, время доставки плазмы в лабораторию не должно превышать 24 часа. Для более длительного хранения плазма может быть заморожена при температуре – 20°C, при этом она может храниться до 4 недель. При быстром замораживании до – 70°C срок хранения может быть продлен до 6 месяцев.

На глюкозу применяются пробирки с фторидом натрия + оксалат калия или фторидом натрия + K₂ЭДТА в том случае, если кровь хранится более 2 часов. Считается, что эритроциты, даже в осадке отцентрифугированной крови, способны потреблять за 1 час до 10% глюкозы плазмы. Натрия фторид ингибирует процесс распада глюкозы в образце до 6 часов при комнатной температуре. Следует принимать во внимание, что содержание глюкозы в цельной крови на 10% ниже, чем в плазме. Допускается хранение пробы до 24 часов в холодильнике при температуре от +4°C до +8°C в вертикальном положении.

Взятие крови для приготовления толстой капли. Исследование толстой капли крови, окрашенной по Романовскому-Гимзе, является основным методом диагностики малярии и других кровепаразитов (микрофилярии, бабезии)

При изготовлении толстых капель палец поворачивают проколом вниз. К выступающим каплям крови прикасаются предметным стеклом, на которое берут 2-3 капли крови и затем иглой или углом другого предметного стекла кровь размазывают, чтобы получить на стекле овал диаметром около 1 см

или полосу длиной 2-3 см. Слой крови не должен быть слишком толстым, так как в последнем случае при высыхании он превращается в корочку и легко отстает от стекла. После изготовления толстых капель их высушивают, положив стекла на горизонтальную поверхность. Для ускорения высыхания стекол их можно помещать в термостат (30-35°C). Нужно предохранять стекла от запыления.

Взятие крови из вены для обнаружения LE-клеток. *LE-клетки* или клетки красной волчанки (LE-феномен) – это нейтрофилы или моноциты, содержащие крупные гомогенные базофильные включения, представляющие собой фагоцитированные ядра погибших лейкоцитов, а собственное ядро клетки оттеснено. Формирование LE-клеток красной волчанки происходит при наличии LE-фактора в крови и других биологических жидкостях. LE-фактор – это фракция аутоантител к ядрам клеток (анти-ДНК антитела). Эти антитела разрушают хроматин ядра, он превращается в аморфную массу, из которой образуются гематоксилиновые тела, или волчаночные тельца.

LE-клетки могут быть обнаружены в крови при системной красной волчанке и некоторых других аутоиммунных заболеваниях (системной склеродермии, дерматомиозите).

LE-клеток крови **исследуют в препаратах лейкоконцентрата.** Есть несколько модификаций получения лейкоконцентрата.

Методика Цинкхама-Конли в модификации Е. Н. Новоселовой.

Принцип. Механическое воздействие на кровь, облегчающее образование LE-феномена.

Реактивы. 1) натрия оксалат; 2) краска Романовского-Гимзы или азур-эозин; 3) метиловый спирт для фиксации мазков.

В пробирку с 10 мг оксалата натрия вносят 10 мл венозной крови, тщательно перемешивают и оставляют стоять на 1,0-1,5 ч при комнатной температуре. Вносят в пробирку 8-10 стеклянных бусинок диаметром 3-4 мм, плотно закрывают пробкой и перемешивают, переворачивая пробирку пробкой то вверх, то вниз в течение 30 мин. Затем отстаивают в течение 1 ч

при комнатной температуре для разделения слоев. Плазму отсасывают пастеровской пипеткой и вносят в центрифужную пробирку. Центрифугируют при 1000 об./мин в течение 5 мин. Надосадочную жидкость удаляют, а из осадка готовят мазки. Высохшие мазки фиксируют в метиловом спирте и окрашивают гематологическим красителем.

Методика Харгривеса-Циммера. Реактивы: 1) метиловый спирт; 2) краска Романовского-Гимзы или азур-эозин.

В пробирку набирают 10 мл венозной крови и оставляют при комнатной температуре (можно в термостате при 37°C) на 2 ч. Свернувшуюся кровь выливают на металлическое сито, поставленное на чашку Петри, и фарфоровым пестиком протирают сгусток. Содержимое чашки Петри переносят в центрифужную пробирку и центрифугируют при 2000 об./мин в течение 5 мин. Надосадочную жидкость удаляют, а из верхнего слоя осадка готовят мазки. Высохшие мазки фиксируют метанолом и окрашивают по принятым в гематологии методикам.

Микрометод. бВ мерную центрифужную пробирку отмеривают 1 мл 3% раствора трилона В и 4 мл крови, взятой из вены самотеком. Осторожно смешивают и ставят в термостат под углом 45° при температуре 37° на 15-20 мин. Как только отделится 2-3 мл плазмы, верхний слой ее осторожно отсасывают пастеровской пипеткой и выливают. Нижний слой плазмы и лейкоцитарную пленку отбирают в центрифужную пробирку. Центрифугируют в течение 10 мин при 1500 об/мин. Из осадка готовят мазки, красят, как обычные мазки периферической крови. Кровь можно брать не натошак.

2.3. Получение материала для цитологического исследования

Получение спинномозговой жидкости. Ликвор чаще получают люмбальной, реже субокципитальной пункцией.

Люмбальная пункция проводится между III и IV поясничными позвонками по линии Quincke (линия, соединяющая самые высокие части

гребней двух подвздошных костей). Пункцию можно также проводить между L₄-L₅; L₅-S₁ и между L₂-L₃.

Субокципитальная (цистернальная) пункция проводится между основанием черепа и 1-м шейным позвонком на высоте линии, соединяющей сосцевидные отростки.

При проведении люмбальной пункции необходимо:

- первые 3-5 капель ликвора удалить, что позволяет освободиться от примеси «путевой» крови, попадающей в первую порцию ликвора в результате повреждения иглой кровеносных сосудов, расположенных в области эпидурального пространства;

- собрать 3 порции (в исключительных случаях две) в стерильные пробирки, плотно закрыть, на каждой пробирке указать ее порядковый номер, имя, отчество и фамилию больного, время пункции, диагноз и перечень необходимых исследований;

- собранный в пробирки ликвор доставляется в клинко-диагностическую лабораторию немедленно;

- в лаборатории отмечается время доставки ликвора.

С помощью люмбальной пункции у взрослого человека можно без осложнений получить 8-10 мл ликвора, у детей, включая детей младшего возраста, 5-7 мл, у грудных детей – 2-3 мл.

Получение материала для цитологического исследования выпотных жидкостей. Эвакуация выпота проводится пункцией серозной полости. Пунктат высвобождают в чистую сухую, а при необходимости – в стерильную посуду. Пункцию должен проводить лечащий врач или процедурная медицинская сестра. В лабораторию следует доставить максимальное количество жидкости. Для исследования рекомендуется разделить пробу: 10 мл нативной жидкости будет использовано для биохимических и серологических исследований. К остальной жидкости рекомендуется добавить антикоагулянты или стабилизаторы:

- ЭДТА – для подсчёта клеточного состава жидкости;

- гепарин для цитологического исследования и для измерения рН;
- фторид натрия для определения лактата;
- цитрат натрия – часто рекомендуется использовать 5% раствор цитрата натрия. Если же есть возможность исследовать жидкость сразу после её эвакуации, то добавления цитрата натрия лучше избегать. Раствор может влиять на морфологию клеток, вызывая их деструкцию, а также изменять реакцию среды, что, в свою очередь, может привести к плохому прокрашиванию препаратов. К тому же жидкость далеко не всегда подвергается свертыванию.

Если проводится биохимическое исследование, то одновременно следует отобрать 5 мл венозной крови для определения градиента «сыворотка/выпотная жидкость» для альбумина, а-амилазы, билирубина, холестерина, общего белка, ЛДГ и триглицеридов.

Исследование клеточного состава свернувшейся жидкости недопустимо, поскольку клетки при свёртывании поглощаются сгустком и в осадок центрифугата не выпадают или обнаруживаются в незначительном количестве.

Получение материалов для паразитологического исследования.
Фекалии, полученные после самостоятельной дефекации, доставляются в лабораторию свежими (не более суточной давности) в количестве 10-50 г (объем чайной/столовой ложки).

Посуда, в которой кал транспортируется и хранится, должна быть одноразовой, изготовлена из прозрачного или полупрозрачного неокрашенного материала (из стекла или пластика), с плотно закрывающейся крышкой, не содержать остатков моющих средств. На наклеенной этикетке обязательно, помимо данных пациента, указывается дата и время сбора пробы. Материал, доставленный в лабораторию, исследуются в этот же день. При подозрении на стронгилоидоз, анкилостомидозы, трихостронгилоидозы материал необходимо исследовать сразу после получения его от больного не позднее 1 часа.

При невозможности немедленного исследования материал можно сохранять с применением консерванта в холодильнике (при t от $+4^{\circ}$ до $+5^{\circ}$). Кал заливается консервантом в соотношении 1:1 или 1:2, тщательно перемешивается одноразовой пластиковой и чистой стеклянной палочкой. В качестве консервирующей жидкости удобно использовать жидкость Барбагалло (3 мл формалина 40% + 97 мл физ. раствора). Данный раствор готовится заранее, хранится при комнатной температуре, не теряя длительное время своих консервирующих свойств.

Исследования материала, полученного с перианальной области проводят утром, до гигиенических процедур (подмывание, душ) и до дефекации. Соскоб проводят деревянным шпателем, смоченным 50% глицерином. Полученный материал счищают покровным стеклом в каплю 50% глицерина, нанесенную на предметное стекло, закрывают тем же покровным стеклом и микроскопируют сначала на малом, затем, при обнаружении объектов похожих на яйца, на большом увеличении. Данная методика подразумевает получение материала непосредственно в лаборатории и проведение лабораторного исследования *ex tempore*.

Метод отпечатка на клейкую ленту является общедоступным, может применяться как в условиях стационара, так и при обследовании пациентов поликлиники. Для проведения исследования нужна клейкая лента шириной 1,5-2,0 см (можно использовать канцелярский скотч или специальную операционную пленку). Отрезок клейкой ленты фиксируют на шпателе клеевой стороной наружу и делают несколько отпечатков со складок перианальной области и ануса, после чего аккуратно приклеивают ленту на предметное стекло. Микроскопия проводится без покровного стекла, непосредственно через клейкую ленту. Исследовать препараты надо не позднее одного часа после приготовления, т.к. при более длительном хранении препарата яйца острицы могут высыхать и разрушаться.

Получение материала для исследования кожи и волос. Наиболее простые и быстрые лабораторные диагностические тесты, требующих

минимальных затрат времени и средств: соскобы кожи, трихоскопия, вычёсывание гребнем или щёткой, цитология кожи.

Кожные соскобы. Для проведения кожных соскобов необходимы минеральное масло, предметные стёкла, лезвие скальпеля или шпатель. Сначала надо подстричь волосы с выбранных участков кожи. Для получения поверхностного соскоба достаточно поскоблить кожу лезвием скальпеля или шпателем, смоченным минеральным маслом. Для получения глубокого соскоба материал соскабливается до появления капель капиллярной крови. Материал наносится на предметное стекло с каплей минерального масла, накрывается покровным и исследуется микроскопией. Важно проводить соскоб с периферии максимально свежих очагов поражения. Необходимо тщательно исследовать все поля зрения препарата, причём успех обнаружения паразитов больше зависит от качества получения материала и выбора места для соскоба, чем от количества стёкол.

Вычёсывание щёткой. Позволяет обнаружить некоторых паразитов (блох) и возбудителей дерматофитоза. Для этого необходимы следующие материалы: частый гребень или щётка/зубная щётка, белая фильтровальная бумага, в некоторых случаях питательная среда для дерматофитов. Вычесанные волосы помещаются на влажную фильтровальную бумагу, при наличии экскрементов блох легко обнаруживаются красно-коричневые точки на белой бумаге. Поверхностных паразитов можно увидеть при малом увеличении микроскопа (объектив 4х) или при помощи лупы.

Трихоскопия. Трихоскопия – исследование волос. При помощи трихоскопии можно диагностировать ряд болезней фолликулов и волос, провести оценку содержимого воронки фолликула, идентифицировать паразитов. Материал получают удалением хирургическим зажимом 50-100 волосинок. При одномоментном удалении не более 30 волос эта процедура вполне безболезненна. Выщипанные волосы размещают на предметном стекле, предварительно добавив минеральное масло. Препарат накрывают покровным стеклом.

Трихоскопия может оказаться полезной при диагностике некоторых паразитарных болезней, например, позволяет дифференцировать педикулёз и хейлетиеллёз (гниды вшей плотно прикреплены к волосу, а яйца хейлетиелл лежат свободно).

Цитология кожи. Цитология кожи – быстрый, неинвазивный метод, имеющий большую диагностическую ценность. Данный вид исследования особенно ценен для диагностики нодулярных, экссудативных, гнойничковых поражений, при образовании корок и себореи, а также при отитах. При нодулярных поражениях предпочтительнее получение материала путём тонкоигольной аспирации при помощи шприца объёмом 10 мл с иглами 21G, 24G. При мокнущих поражениях можно проводить исследование мазков-отпечатков. Также цитологическому исследованию подвергают глубокие соскобы. Препараты высушивают на воздухе, можно использовать фиксацию метанолом или красителем Diff-Quick. Просмотр препаратов проводят последовательно с использованием объективов 4x, 10x, 40x, 100x (с иммерсионным маслом).

Получение биоматериала для микробиологических исследований.

Общие требования. Сбор материала и проведение исследований необходимо делать до начала лечения антибиотиками, антисептиками, противогрибковыми препаратами.

Взятие материала для микробиологических исследований необходимо проводить в стерильные емкости (контейнеры, пробирки, флаконы с питательными средами и транспортными системами), желательны выданные лабораторией, в которой проводится исследование

Хранить выданные транспортные среды нужно в холодильнике и согревать до комнатной температуры примерно за 30 минут перед использованием.

Транспортные среды нужно контролировать для каждого вида исследования. Информацию об используемых транспортных средах и других расходных материалах смотрите в описании.

Обязательная маркировка пробирок, контейнеров, флаконов и транспортных сред с указанием Ф.И.О., даты рождения, даты и времени взятия материала и локализации, откуда получен образец.

При оформлении направительного бланка заполнение всех граф, с указанием локализации материала и номера теста. Информация на бланке и материале должны совпадать.

Необходимо соблюдать сроки и режим хранения проб, полученных для исследований.

Сбор мокроты. Материал для исследования желательно собирать во время приступа кашля, обязательно в чистую, широкогорлую, хорошо закрывающуюся посуду. Лучше всего это делать утром, когда бронхи максимально заполнены отделяемым. Чтобы исследование было точным, а процесс сбора материала легким, рекомендуется:

- Пить много воды в течение дня за сутки до проведения анализа.
- Предварительно прополоскать рот кипяченой водой с 2% раствором соды.
- Непосредственно перед сбором материала сделать 3 глубоких вдоха.
- Собрать в емкость мокроту, а не слюну.

Для полноценного исследования необходимо 3-5 мл материала, но провести анализ можно и при меньшем количестве мокроты. Емкость следует доставить в лабораторию сразу же после сбора материала, так как его анализ нужно проводить не позже чем через 2 часа после отхаркивания.

Процедура сбора мокроты для исследования на микобактерии туберкулеза.

В момент откашливания мокроты создается очень высокий риск воздушно-капельного распространения инфекции. В связи с этим желательно проводить сбор мокроты либо в специально выделенном вентилируемом помещении (пункте сбора мокроты), оснащенном бактерицидными лампами и средствами дезинфекции, либо на открытом воздухе. Сбор мокроты должен проводиться при непосредственном участии медицинского работника.

Контейнер с порцией мокроты достаточного объема (не менее 3-5 мл), содержащей уплотненные или гнойные комочки без слюны, тщательно закрывают завинчивающейся крышкой, затем контейнер маркируют и помещают в специальный бикс для транспортировки в лабораторию.

Для сбора диагностического материала используют специальные контейнеры из ударостойкого прозрачного материала, не допускающего просачивания жидкости и позволяющего оценить количество и качество собранной пробы, не открывая крышку. Контейнеры должны герметично закрываться завинчивающимися крышками с уплотнением. Асептический материал необходимо немедленно доставлять в лабораторию.

При проведении исследований методом посева для повышения эффективности исследования время между сбором любого материала и его обработкой в лаборатории должно быть минимальным. При однократном замораживании диагностического материала жизнеспособность микобактерий сохраняется. Размораживать и повторно замораживать материал нельзя.

Промывные воды бронхов. Показания к проведению исследования – воспалительные заболевания нижних отделов дыхательных путей при отсутствии мокроты. Исследование промывных вод бронхов проводят при отсутствии или скудности мокроты. Это связано не только с технической сложностью взятия материала, но и с меньшей диагностической ценностью результата вследствие его значительного разбавления. Концентрация микроорганизмов в промывных водах в 10–1000 раз меньше по сравнению с мокротой.

Выпотной жидкости. Для бактериологического исследования взятие выпотной жидкости следует проводить в стерильные пробирки. Если предполагается исследование аэробной и анаэробной микрофлоры, то жидкость для бактериологического анализа нужно забирать в две разные пробирки. Для анаэробной микрофлоры необходимы соответствующие (анаэробные) условия транспортировки. Если предполагается исследовать

выпот на выявление микобактерий туберкулёза, то стерильность не требуется; на исследование берется примерно 20 мл жидкости.

Стабилизация, транспортировка, хранение материала и проб.
Порядок транспортировки биоматериала. Одной из главных проблем является игнорирование влияния сроков постановки лабораторных тестов и правил транспортировки проб в лабораторию. К примеру, значительная часть расхождений между автоматизированным и микроскопическим подсчетом клеточных элементов вызвана несоблюдением сроков постановки тестов. Стандартизация сроков доставки и жесткое соблюдение стандартов позволит избежать ошибочных результатов. Перевозка крови в стеклянных пробирках с ватными пробками приводит к впитыванию крови в ватный тампон, гемолизу. Перевозка проб, предназначенных для биохимического или иммунологического анализа без предварительного центрифугирования, приводит к искажению результатов за счет влияния клеточных элементов. Одним из решений, позволяющих облегчить транспортировку и увеличить сроки постановки реакций, является применение стабилизаторов и разделительных элементов, например гелей и гранул.

Общее правило – доставить материал как можно быстрее, для некоторых исследований в короткие сроки 15-30-45 минут. Доставка пробирок должна проводиться в вертикальном положении, в штативе, избегая встряхивания. Транспортировка биологического материала в лабораторные подразделения должна осуществляться в специальных закрытых от внешнего воздействия пластиковых контейнерах-укладках с крышками, которые подвергаются дезинфекции. Недопустимо доставлять биоматериал в карманах, бумажных пакетах или сумках. Пробирки, контейнеры с мочой и другим биоматериалом выставляются на стол регистратора в перчатках. В зимнее время транспортировка биоматериала по улице при минусовых температурах должна быть максимально сокращена.

Вакуумные системы. Для стандартизации условий взятия, транспортировки и хранения биологических проб пациента были

разработаны вакуумные системы. Плотно закрытые пробирки предотвращают контакт биологического материала с воздухом, испарение пробы, повышения концентрации всех нелетучих компонентов. Строго дозированные в заводских условиях наполнители обеспечивают необходимое соотношение крови и реагента для каждого вида исследований. Добавленный в пробирки с оксалатом или ЭДТА калия ингибитор (флуорид натрия) сохраняет стабильность глюкозы в пробе до 24 часов. Гель обеспечивает стойкий барьер, максимально эффективно отделяя форменные элементы от плазмы или сыворотки. Проба находится в одной пробирке при взятии, транспортировке, анализе, хранении, что исключает необходимость переливания, уменьшает возможность возникновения гемолиза и вспенивания образца. Вакуум исключает воздействие давления поршня шприца на форменные элементы.

Хранение проб. Пробы, хранившиеся в холодильнике, перед проведением анализа необходимо нагреть до комнатной температуры. В процессе хранения и транспортировки проб крови существенное влияние на стабильность аналитов оказывают свет и сильная вибрация. Неосторожное обращение с контейнерами с кровью (сильная тряска, удары) может привести к гемолизу. Под воздействием прямого солнечного света в образце разрушаются билирубин, витамин С, порфирины, креатинкиназа, фолиевая кислота. На этапе получения, хранения и транспортировки биоматериала в рамках оценки качества контролю подлежат: время взятия материала, правильный выбор типа пробирки (антикоагулянт, стабилизатор), время отделения форменных элементов, длительность и условия хранения образца, время доставки материала в лабораторию, целостность контейнера с образцом, соблюдение соотношения крови и антикоагулянта. После взятия материала пробирки маркируются и передаются курьеру вместе с направлениями. Номера на пробирках должны соответствовать номерам на направлениях.

2.4. Преаналитический лабораторный этап

2.4.1. Приготовление препаратов из крови, мочи, мокроты, кала, ликвора, выпотных и других жидкостей для микроскопии

Приготовление нативного препарата. Исследование нативного препарата биопробы расценивается как ориентировочный метод, который позволяет идентифицировать наличие признаков заболевания в исследуемой пробе.

Получение осадка мочи и приготовление нативного препарата. В центрифужную пробирку наливают после размешивания 10-12 мл мочи, центрифугируют со скоростью 1500-2000 об/мин в течение 10-15 минут. Надосадочную мочу сливают быстрым движением (опрокидывают пробирку), а осадок размешивают с оставшейся мочой пастеровской пипеткой. Каплю осадка с помощью этой же пипетки помещают на предметное стекло и покрывают покровным стеклом. Это нативный препарат.

Нативный препарат изучают на малом увеличении (окуляр 10х или биноккуляр 7х или 10х, объективы 8х и/или 10х, 20х), а затем на большом увеличении (окуляр 10х или биноккуляр с окулярами 7х или 10х и объективом 40х). Содержание форменных элементов (эритроцитов, лейкоцитов) подсчитывают в нескольких полях зрения на большом увеличении микроскопа. Ответ дают по количеству клеток в поле зрения (например, 10-15 в п/зр), если клеток мало – 0-2 в п/зр или единичные не в каждом п/зр. Если клеточных элементов много и подсчитать их в поле зрения не удастся, отмечают в бланке, что лейкоциты (эритроциты) густо покрывают все п/зр. При скудном содержании таких форменных элементов как цилиндры, исследование проводят на малом увеличении микроскопа и указывают их количество в препарате (2 цилиндра в препарате). Если цилиндров много, их количество отмечают в поле зрения, т.е. на большом увеличении микроскопа. Для таких элементов, как эпителиальные клетки (многослойный плоский, переходный, почечный эпителий), кристаллы,

принято давать оценку «большое», «умеренное», «небольшое» или «незначительное» количество, используя малое увеличение микроскопа.

Нельзя делать препарат из всего осадка, выбивая его на предметное стекло, и микроскопировать без покровного стекла, так как препарат получается многослойный, неравномерной толщины, что искажает оценку количества и качества (морфологии) клеточных элементов и загрязняет оптику.

Нативный препарат кала. Каплю каловой эмульсии наносят на предметное стекло и покрывают покровным. В этом препарате при микроскопическом исследовании на фоне калового детрита обнаруживают остатки непереваренной белковой пищи: соединительную ткань, мышечные волокна с исчерченностью и без исчерченности; остатки непереваренной углеводной пищи – перевариваемую клетчатку; остатки нерасщепленного и расщепленного жира: капли, иглы, глыбки; кристаллы оксалата кальция, трипельфосфата, Шарко-Лейдена, гематоидина. В этом же препарате можно обнаружить слизь, если она попала в препарат, и заключенные в ней лейкоциты (нейтрофилы, эозинофилы), цилиндрический эпителий, эритроциты, а также обнаружить яйца гельминтов, цисты простейших и их вегетативные особи.

Нативный препарат мокроты. Лаборант переносит доставленную в лабораторию мокроту в чашку Петри, а при большом количестве – в две чашки Петри. На рабочем столе лаборанта, работающего с мокротой, должны быть оборудованы две поверхности – одна белая, другая черная, предназначенные для изучения характера мокроты и приготовления нативных препаратов и препаратов, предназначенных для цитологического и бактериоскопического исследования препаратов.

С помощью длинных штапелей отдельные составные фрагменты мокроты переносятся на предметное стекло: слизь, плотные участки слизи, белесоватые тяжи, ниточки и пленочки, серые уплотненные тяжи и прожилки, желтоватые или слегка окрашенные кровью комочки или прожилки крови, обнаруженные на фоне слизи, фрагменты гноя, плотные

участки и матовые белесоватые крупинки на фоне гноя. На одном предметном стекле должно быть 2 нативных препарата. Под каждым покровным стеклом должно быть не менее 4-5 фрагментов полиморфной по составу мокроты. Если мокрота однородная, из 4-5 участков доставленного материала готовится один нативный препарат. Отобранные фрагменты мокроты покрывают покровным стеклом и слегка прижимают его ногтем. Из нативного препарата можно приготовить препарат для окраски, осторожно сдвигая покровное стекло.

Микроскопическое исследование нативного препарата мокроты должен проводить врач.

Клеточные и неклеточные элементы в мокроте распределяются всегда неравномерно, поэтому необходимо исследовать несколько нативных препаратов или два, составленных из всех частей мокроты. Если приготовление комплексных нативных препаратов вызывает трудности, необходимо готовить нативные препараты из каждой составной части мокроты, а из нативного препарата, в котором обнаружены клеточные элементы, вызвавшие интерес микроскописта, готовить препарат для окраски азур-эозином и/или по Цилю-Нильсену.

Приготовление окрашенного препарата. Фиксация и окраска мазков крови. Наиболее часто применяют окраску по Романовскому, Нохту и Паппенгейму-Крюкову. Для фиксации продолжают использовать спирт. В метиловом спирте фиксация продолжается 5-10 мин., *в этиловом спирте – не менее 30 мин.* При окраске по Паппенгейму фиксация мазков проводится раствором эозин-метиленового синего по Май-Грюнвальду. В настоящее время практически все клинико-диагностические лаборатории приобретают коммерческие красители, которые имеются в широком ассортименте. Автоматическая фиксация и окраска мазков может быть осуществлена с помощью специальных устройств, в которые загружают нефиксированные мазки. Последующее автоматическое дозирование фиксатора-красителя и

буферных растворов обеспечивает стандартную и равномерную окраску мазков.

Фиксация и окраска цитологических препаратов. Если мазки предполагается окрашивать по методу Папаниколау, их необходимо зафиксировать влажными, сразу после получения (влажная фиксация). Фиксацию проводят специальными аэрозолями или фиксатором в капельной форме (фиксатор наносят на влажную поверхность мазка). Можно зафиксировать мазки, поместив их после получения в кювету в 96° этиловым спиртом на 10-20 минут. Затем мазки высушивают на воздухе.

Если мазки предполагается окрасить методом Романовского (модификации Лейшмана, Май-Грюнвальд-Гимза, Паппенгейма), их после получения высушивают на воздухе (сухая фиксация). Если предполагается окрашивание гематоксилин-эозином, можно использовать как сухую, так и влажную фиксацию мазков.

В настоящее время все большее распространение получает метод жидкостной цитологии. Главным отличием данного метода от традиционного является то, что материал не наносят сразу на стекло, а помещают во флакон со стабилизирующим раствором. Быстрое консервирование материала позволяет предотвратить бактериальное засорение образца, повреждение клеток вследствие их высыхания, сохраняет образец в оптимальных условиях для дальнейшей его транспортировки в лабораторию и исследования. Стабилизирующий раствор обеспечивает сохранение морфологических, иммуноцитохимических и генетических свойств клеток. Полученный материал можно использовать для проведения молекулярно-диагностических исследований.

Приготовление толстой капли. Толстые капли после высушивания на воздухе окрашиваются краской Романовского-Гимза без предварительной фиксации. При этом происходит выщелачивание (гемолиз) гемоглобина из эритроцитов, и окрашиваются лейкоциты, кровяные пластинки и плазмодии. Если толстые капли сохраняли неокрашенными более недели, то их следует

предварительно обработать дистиллированной водой в течение 10-15 мин, наливая воду непосредственно на препарат. Удалив со стекол дистиллированную воду вместе с выщелоченным гемоглобином, на них наливают красящий раствор. После окраски толстой капли препараты ополаскивают водой. Лучше всего промывать препарат, погружая его в баночку с водой, соблюдая осторожность, чтобы не смыть со стекла окрашенную каплю.

2.4.2. Обогащение препаратов методами флотации, седиментации

Методы обогащения широко используются при паразитологических исследованиях. В частности, использование методов обогащения показано во всех случаях, когда исследование нативных препаратов дает отрицательные результаты, а клинические и анамнестические данные указывают на паразитарную инвазию. Для исследования могут использоваться как свежевыделенные каловые массы, так и законсервированные. *Метод флотации* заключается в накоплении, в частности яиц, гельминтов в поверхностной пленке при суспендировании каловых масс. Флотационные методы дают хорошие результаты, в особенности для обнаружения легких яиц власоглава, аскариды, анкилостомид и карликового цепня, в то время как крупные и тяжелые яйца трематод могут долго не всплывать и скапливаться в осадке.

Седиментационные методы традиционные основаны на оседании «тяжелых» объектов (яиц и личинок гельминтов) в осадке на дне пробирки в легкой инкубационной среде (раствор этилацетата). Метод позволяет обнаруживать яйца и личинки гельминтов, а так же цисты простейших. Имеются коммерческие одноразовые наборы для концентрации яиц и личинок гельминтов методом седиментации. Парасеп – готовый к использованию пластиковый одноразовый комплект, содержащий необходимое количество этилацетата, забуференного физ.раствора и формалина, и состоящий из круглодонной пробирки, встроенного фильтра и конусной (центрифужной) пробирки.

Помимо прямых копроовоскопических методик, флотационных и седиментационных методов обогащения, в КДЛ проводится исследование материала, полученного с использованием специальных методов, направленных на выявление конкретных возбудителей гельминтозов. К ним относятся метод обнаружения остриц в перианальных складках с помощью перианального соскоба/отпечатка (различные модификации), метод обнаружения личинок кишечной угрицы (метод Бермана и его модификации).

2.4.3. Цитоцентрифугирование

Цитоцентрифугирование – технология, основой которой является нанесение тонкослойного клеточного препарата на слайд из пробы, полученной при использовании жидкостной цитологии во время горизонтального центрифугирования в системах специальной конструкции, где цитокамеры герметично соединены с поверхностью слайдов. Процесс осаждения клеток на слайд под действием центробежной силы происходит аналогично процессу в центрифужной пробирке. Технология CytoSpin реализуется при использовании специальной цитоцентрифуги, которая имеет ряд моделей цитокamer сложной конструкции, предназначенных для различных объемов и концентрации проб и несколько рабочих каналов для создания от 2 до 8 рабочих зон на одном препарате. Этапы технологии цитоцентрифугирования включают: получение пробы, перемешивание пробы, проведение дополнительных операций по улучшению качества цитологического препарата непосредственно в цитокамере (отмывка и осветление клеточных суспензий, лизис эритроцитов, разделительное центрифугирование в градиентном растворе, коррекция концентрации клеток), дозирование пробы в герметичную систему из цитокamеры и слайда, горизонтальное центрифугирование с осаждением клеточных элементов на слайд и получением препаратов для фиксации и окраски (возможна фиксация и окраска слайдов непосредственно в цитокамере), высушивание препарата в

специальной подвеске центрифуги за счет эффективной системы вентиляции, возникающей при вращении ротора. Применение этой технологии на преаналитическом этапе возможно в любых областях с цитологии и комплексных диагностических схемах. Цитоцентрифугирование – технология, обеспечивающая сохранность клеток для исследования и получение высококачественных тонкослойных препаратов на слайдах любого типа и покрытия. Эта технология позволяет: работать с живыми клетками или осуществлять их фиксацию; использовать разные объемы проб и концентрации клеток; удалять мешающие микроскопии факторы; – создавать от 1 до 8 зон для исследования на одном слайде; применять разные способы окраски или внесения зондов и иммунохимических маркеров.

2.4.4. Автоматизация этапа пробоподготовки

Процесс производства лабораторных анализов включает ряд процедур, связанных с внутрилабораторной идентификацией образца и подготовкой биологического материала к исследованиям. Данный этап включает снятие крышек с приспособлений, в которых находится биоматериал, центрифугирование проб, приготовление и окраску мазков; дополнительную сортировку и доставку подготовленных проб на автоматические анализаторы для проведения исследований. Автоматизация и стандартизация перечисленных процедур имеет не менее важное значение в работе по непрерывному повышению качества результатов лабораторных исследований, чем автоматизация процесса их выполнения на автоматических анализаторах.

Лабораторная автоматизированная система (ЛАС) – это комплекс программных и технических средств, предназначенных для автоматизации различных технологических операций, связанных с производством лабораторных анализов. ЛАС могут включать в себя следующие устройства:

- автоматического сбора доставленных проб;
- переносчики проб;

- сканирующее устройство для идентификации проб по штрих-кодам;
- автоматические центрифуги; загрузку в центрифугу производят автоматически, после центрифугирования пробы возвращают в систему транспортировки проб;

- детектор уровня сыворотки определяет уровень сыворотки в каждой пробирке, информация об уровне сохраняется в системе для дальнейшего использования в устройстве дозирования проб на порции;

- устройство удаления крышек; крышки, закрывающие пробирки, автоматически удаляются и помещаются в специальный контейнер, отвечающий требованиям безопасного хранения;

- устройство для нанесения штрих-кода предназначено для нанесения штрих-кода на вторичные пробирки;

- устройство деления проб на порции; сыворотка автоматически переносится в нужном количестве из первичной пробирки в одну или несколько вторичных пробирок;

- выходной модуль; пробирки автоматически помещаются в выходное устройство, при этом производится сортировка по лабораторным анализаторам и по срочности тестирования.

8.3. Основными целями внедрения ЛАС в КДЛ являются стандартизация технологических операций подготовки биоматериала к исследованиям, исключение контакта персонала с биоматериалом и увеличение производительности труда. Лаборатория может использовать 2 подхода для автоматизации:

- комплексные, или тотальные, лабораторные автоматизированные системы;

- модульная, пошаговая автоматизация отдельных процессов в лаборатории или отделов лаборатории.

Комплексные лабораторные автоматизированные системы предназначены для полной автоматизации всех этапов процесса получения результатов лабораторных исследований в КДЛ. Внедрение комплексных

ЛАС в КДЛ обосновывается необходимостью проведения большого или очень большого объема лабораторных исследований (более 5-7 млн. тестов в год). Комплексные ЛАС требуют больших финансовых затрат, которые окупаются не менее чем через 2-3 года. Они экономически не выгодны для средних и малых КДЛ. Основным направлением автоматизации для КДЛ, выполняющих менее 5`000`000 лабораторных анализов в год, является модульная пошаговая автоматизация. Модульная автоматизация позволяет решать проблему создания современной автоматизированной лаборатории при помощи ряда последовательных шагов. При осуществлении модульной автоматизации первый шаг – установка анализатора для проведения анализов в автоматическом режиме. Следующим шагом может быть подключение к анализатору роботизированной станции для загрузки проб в анализатор и их выгрузки. В дальнейшем можно будет осуществить подключение роботизированной станции к линии транспортировки, в результате будет достигнута комплексная автоматизация процесса производства данного вида анализов.

2.5. Аналитический этап лабораторного анализа

2.5.1. Техника основных манипуляций при выполнении лабораторного анализа

Техника дозирования жидкостей. Дозирование пробы и реагентов – обязательный этап большинства аналитических процессов. Точность дозирования напрямую влияет на точность получаемого результата. Практически все дозаторы, применяемые в КДЛ, используют один из двух методов:

1. Метод прямого дозирования – сначала жидкость заполняет точно заданный объем, а затем она максимально полно извлекается из этого объема в пробирку. При пипетировании нажимают на головку плунжера большим пальцем до первой остановки. Погрузив наконечник пипетки в раствор, медленно освобождают плунжер. В наконечник набирается необходимый

объем жидкости. Для того чтобы слить жидкость, повторно нажимают на головку плунжера, но теперь уже до второй остановки, то есть до упора. При этом из наконечника удаляются все остатки жидкости. Затем палец поднимают, плунжер возвращается в исходное положение

2. Метод обратного дозирования – жидкость заполняет большой объем, а затем из устройства извлекается строго заданное количество жидкости. При обратном способе пипетирования нажимают на головку плунжера большим пальцем до упора. Погружают наконечник пипетки в раствор и медленно освобождают плунжер. В наконечник набирается объем жидкости, но несколько больший, чем необходимо. Для дозировки заданного объема нажимают на головку плунжера только до первой остановки. Остающаяся после этого в наконечнике часть жидкости в измеряемый объем не входит. Ее необходимо удалить, что осуществляют дожатием плунжера до упора. Затем освобождают палец и плунжер возвращается в исходное положение. Обратным способом удобно пользоваться при дозировке легко пенящихся и вязких жидкостей.

При использовании стеклянных пипеточных дозаторов лаборант визуально следит за заполнением жидкостью объема пипетки, стараясь, чтобы мениск точно совпал с градуировочной риской, нанесенной на пипетке. Основной недостаток этой технологии – большая зависимость точности дозирования от мастерства и внимательности лаборанта.

Автоматические пипетки служат для скоростного манипулирования при отборе и дозировании жидкостей, представляют собой устройство с пневматическим механизмом, действие которого основано на вытеснении жидкости воздухом. По конструктивным особенностям автоматические пипетки можно характеризовать по следующим основным группам: механические и электронные, одноканальные и многоканальные, фиксированного и переменного объема.

Механические автопипетки снабжены пружинным механизмом и дозирующим устройством – микрометрическим винтом. Приводятся в

действие вручную. В электронных пипетках пневматический механизм управляется микропроцессором с электропитанием от аккумуляторов. Одноканальные автопипетки нашли наибольшее применение в лабораториях. Многоканальные автопипетки по производительности значительно превышают одноканальные, но область их применения ограничена рамками узкоспециальной аппаратуры. Это определяет конфигурацию их концевой части. Чаще всего в лабораториях используются многоканальные пипетки для иммунологических исследований, которые рассчитаны на работу с плашками строго определенных параметров.

Точность и воспроизводимость измерений, выполняемых автопипетками, колеблется в пределах от $\pm 0,5\%$ до $\pm 3\%$, в зависимости от типа автопипеток. Автопипетки, как правило, не увеличивают точность дозирования, они лишь облегчают и ускоряют работу. Поэтому для точных аналитических целей предпочтительно использовать калиброванные по объему (взвешиванием на аналитических весах объема дозирования дистиллированной воды) стеклянные пипетки.

Имеются ограничения на величину дозирования, особенно при ручном исполнении. При работе с биологическим материалом с разной плотностью (кровь, плазма, сыворотка крови, моча, слюнная жидкость и т.д.) рекомендуется при ручном дозировании использовать объемы не менее 3-5 мкл. Учитывая, что при проведении биохимических, иммунохимических исследований соотношение биопроба/реагент, как правило, находятся в соотношении 1:10-1:100, объем реакционной смеси (кювет) не должен быть меньше 300-500 мкл.

Первоначальная калибровка дозаторов проводится на предприятии-изготовителе. Калибровка в условиях лаборатории должна осуществляться дистиллированной водой при температуре +22 градуса, и для калибровки требуются аналитические весы с точностью порядка 0,001 мг.

В лабораторных анализаторах дозирование осуществляется за счет работы шаговых двигателей, использования многоканальных наконечников

(обеспечивают смыв реагентов с поверхностей) и сложных схем дозирования, при которых большой объем реагента смывает всю биопробу. Стандартное гарантированное дозирование в лабораторных анализаторах позволяет работать с объемами менее 1 мкл и существенно сократить количество используемых реагентов.

Техника взвешивания. В клинико-диагностических лабораториях взвешивание проводят на аналитических весах, предназначенных для определения массы тел с высокой точностью. Работают с образцами небольших объёмов. Весы позволяют определять массу порошков, жидкостей, твёрдых тел, а также небольших по размерам животных.

Высокая дискретность (точность) аналитических весов в 0,01 мг достигается за счёт использования технологического решения – электромагнитной компенсации, благодаря чему происходит мгновенный отклик на изменения массы. Точность измерений также обеспечивают ветрозащитные экраны с автоматизированным или ручным приводом, а заряды статического электричества нейтрализуются встроенным либо устанавливаемым дополнительно ионизатором. Устройства имеют двунаправленные интерфейсы, что позволяет подключать компьютер, принтер, сохранять данные на флеш-карты.

Калибровка аналитических весов может проводиться несколькими способами. Во многих моделях предусмотрен механизм автоматической калибровки при помощи встроенных гирь. Также возможна ручная внешняя калибровка – для этого дополнительно приобретаются эталонные гири. Калибровка необходима при каждом перемещении устройств с места на место, при изменении температуры окружающей среды, толчках, ударах, вибрации и т. д.

Техника фильтрации. Фильтрация жидкостей в лаборатории проводят с помощью воронок, в которые вкладывается специальная фильтровальная бумага. Фильтрация осуществляется либо в режиме постоянной разности давлений (например, вакуум-фильтры), либо в режиме

постоянной скорости. Все современные способы очистки можно разделить на две большие группы: механические фильтры, являющиеся перфорированной перегородкой той или иной конструкции, и очистители в силовых полях (гравитационные, центробежные, магнитные, электростатические). Недостатком первых является малая грязеемкость, увеличение перепада давления по мере забивания отверстий или пор в перегородке, ограничения по степени загрязнённости, подаваемой на очистку жидкостей, большие габаритные размеры, увеличивающиеся по мере увеличения пропускной способности или тонкости очистки. Всё это приводит к необходимости периодической замены или регенерации фильтрующего элемента.

Центрифугирование. Центрифугированию подвергается различный материал, поэтому эта процедура должна быть строго стандартизована. При лабораторных исследованиях общим правилом для всех видов проб является требование как можно быстрее отцентрифугировать доставленный материал. Для биохимических исследований (сыворотка) практически приемлемым является интервал 2 ч между взятием крови и центрифугированием. Кровь должна находиться в закрытых пробирках, крышки с пробирок перед центрифугированием не снимают.

Перед проведением центрифугирования проверяют, все ли пробирки, стаканы для них, вкладыши одинаковы по весу, форме и величине. Это делается для того, чтобы «плечи» ротора центрифуги были уравновешены. Если количество крови в пробирках разное, то подбирают одинаковые пары пробирок и каждую из них устанавливают в симметричные противоположные гнезда ротора центрифуги. Для соблюдения симметрии можно использовать пробирку с нужным количеством воды в противоположном гнезде.

Объемы, которые можно центрифугировать, варьируют в зависимости от модели центрифуги и конструкции ее ротора. При выборе оптимальных условий центрифугирования необходимо ориентироваться на центробежную силу (g), а не на скорость вращения ротора (обороты в минуту). К паспорту

центрифуги должна быть приложена таблица (номограмма), определяющая зависимость между числом оборотов и величиной центробежной силы конкретного ротора.

Дистилляция. Вода для лабораторных исследований должна быть без примесей, от ее качества во многом зависят результаты многих биохимических тестов. В лабораториях используется несколько категорий воды по качеству очистки.

Дистиллированная вода – вода, полученная путем выпаривания и последующей конденсации (перегнанная вода), она характеризуется стерильностью, очисткой от нерастворимых частиц, но плохой очисткой от растворенных ионизированных катионов и анионов. Дистиллированная вода является апиrogenной, т.е. не содержащей возбудителей, поэтому при внутривенном введении растворов, приготовленных на этой воде, не может возникнуть лихорадки. В ней сохраняются такие ионизирующиеся примеси как аммиак, CO_2 и Cl . Дистиллированная вода имеет, как правило, сопротивление 0,25-0,35 мегом-см или удельную электропроводимость 3-4 мкS/см (S – симменс). Для приготовления реактивов для клинической биохимии может быть использована вода с проводимостью менее 20 мкS/см. Из-за растворённой углекислоты дистиллированная вода имеет слабокислую среду, её pH составляет 5,4-6,6. Почти все газообразные вещества способны в той или иной мере растворяться в воде или органических растворителях. Некоторые из них, например NH_3 , HCl , жадно поглощаются водой. Другие же газы (кислород, водород) обладают меньшей или незначительной растворимостью в воде, причем она зависит от температуры воды и внешнего давления. Чем выше парциальное давление газа, тем больше он растворяется в воде, и чем выше температура воды, тем меньше растворимость газов. Поэтому воду для удаления растворенных в ней газов кипятят. Для получения полностью нейтральной воды её кипятят до полного удаления углекислого газа (в течение 30 минут) и хранят в герметичной таре.

Бидистиллированная вода – дважды очищенная вода, полученная перегонкой дистиллированной воды в кварцевом аппарате – бидистилляторе, близка к химически чистой воде. Бидистиллированная вода характеризуется повышенной химической активностью; при хранении и применении нужно предпринимать особые методы предосторожности для исключения возможности загрязнения бидистиллированной воды

Фильтрованная вода – вода, полученная путем фильтрации через керамические фильтры с диаметром пор 0,9 мкм. Такая вода очищается практически только от нерастворимых примесей и бактерий, но содержит соли и вирусы, т.е. является пирогенной. В лабораториях может применяться для приготовления красителей.

Деионизированная вода – вода, полученная методами ионного обмена, обратного осмоса или комбинацией этих способов. Такая вода имеет проводимость не более 5 мкS/см и рекомендуется для аналитических работ по клинической биохимии. Деионизованная вода практически не содержит ионов. Абсолютно чистая вода имеет проводимость 0,055 мкS/см и соответственно удельное сопротивление составляет 18 МОм·см (МΩ·см).

Деионизацию осуществляют с помощью ионообменных смол. Используют смолы двух типов: катионитные R-H (R-органический радикал) и анионитные R-OH. Ионы металлов связываются на катионите. Отрицательные ионы кислотных остатков осаждаются на анионите. Образовавшиеся ионы H и OH объединяются в молекулу воды. Возможно предварительное использование процесса обратного осмоса. Для раздавливания биопроб и реактивов лучше использовать деионизованную воду, полученную методами ионного обмена и обратного осмоса.

Техника приготовления растворов. Химические реактивы выпускаются промышленностью с различной степенью очистки. В клинических лабораториях находят применение реактивы, в основном, следующих четырех типов квалификации чистоты:

Технический – на этикетке обозначается буквой «Т», содержит значительное количество примесей, для выполнения анализов непригоден. Используется только для подсобных целей. Например, техническая серная кислота применяется для приготовления хромовой смеси.

Чистый – имеет до 0,1% примесей, на этикетке обозначается буквой «Ч».

Чистый для анализа – содержание примесей не превышает 0,07%. На этикетке обозначается буквами «ЧДА».

Химически чистый – содержит примеси не более 0,03%. На этикетке обозначается буквами «ХЧ». Последние три типа чистых реактивов используются непосредственно для проведения биохимического анализа.

Растворители следует применять только чистые независимо от того, какие по точности готовят растворы. Если растворителем служит вода, то можно применять только дистиллированную или деионизированную воду, в отдельных случаях бидистиллят.

Лабораторная посуда должна быть чистой. Предварительно подготавливают соответствующей емкости посуду, в которой будут готовить и хранить получаемый раствор. Если нужно приготовить 1 л раствора, то для растворения следует взять посуду емкостью не больше 1,5 л. Если готовят 10 л раствора, то бутылка должна быть емкостью не больше 12-13 л.

При особо точных и ответственных анализах следует обязательно принимать во внимание возможность выщелачивания стекла и применять, если это допустимо, кварцевую посуду или такую, стекло которой не содержало бы искомый элемент. Так, неизбежна ошибка при определении алюминия, свинца и некоторых других элементов в посуде из стекла, содержащего эти элементы.

Вся посуда, контактировавшая с кровью, подвергается очистке от остатков материала и дезинфицируется в соответствии с действующими правилами санэпидрежима. Обычно хорошая очистка достигается уже после замачивания посуды в моющем комплексном растворе. Затем посуда

промывается проточной водой и ополаскивается дистиллированной водой. С хорошо вымытой посуды вода стекает струйками, не задерживаясь в виде капель. После сушки она абсолютно прозрачная и не имеет подтеков. Высушивают посуду в сухожаровых шкафах. Можно сушить и на любых приспособлениях, где обеспечивается свободный отток воды с посуды.

В лабораториях удобно пользоваться посудомоечными машинами, в которых используется ультразвуковая очистка поверхностей. Если в загрязненной посуде был или мог быть инфицированный биологический материал, она перед тем, как закладываться в моечную машину, должна быть стерилизована согласно санитарным правилам работы с соответствующим материалом. Лабораторная посудомоечная машина имеет ванну с крышкой, обычно объемом 3-10 л, в которую заливают моечный раствор и кладут посуду, она обрабатывается ультразвуком при температуре до 60°C, после чего промывается чистой водой.

При работе на современных лабораторных анализаторах используется разовые пробирки, мытье которых не предусматривается. Они дезинфицируются и уничтожаются согласно действующим санитарным нормам, как правило, специализированными компаниями по прописанной технологии.

Растворы щелочные нельзя оставлять надолго в фарфоровой и особенно в стеклянной посуде. Если приходится их оставлять, то необходимо вначале нейтрализовать растворы, потом немного подкислить и хранить только подкисленные растворы. Скорость растворения твердого вещества зависит от размера его частиц. Чем крупнее частицы, тем медленнее идет растворение. Поэтому перед растворением твердого вещества его следует измельчить и отвешивать для растворения только измельченное вещество. Сказанное не относится к гигроскопичным веществам, так как последние в измельченном виде очень легко поглощают влагу из воздуха вследствие большого увеличения поверхности. Поэтому гигроскопичные вещества растворяют, не измельчая, разве только быстро разбив большие куски.

Некоторые правила работы с реактивами:

- 1.** Емкости с реактивами, утратившие этикетки с указанием состава их содержимого, из работы изымаются. Это же относится к реактивам с истекшим сроком годности.
- 2.** Определяя запах реактива, соответствующую емкость держат на расстоянии, направляя к себе движением ладони пары вещества. Это позволяет предотвратить химический ожог слизистых носа и глаз.
- 3.** Приготавливая растворы кислот, следует иметь в виду, что кислота добавляется в последнюю очередь, то есть кислоту наливают в воду, а не наоборот. Иначе это может привести к сильному разогреву смеси вплоть до ее закипания и разбрызгивания кислоты. Особенно это характерно для серной кислоты.
- 4.** Повысить величину растворимости вещества можно, нагревая емкость с раствором на водяной бане. Но это справедливо только для веществ, растворение которых протекает с поглощением тепла. Нагревать растворы веществ можно лишь до определенной температуры, чтобы не вызвать разложение вещества.
- 5.** Перед взвешиванием реактивы, хранившиеся в холодильнике, должны быть выдержаны при комнатной температуре не менее 20 минут.

2.6. Методы клинических лабораторных исследований

Фотометрические методы анализа. Фотометрический анализ – один из самых распространенных методов, он характеризуется высокой чувствительностью и возможностью определения большого количества веществ. При фотометрическом анализе используется способность химических соединений поглощать лучистую энергию определенных длин волн. Открытие новых реагентов, образующих окрашенные соединения с веществами, разработка принципов сопряженных реакций, оснащение лабораторий биохимическими анализаторами делает применение этого

метода одним из самых распространенных в КДЛ. Инструментальные методы позволяют использовать спектры поглощения, лежащие как в ультрафиолетовой, так и в инфракрасной областях спектра. Фотометрические исследования проводятся на фотометрах и спектрофотометрах. Фотометры – оптические приборы, позволяющие измерять световой поток на фиксированных длинах волн. Сплошные спектры изучаются с помощью спектрофотометров.

Абсорбционная фотометрия. Определение концентрации окрашенного вещества в растворе оптическими методами основывается на законе Бугера-Лаберта-Бера, который формулирует выражение для оптической плотности: $D = C \cdot l \cdot \varepsilon_{\lambda}$, где D – оптическая плотность раствора или абсорбция, C – концентрация поглощающего вещества, l – толщина кюветы, через который проходит свет, ε_{λ} – молярный показатель поглощения (экстинкции), зависящий от длины волны и природы вещества. Молярный показатель поглощения ε_{λ} является константой данного раствора вещества при данной длине волны оптического излучения. Величина оптической плотности D безразмерна, но может исчисляться в «беллах» (сокращение – Б). Таким образом, закон Бугера-Ламберта-Бера устанавливает, что абсорбция светового потока определенной длины волны (A_{λ}) прямо пропорциональна концентрации растворенного вещества. В кювете с фиксированной длиной оптического пути (в клинической химии принята стандартная кювета в 1 см) абсорбция и концентрация связаны через коэффициент молярной абсорбции.

Для каждого вещества характерен свой спектр поглощения, причем он часто разный для окисленных и восстановленных форм. На изменении спектра поглощения при переходе окисленная \leftrightarrow восстановленная форма аналитов основано определение концентрации большинства субстратов и активности практически всех ферментов. Исследование аналитов рекомендуется проводить при длине волны облучения, соответствующей

максимальному поглощению, то есть длине волны, при которой максимален коэффициент молярной экстинкции ε . Это связано с тем, что при максимальном ε максимальна чувствительность фотометрического определения изменений концентрации аналита.

Прямая пропорциональность между абсорбцией и концентрацией сохраняется в пределах определенного оптического диапазона, который является характеристикой конкретного оптического прибора. Линейный оптический диапазон прибора устанавливается экспериментально (приводится в технических характеристиках прибора). В современных фотометрах и биохимических анализаторах линейный оптический диапазон составляет от 0,1 до 2,5 и даже 3,0 ед. оптической плотности.

Разрешение или чувствительность оптической системы – это та минимальная разница в оптической плотности раствора в кювете в 1 см, которую может различить прибор. Современные фотометры позволяют измерять растворы с разрешением до 0,001 ед. оптической плотности. Чем выше разрешение, тем с большей точностью данная система способна измерять концентрацию (активность) аналитов. Разрешение зависит от абсолютного значения оптической плотности. Вне линейного диапазона оптической плотности ($< 0,1$ или > 3 ед. оптической плотности) разрешение ухудшается.

Ограничения по диапазону оптической плотности накладывают соответствующие ограничения на диапазон измеряемых концентраций аналитов. Результатом этого является то, что абсорбционная фотометрия надежно регистрирует изменения содержания аналитов в пределах 1-2 порядков и не более. Этого достаточно для определения изменений концентраций основных биохимических показателей, таких как общий белок, билирубин, глюкоза и изменений активностей ферментов аминотрансфераз, фосфатаз, дегидрогеназ. В общем виде – это скрининговые показатели «биохимического благополучия» или «биохимической патологии». Однако количественные изменения конкретных метаболитов (гормоны,

онкомаркеры, компоненты протеолитических систем), определение которых диагностирует нозологическое заболевание, методами абсорбционной фотометрии определить не удастся. Для этой цели применяются иммунохимические методы.

Особенности фотометрической схемы биохимических анализаторов. Основой функционирования биохимического анализатора является одновременное получение многопараметрической информации. Для этого биохимические анализаторы оснащены, как правило, полихроматором (рис. 2.2), который позволяют одновременно регистрировать оптическую плотность исследуемых растворов на нескольких длинах волн.

Источник света (лампа) находится внутри карусели с измерительными кюветами, в которых содержатся пробы для измерения. Карусель через фиксированные промежутки времени, например через 15 с, совершает оборот, при котором все кюветы освещаются белым светом, проходящим через входную щель. Прошедший через кювету свет разлагается на дифракционной решетке в спектр и измеряется серией детекторов, каждый из которых настроен на определенную длину спектра, включая измерение в ультрафиолете и ближнем инфракрасном диапазоне (полихроматор). Для монохроматических измерений оценивается сигнал с одного из 12 детекторов, а при бихроматическом измерении берутся одновременно результаты с 2 детекторов. Бихроматическое измерение дает более устойчивые результаты, поскольку можно компенсировать флуктуацию в условиях измерения, таких как напряжение источника питания, температура и др.

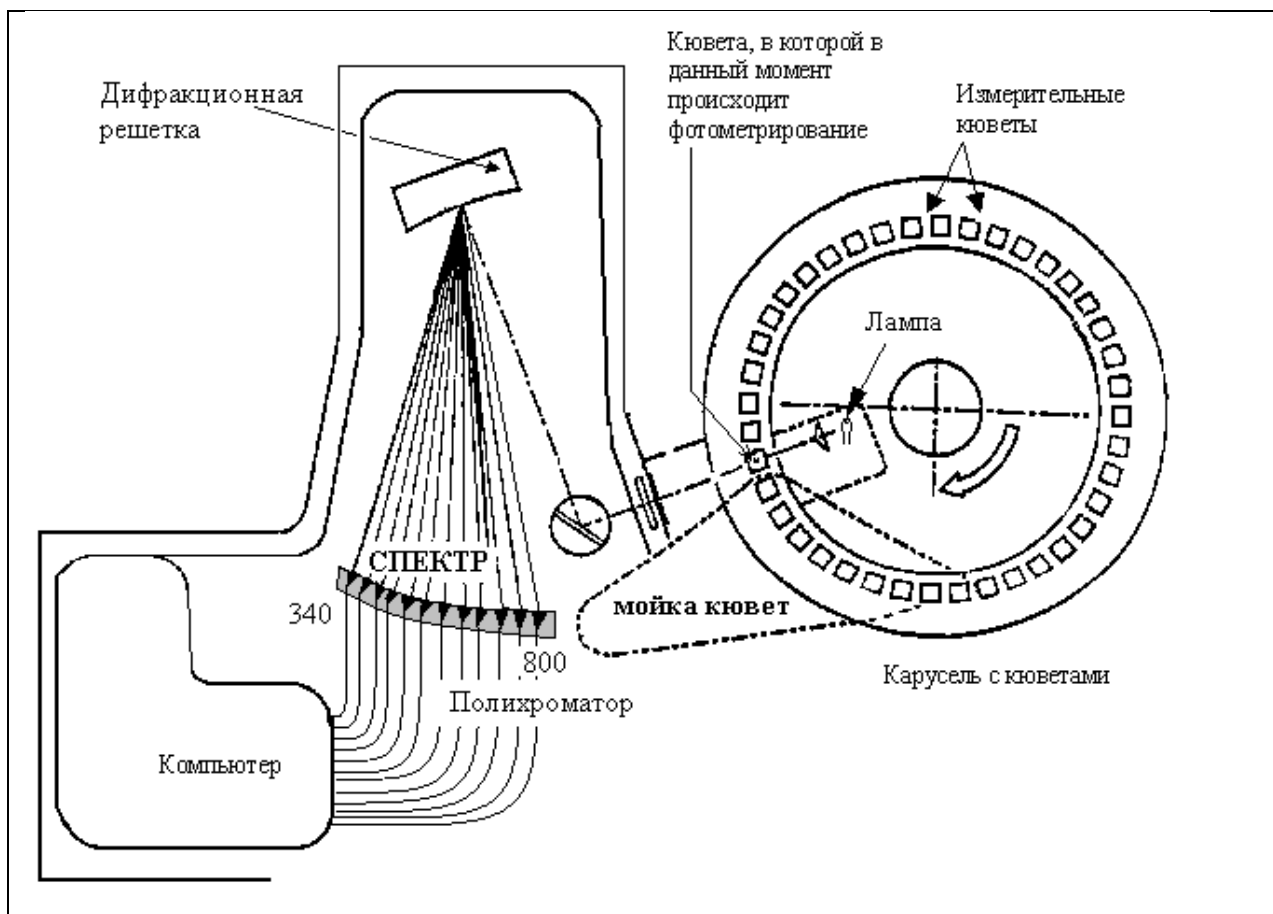


Рис. 2.2. Принципиальная схема основных узлов фотометрического блока биохимического анализатора. Использование одновременно 12 фотодиодов, регистрирующих одновременно сигналы разных частей спектра, является основным компонентом полихроматора

Компьютер анализирует результаты измерений, представляет результаты в конечном виде, кроме того, компьютер через соответствующие датчики контролирует работу практически всех узлов анализатора.

Таким образом, в биохимических анализаторах измеряются многократно многочисленные кюветы с пробами по нескольким спектральным характеристикам, а компьютер по заданной программе выбирает необходимые сигналы и на основе их анализа рассчитывает концентрацию или активность аналитов.

Фотометрические методы определения аналитов. Измерение по калибровочной кривой

Для построения калибровочных графиков используют несколько концентраций определяемого вещества, изготовленного в качестве

калибратора с разным уровнем концентрации, определенной точным референтным методом. На оси абсцисс откладывается концентрация, а на оси ординат – абсорбция. Если закон светопоглощения соблюдается, график будет иметь вид прямой линии, проходящей через нулевую точку (рис. 2.3, график А).

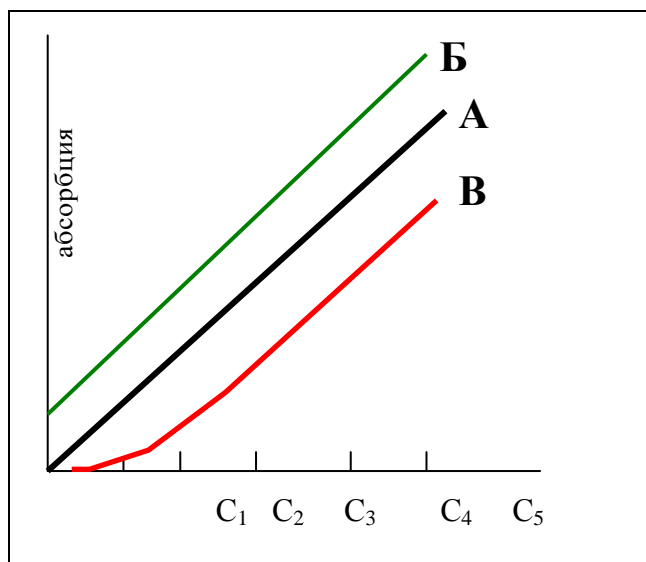


Рис. 2.3. Варианты при построении калибровочного графика при линейной зависимости экстинкции от концентрации исследуемого вещества:

А – закон Бугера-Ламберта-Бера соблюдается, прямая выходит из нулевой точки, правильный вариант калибровочного графика

Б – имеет место влияние систематического фактора, желательно измерение по сравнению с холостой пробой, в которой бы этот фактор учитывался.

В – измерение неверное, низкие концентрации вещества не измеряются

Возможны варианты при построении калибровочного графика. Если получается график Б (см. рис. 2.3), то использовать его можно, но имеется систематический сдвиг, который необходимо учитывать при расчете фактора. Если получается график В, то пользоваться им нельзя, так как не определяются по этому графику низкие концентрации калибратора. Расчеты по калибровочным графикам обычно используют для методов, при которых имеются стабильные результаты изо дня в день (гемоглобин, общий белок). При работе на современных анализаторах оператору фактически приходится проводить калибровку каждый день, при этом построение и использование

графиков осуществляется автоматически. Для каждого прибора необходимо проводить свою калибровку.

Метод сравнения стандартного и опытного образца. Этот метод определения концентрации является наиболее приемлемым, так как анализируемая и калибровочная пробы обрабатываются в одинаковых условиях. Поэтому при больших сериях исследований калибровочную пробу рекомендуют исследовать в начале серии и примерно через каждые 20 анализируемых проб, определяя отношение c_{cm} / A_{cm} или фактор (F).

Расчет по стандарту обозначается в том случае, если используется уравнение $c_i = A_i \cdot c_{cm} / A_{cm}$

Расчет по фактору – это тот случай, когда используется уравнение $c = A \cdot F$.

Следует помнить, что в опытной и стандартной пробах должно обрабатываться одинаковый объем образца. Данный метод расчета справедлив только на линейном диапазоне зависимости абсорбции от концентрации.

Измерение по конечной точке (end point method). Реакция, сопровождающаяся изменением фотометрического сигнала, развивается за некоторый период времени и достигает определенного конечного состояния, так называемой конечной точки. Изменение сигнала как функция времени представлено на рис. 2.4. При измерении по конечной точке уровень сигнала соответствует количеству продуктов реакции в инкубационной среде после фиксированного времени инкубации. Абсорбция измеряется после окончания реакции при стабильном значении сигнала.

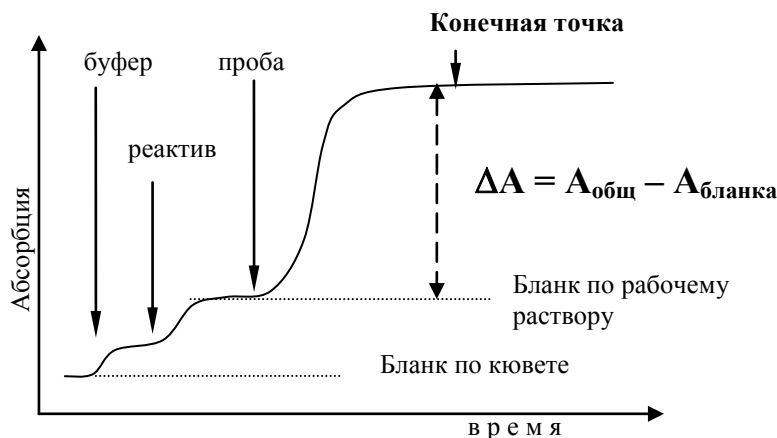


Рис. 2.4. Измерение по конечной точке. Стрелками показаны моменты внесения буфера, реактива и биологической пробы, в качестве которой может быть сыворотка, плазма, моча и другая биологическая жидкость

Для исключения систематического влияния на результаты измерения внешних факторов (вне пробы), в частности буфера, реактива используют схему с измерением бланка. Как правило, бланк определяется по готовому к употреблению реактиву. Абсорбция пробы ($A_{\text{пробы}}$) рассчитывается по соотношению $A_{\text{пробы}} = A_{\text{конечной точки}} - A_{\text{бланка}}$

При измерении по конечной точке с бланком рекомендуется составлять рабочую таблицу. Примером может служить табл. 2.1, составленная для определения аналита с использованием стандартного раствора.

Измерение скорости изменения абсорбции. В клинической биохимии фотометрические измерения в большинстве случаев проводятся непосредственно при протекании биохимических реакций, в процессе которых потребляются субстраты, повышаются продукты реакций или меняются ко-факторы реакций.

Тест Варбурга (УФ-тест) является одним из самых распространенным оптических тестов. Тест Варбурга основан на том, что один из продуктов дегидрогеназной реакции – восстановленная форма никотинамидадениндинуклеотид или его фосфат (НАДН или НАДФН) – имеет максимум поглощения при длине волны 340 нм, а их окисленные формы при этой длине волны практически не поглощают (рис. 2.5). УФ-тест

может быть использован для определения скоростей тех реакций, в которых не участвуют НАД или НАДФ, но образующиеся продукты в сопряженных ферментативных реакциях приводят к окислению НАДН или восстановлению НАД (непрямой оптический тест Варбурга).

Таблица 2.1

Рабочая таблица для определения концентрации аналита методом измерения с бланком по рабочему реактиву

	Бланк	Стандарт	Проба
Рабочий раствор	1 мл	1 мл	1 мл
Дистиллированная вода	10 мкл	–	–
Стандарт	–	10 мкл	–
Проба	–	–	10 мкл
Перемешать, измерить оптическую плотность через 5 мин инкубации			
Содержание аналита в пробе ($C_{пробы}$) рассчитывается по соотношению			
$C_{пробы} = \frac{A_{пробы} - A_{бланка}}{A_{стандарта} - A_{бланка}}$			

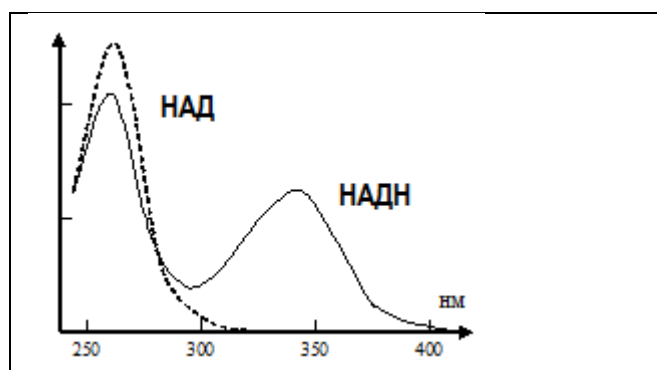


Рис. 2.5. Спектры поглощения НАД⁺ и НАД·Н. Восстановление НАД⁺ до НАД·Н прослеживается при 340 нм – при этой длине волны имеется максимум поглощения НАД·Н, а НАД⁺ не поглощает свет

При кинетическом определении вычисляют изменение экстинкции за 1 мин и рассчитывают активность по формуле: $A = \frac{V \times 1000}{\varepsilon \times l \times v} \times \frac{\Delta E}{мин}$, где А – активность фермента, измеряемая в международных единицах (МЕ или Ед или U), определяется как количество фермента, которое катализирует превращение 1 микромоля (мкмоль) субстрата в 1 минуту. Каталитическая

активность фермента выражается числом единиц, рассчитанных для 1 литра биологической жидкости (Ед/л).

V – объем реакционной смеси, мл;

1000 – коэффициент перерасчета на 1 л сыворотки;

ε – коэффициент миллимолярной экстинкции НАДН в реакции 6,22 л/(ммоль \times см);

l – длина оптического пути (1 см);

v – объем пробы (сыворотки крови или другого материала), мл;

ΔE – изменение экстинкции за 1 мин.

Результат арифметических вычислений для первой дроби формулы является фактором (F). Значение фактора вводится в программу фотометра или биохимического анализатора, в результате активность фермента рассчитывают следующим образом: $A = F \times \Delta E / \text{мин}$. При определении активности ферментов с использованием диагностических наборов известен используемый хромоген (следовательно, известен его коэффициент молярной экстинкции), установлены объем реакционной среды и объем образца, измерение проводится в кювете с длиной оптического пути 1 см. Поэтому расчет активности фермента проводится по фактору (F), умноженному на $\Delta E/\text{мин}$. Фактор приводится в инструкциях для разных температур инкубации. В современных программируемых фотометрах и биохимических анализаторах все расчеты программируются, и результаты получаются в конечном виде.

Иммунохимические фотометрические методы анализа.

Иммунохимические методы исследования – это совокупность диагностических методов, основанных на специфическом взаимодействии антигенов и антител с образованием иммунных комплексов. Ключевым принципом иммунохимических методов является участие на разных стадиях проведения лабораторного анализа иммуноглобулинов (моно- и поликлональных антител) и антигенов, входящих в состав тест-систем для

лабораторных исследований. Один из компонентов реакционной смеси является определяемым веществом (образец), другой (компонент иммунной системы, находящийся в составе реагентов) обладает специфичностью по отношению к определяемому веществу и является узнающим. На протекание иммунохимических реакций влияют общие неспецифические условия (лабораторная посуда, качество воды), специфические для данной системы характеристики (свойства и размер антигена, класс антител), а также условия проведения теста и качество реагентов (среда реакции, состав реагентов, рН, температура), характер связи специальной метки с образовавшимся иммунным комплексом. Современные иммунохимические методы способны в процессе анализа выявлять как один аналит (определять один показатель), так и несколько диагностических показателей (мультиплексный анализ).

В зависимости от механизма проведения и учета результатов реакции образования иммунных комплексов, иммунохимические методы исследования подразделяют:

- Методы без использования специальных меток для выявления результата. К иммунохимическим методам без использования специальных меток относят методы турбидиметрии и нефелометрии.

- Иммунохимические методы с применением специальных меток для выявления результата. Благодаря высокой чувствительности и специфичности, эти методы широко применяются в клинической лабораторной диагностике. В зависимости от типа метки выделяют: иммуноферментный анализ (ИФА), иммунофлюоресценцию (ИФЛ), иммунохемилюминисценцию (ИХЛ), радиоиммунный анализ (РИА).

Турбидиметрия и нефелометрия. Если поместить мутный раствор в кювету фотометрического прибора, то световой поток, проходя через кювету, будет поглощаться, частично проходить через кювету, не изменяя направления (трансмиссия), частично рассеиваться, отклоняясь под разными углами. Трансмиссия и рассеивание света зависят от длины волны светового потока, его частоты, интенсивности, а также от свойства рассеивающей

среды: размера частиц, их формы, количества, способности к поляризации. Если в процессе измерения размер частиц в растворе будет меняться (например, в результате взаимодействия антиген-антитело), то будет соответственно меняться поток проходящего и интенсивность рассеянного света. Методы турбидиметрии и нефелометрии можно автоматизировать, что делает возможным получение результата анализа в течение нескольких минут.

Нефелометрия и турбидиметрия – методы количественного иммунохимического анализа, основанные на измерении интенсивности света, рассеянного дисперсной системой (I_r) (нефелометрия) или прошедшего через нее (турбидиметрия) (I_t) (рис. 2.6).

Турбидиметрия – измерение прошедшего через кювету потока светового пучка. В качестве турбидиметра можно использовать большинство фотометров и биохимических анализаторов, в которых имеется возможность построения нелинейной калибровочной кривой. Закон Бугера-Ламберта – Бера для прошедшего потока записывается: $I_t = I_o \times 10^{-tC}$, где t – молярный коэффициент мутности раствора или турбидиметрия, I_o – интенсивность падающего на кювету света, C – концентрация исследуемого вещества.

Таким образом, интенсивность пучка (плотность потока) параллельных лучей света при прохождении через кювету меняется по экспоненциальному закону.

Турбидиметрия применяется для анализа взвесей, суспензий и других мутных сред. В клинко-лабораторной практике используют иммунотурбидиметрические исследования, основанные на регистрации образования иммунных комплексов антиген-антитело, сопровождающихся образованием соответствующего преципитата, для повышения мутности применяют латексные частицы, на которые сорбируют антитела.

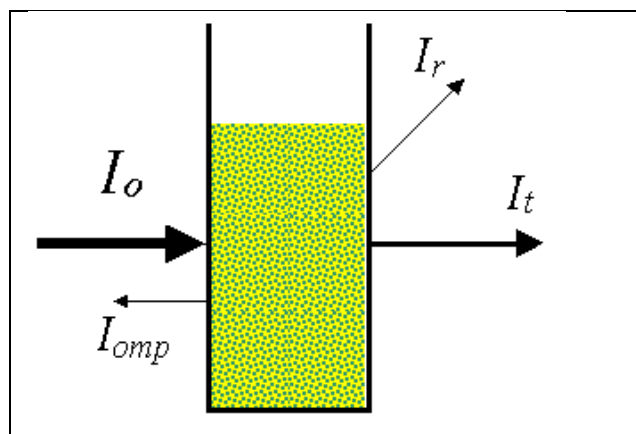


Рис. 2.6. Схема нефелометрии и турбидиметрии. Турбидиметрия – измерение прошедшего светового потока через мутный раствор (I_t), нефелометрия – измерение рассеянного света, которое может регистрироваться под разными углами (I_r)

Особенностью турбидиметрических определений является построение калибровочного графика с использованием не менее пяти концентраций, так как калибровочный график имеет нелинейный характер. Калибровочный график (стандартная кривая, рис. 2.7) строится для каждого аналита, для каждого прибора, при любом изменении условий регистрации и периодически по мере проведения исследований. При серийных исследованиях в стандартных условиях допускается корректировка кривой на основании измерения одного из стандартов. Это основано на наблюдении о том, что характерный вид стандартной кривой не меняется из-за влияния систематических факторов, а происходит параллельный сдвиг всей кривой. В этих случаях производят пересчет кривой, так, чтобы она шла параллельно первичной кривой, но проходила бы через новую точку. Для построения стандартной кривой используются стандарты, которые поставляются в составе соответствующего тест-набора.

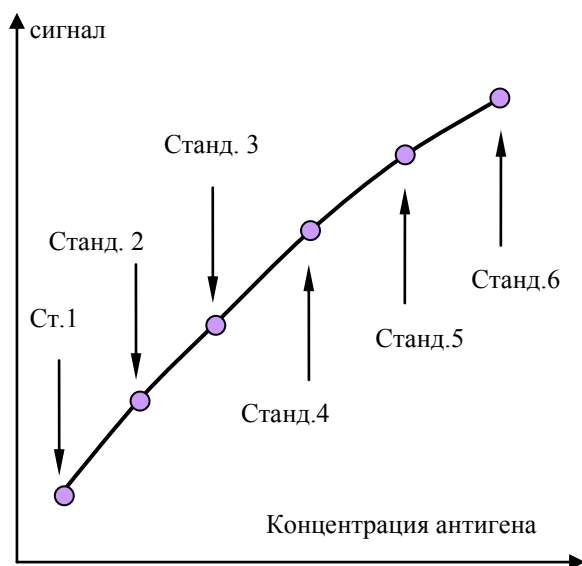


Рис. 2.7. Стандартная кривая, характерная для определения индивидуальных белков турбидиметрическим и нефелометрическим методами. Для построения кривой требуется по крайней мере 5 стандартных растворов антигена

Нефелометрия – измерение рассеянного света, позволяющее определять характер и концентрацию рассеивающих частиц. Нефелометр – прибор, измеряющий рассеянный свет. На рис. 2.8 представлена принципиальная схема нефелометра. Измерение светорассеивания под разными углами (как правило, используются измерение малоуглового рассеивания) дает информацию о размерах частиц в растворе. Если известны размеры частиц рассеивающего вещества, то возможно по интенсивности рассеянного света при фиксированном угле измерения определить концентрацию вещества. Методы, основанные на взаимодействии антиген-антитело, высокоспецифичны, поэтому практически во всех случаях известно, что измеряется. Исходя из этого, приборы для нефелометрии программируются под измерение определенных специфических компонентов биологической жидкости, интенсивность рассеянного света этом случае отражает количество (концентрацию) исследуемого антигена. В нефелометрах часто используют лазерные источники излучения. Лазер имеет высокую интенсивность излучения, строгую направленность излучения и

фиксированную длину волны, поэтому когерентная природа лазерного луча делает его идеальным для нефелометрических измерений.

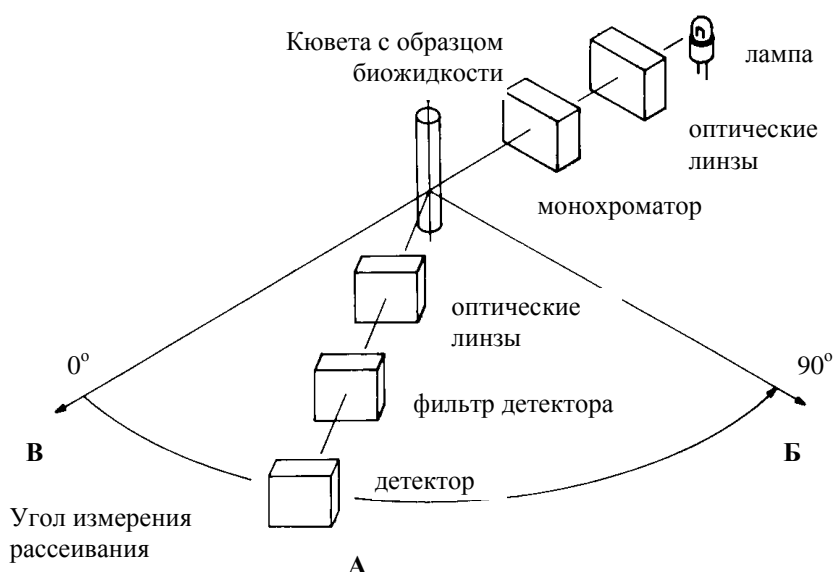


Рис. 2.8. Принципиальная схема нефелометра. А – нефелометр, регистрирующий малоугловое рассеивание, Б – нефелометр, регистрирующий рассеивание под углом 90° , В – турбидиметр

Иммуноферментный анализ. Иммуноферментный анализ (ИФА) – один из наиболее надежных видов иммунохимического анализа, высокочувствительный, экономически выгодный метод, применяемый для качественного и количественного анализа антител и антигенов. Для выявления образующегося комплекса антигена и антител используют в качестве метки фермент или фермент-зависимое вещество. Метод характеризуется относительной простотой проведения реакции, возможностью приборного учета результатов и автоматизации всех этапов анализа. В основе метода ИФА лежит оценка результатов иммунной реакции антигена с антителом. Полученный комплекс определяется следующим образом: в реакционную смесь вводится конъюгат, который включает ферментную метку, а также добавляют специальный хромогенный субстрат. Фермент, взаимодействуя с субстратом, изменяет его окраску. Учет

результатов проводят фотометрически. Существует несколько модификаций метода ИФА

Гетерогенный (твердофазный) ИФА в микропланшетном формате получил наибольшее распространение в тест-системах для лабораторных исследований. В качестве твердой фазы используется поверхность лунок полистиролового планшета, на которую адсорбированы входящие в состав тест-системы известные антигены или антитела (*иммуносорбент*). В ходе специфической реакции иммуносорбента с определяемыми в исследуемом образце антителами (АТ) или антигенами (АГ) образуются иммунные комплексы, которые оказываются фиксированными на твердой фазе. Субстанции, не участвующие в реакции, и избыточное количество реагентов удаляются при многократной промывке. По механизму реакции среди гетерогенных методов различают конкурентный и неконкурентный.

Непрямой неконкурентный гетерогенный ИФА представлен несколькими этапами (рис. 2.9):

1. На твердой поверхности пластиковой лунки сорбирован антиген (АГ). В лунку вносится исследуемый биологический материал, чаще всего сыворотка крови пациента.

2. Исследуемые антитела (АТ) во время инкубации связываются с антигеном, сорбированным на планшете. Несвязавшиеся белки удаляют отмыванием.

3. В лунку вносят конъюгат – то есть АТ с заранее прикрепленным к ним ферментом, например пероксидазой, способные связаться с АТ человека, закрепившимися на иммуносорбенте. Если в ячейке имеются образовавшиеся на первой стадии процесса иммунные комплексы, то конъюгат соединяется с определяемыми антителами во время второй инкубации. Несвязавшийся конъюгат остается в жидкой фазе и удаляется отмыванием.

4. В лунку добавляется субстратно-хромогенный реагент, который под влиянием фермента конъюгата, связавшегося с иммунными комплексами, превращается в окрашенный продукт реакции.



Рис. 2.9. Этапы неконкурентного ИФА

«Сэндвич» – разновидность *неконкурентного* гетерогенного ИФА; метод широко используется для определения АТ и АГ (рис. 2.10):

1. На твердой поверхности пластиковой лунки сорбированы антитела (АТ). В лунку вносится исследуемый биологический материал, чаще всего сыворотка или плазма крови больного.

2. Исследуемые антигены (АГ) в ходе инкубации связываются с АТ, сорбированными на планшете. Несвязавшиеся компоненты удаляют отмыванием.

3. В лунку вносят конъюгат, который представляет собой антитела, меченые ферментом. Если в ячейке имеются образовавшиеся на первой стадии процесса иммунные комплексы, то конъюгат соединяется с определяемыми антигенами и образуется тройной комплекс – «сэндвич». Несвязавшаяся часть конъюгата остается в жидкой фазе и удаляется отмыванием.

4. В лунку добавляется субстратно-хромогенный реагент, который под влиянием фермента конъюгата превращается в окрашенный продукт реакции.

Количество тестируемых антигенов оценивают по содержанию окрашенного продукта реакции, строят калибровочную зависимость и проводят определение концентрации тестируемых антигенов в образцах пациентов. Концентрация определяемого вещества *прямо пропорциональна* интенсивности окраски пробы и, следовательно, оптической плотности.

По аналогичной схеме работают тест-системы для определения АТ, но в качестве иммуносорбента в них используются АГ, а конъюгат содержит раствор АГ, меченых ферментом.

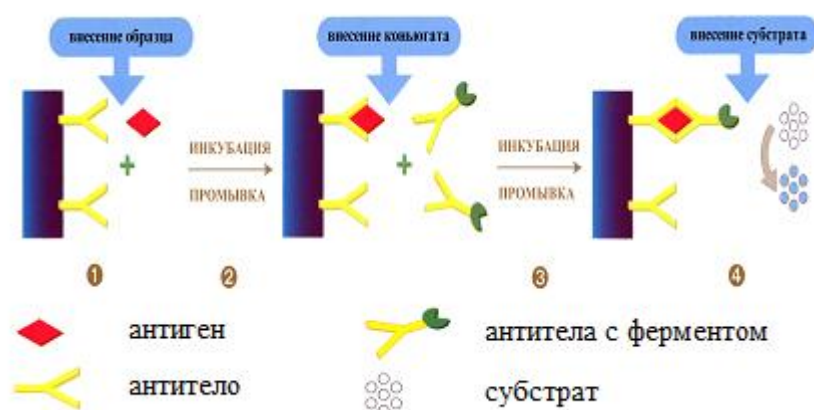


Рис. 2.10. «Сэндвич». Последовательность анализа

Тест-системы с использованием стрептавидина и биотинилированных моноклональных антител получили распространение для усиления аналитических характеристик тест-систем. В этом случае стандарты, контроли и пробы пациентов сначала добавляются в микроячейки, покрытые стрептавидином. Затем добавляют биотинилированные АТ (это смесь высокоочищенных специфичных моноклональных АТ к различным эпитопам), фермент-меченые АТ (конъюгат), и реагенты перемешиваются. Результатом реакции между различными антителами и определяемым антигеном становится образование «сэндвич»-комплекса, который

связывается со стрептавидином в ячейках. Несвязавшиеся компоненты удаляются промывкой. Особенностью таких систем является отдаление ферментной реакции от стенки планшета, поэтому окраска развивается в объеме и тест-система аналитически становится более чувствительной.

Конкурентный гетерогенный иммуноферментный анализ схематично представлен на рис. 2.11. В этом случае определяемые АГ или АТ пациента конкурируют с аналогичными мечеными АГ или АТ конъюгата за места связывания с иммуносорбентом.

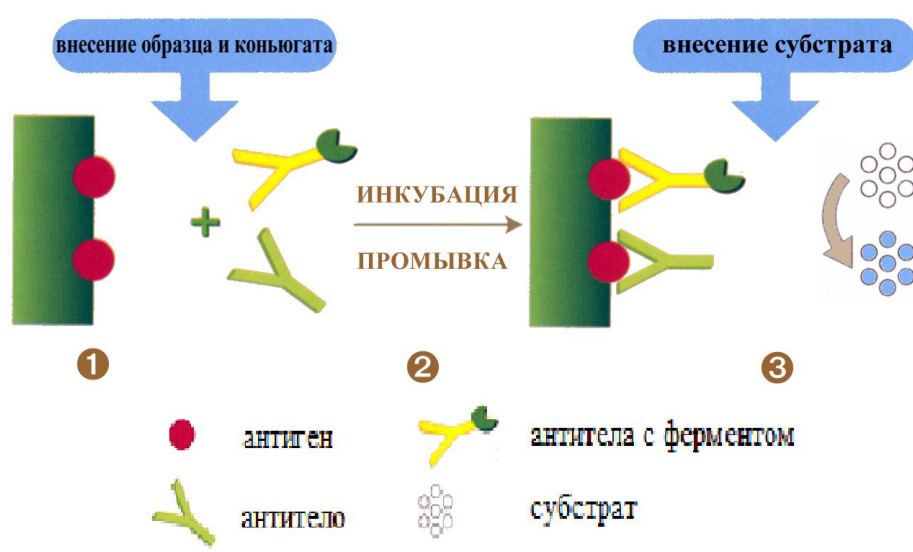


Рис. 2.11. Конкурентный иммуноанализ

Последовательность анализа:

1. На поверхности планшета сорбированы АГ. В лунку вносят исследуемую сыворотку или плазму пациента и конъюгат, который представляет собой антитела, меченые ферментом..

2. В ходе инкубации АТ пациента конкурируют с мечеными АТ конъюгата за места связывания с иммуносорбентом, в результате образуются иммунные комплексы двух видов: содержащие ферментную метку (меченые) и без нее (немеченые). Чем больше определяемых антител содержит образец пациента, тем меньше образуется меченых иммунных комплексов. Несвязавшийся конъюгат остается в жидкой фазе и удаляется отмыванием.

3. В лунку добавляется бесцветный субстратно-хромогенный реагент, который под влиянием фермента превращается в окрашенный продукт реакции. При конкурентном варианте концентрация определяемого вещества *обратно пропорциональна* оптической плотности. Анализ этого типа часто используют для определения антигенов, присутствующих в высоких концентрациях, или гормонов, которые имеют только один антигенсвязывающий центр.

Качественный анализ часто используется при проведении скрининговых исследований и диагностике инфекционных заболеваний. Как правило, для диагностики инфекций используются два вида серологических реакций:

1. Обнаружение патоген-специфических антител в сыворотке крови обследуемого;

Установление родовой и видовой принадлежности микроорганизма или вируса. В этом случае неизвестным компонентом реакции является антиген. Такое исследование требует постановки реакции с заведомо известными иммунными сыворотками.

Люминесценция. Люминесценция – это излучение света молекулами. В процессе люминесценции происходит отдача энергии. Примером природной люминесценции является свечение термофильных растений вблизи гейзеров. Люминесценция может происходить при передаче энергии в различных процессах. В медицинской лабораторной практике наиболее широко нашло применение флуоресценция – свечение после облучения ультрафиолетовым или видимым светом, и хемилюминесценция – излучение в результате химической реакции.

Флюоресценция получила свое название от природного минерала – флюорита CaF_2 , у которого впервые наблюдалось этот тип свечения. Различают ***фосфоресценцию*** – свечение, продолжающееся относительно долго после прекращения воздействия, и ***флюоресценцию*** – свечение, происходящее только во время воздействия. Возбуждение происходит при большей энергии, то есть при меньшей длине волны, чем вторичное

свечение. Поэтому при флюоресценции длина волны свечения больше, чем длина волны возбуждения. В аналитических целях в тест-системах в качестве меток при проведении флюоресцентного анализа часто используются флюорофоры. В клинической лабораторной диагностике широко применяются различные модификации метода иммунофлюоресценции.

Иммунохемилюминисценция. Хемилюминесценция – испускание света молекулами, перешедшими в возбужденное состояние в результате химической реакции. Чаще всего данное явление наблюдается при окислении органических веществ перекисью водорода, гипохлоритом, молекулярным кислородом. В ***люминометрах*** характерной особенностью является отсутствие источника света, свечение образца индуцируется химической реакцией.

Принцип хемилюминесцентной детекции реализуется в вариантах методик иммунохимических исследований. Хемилюминесцентная детекция обладает высокой специфичностью, не требует длительных инкубаций или добавления стоп реагента, не использует дополнительные источники света. Хемилюминесценция в настоящее время активно используется в КДЛ и научной практике для обнаружения минимальных количеств аналитов в биопробах. В состав реакционной смеси при реакции иммунохемилюминесценции (ИХЛ) входят: меченые антитела или антигены и смесь: хемилюминесцентный субстрат, перекись водорода и усилители реакции. В качестве последних применяются ароматические амины, нафтолы, фенолы. Иммунохимические анализаторы, разработанные для регистрации ИХЛ, обладают высокой производительностью и способностью проводить анализ в автоматическом режиме. К несомненным достоинствам иммунохемилюминесцентного метода относятся:

- Высокая автоматизация и стандартизация аналитического процесса.
- Высокая аналитическая чувствительность и специфичность.
- Длительная стабильность реагентов.
- Возможность исследования единичных проб.

Сравнительная характеристика фотометрических методов. В клинической химии достаточно часто встает вопрос о выборе технологии для определения той или иной группы аналитов. Например, определение гормонов можно проводить методом абсорбционной фотометрии по технологии ИФА-анализа, можно турбидиметрией и нефелометрией, можно воспользоваться технологиями, основанными на использовании флюоресцентной или люминесцентной метки. Основным недостатком абсорбционной фотометрии является относительно узкий линейный диапазон измерения результатов. Даже лучшие фотометры позволяют регистрировать изменения аналитов (гормонов) не более, чем в пределах 4 десятичных порядков. Флюоресцентные и люминесцентные технологии увеличивают линейный диапазон до 6-8 десятичных порядков, то есть позволяют работать без разведения. В табл. 2.2 представлены сравнительные данные о чувствительности фотометрических, флуоресцентных и люминесцентных методов определения гормонов (и других аналитов). Флуоресцентные и люминесцентные технологии позволяют существенно увеличить чувствительность определения веществ в биопробах, однако они используются, как правило, в закрытых технологиях, включающих прибор-реактивы-калибраторы-контрольные материалы.

Аналитические характеристики, такие как линейный диапазон и чувствительность, определили, что методы абсорбционной фотометрии, реализованные на биохимических анализаторах, применяются в основном как скрининговые диагностические технологии, выявляющие системную патологию. Иммунохимические методы, основанные на специфическом взаимодействии антитело-антиген, используются для выявления или количественного определения конкретных маркеров, которые могут указать на наличие определенного заболевания или патологии. Качественные иммунохимические методы, реализованные технологией ИФА-анализа, чаще применяются при диагностике инфекционных заболеваний, при котором важен ответ на вопрос «есть или нет» заражение, «есть или нет» иммунитет к

конкретному инфекционному агенту. Количественные иммунохимические методы используются для определения концентрации индивидуальных молекул, что позволяет оценить степень патологии, следить за эффективностью терапии, констатировать излечение. В случаях повышения метки, характеризующей патологию, эффективны менее чувствительные иммунохимические технологии: иммунотурбидиметрия, нефелометрия. Если же количество метки снижается или требуется получить воспроизводимый результат в отдаленный период, то предпочтительно использовать иммунохемилюминесцентные технологии.

Таблица 2.2

Сопоставление методов применительно к гормональным исследованиям

Метод детекции	Чувствительность (моль/л)	Преимущества метода	Недостатки метода
ИФА плащечная технология	10^{-9} - 10^{-6}	«Открытость» системы, возможность получения массового результата	Концентрация ряда гормонов ниже чувствительности системы
ИФА пробирочная технология	10^{-9} - 10^{-6}	Возможность быстрого получения результата (1 анализ)	Ограничен спектр, закрытая система
Нефелометрия Турбидиметрия	10^{-6} - 10^{-12}	Возможность проведения анализа в б/х пробе	Узкий спектр показателей
Флюоресценция с генерацией сигнала	10^{-16} - 10^{-9}	Позволяет проводить измерения в широком диапазоне концентраций	Закрытые технологии, ограничен спектр показателей
Люминесценция с генерацией света	10^{-16} - 10^{-10}	Измерения в широком диапазоне концентраций, включая минимальные	Закрытые технологии, ограничен спектр показателей

Микроскопические методы. Световые микроскопы.

Микроскопическое исследование – один из наиболее используемых методов в лабораторной гематологии, цитологии, общеклинических исследованиях. С помощью микроскопов объекты исследования размером от 0,5 мкм с разрешением элементов до 0,1 мкм могут быть увеличены более чем в 1500 раз. Световые микроскопы делятся на микроскопы плоского поля (двухмерное изображение) и стереоскопические (объемное изображение). И

те и другие подразделяются на микроскопы проходящего света микроскопы отраженного света. Микроскопы проходящего света плоского поля в отечественной практике называют биологическими.

К основным параметрам микроскопа относятся: увеличение, разрешающая способность, линейное поле на предмете, степень исправления аберраций.

Увеличение микроскопа зависит от увеличения объектива, окуляра, промежуточных насадок. Например, в отечественном микроскопе Микмед 1 монокулярная насадка не имеет увеличения, поэтому общее увеличение с объективом $100\times$ и окуляром $10\times$ будет равно $1000\times$. Апертура объектива – это максимальный угол, под которым лучи, идущие от препарата, могут попадать в объектив. Числовая апертура определяет ряд важнейших свойств микроскопа: яркость изображения, глубину резкого видения, степень сходства изображения с предметом. Увеличение числовой апертуры повышает способность объектива воспроизводить мелкие детали объекта. Объективы проходящего света, работающие в воздухе (сухие системы) имеют числовую апертуру не выше 0,95. Иммерсионные объективы имеют числовую апертуру до 1,45. Числовая апертура объективов маркируется на корпусе, например, надпись « $40\times/0,95$ » означает, что объектив с увеличением $40\times$ и числовой апертурой 0,95.

Полезное увеличение микроскопа должно быть не более 1000 числовых апертур объектива и не менее 500. Более высокое увеличение или меньше меньшего не выявляет новых деталей объекта в изображении. Например, для объектива $100\times$ с числовой апертурой 1,25 полезное увеличение микроскопа лежит диапазоне $626-1250\times$. При большем увеличении изображение становится нечетким и малоконтрастным, с пониженной разрешающей способностью. При меньшем увеличении изображение объекта, несмотря на четкость и повышенный контраст, становится настолько мелким, что элементы объекта практически неразличимы.

Разрешающая способность – это наименьшее расстояние между изображениями 2 соседних точек (линий), которые различаются как 2 отдельных изображения.

Поле на предмете рассчитывается с учетом линейного поля окуляра и увеличения объектива, а также дополнительных оптических элементов, которые умеют увеличение и расположены до окуляра внутри микроскопа. Так микроскоп Микмед 1 с объективом 100× и бинокулярной насадкой, дающее дополнительное увеличение 1,5× имеет размер линейного поля 0,12 мм.

Аберрация – это искажение или отступление в изображении объекта от идеального. Хроматические аберрации обусловлены различным преломлением света с разными длинами волн. При этом образуются в каждом цвете отдельные изображения, в результате изображение объекта имеет вид «слоеного пирога». Хроматические аберрации устраняются с помощью подбора марок стекол с учетом показателя преломления и дисперсии, технологии изготовления радиусов и других технологических приемов.

Особенности микроскопических методов при микробиологических (бактериоскопических), цитологических исследованиях.
Микроскопическое исследование с использованием люминесцентного микроскопа. Люминесцентные микроскопы проецируют на объект отраженный свет определенной длины волны, который заставляет часть объекта светиться на другой длине волны. Визуально изображение, сфокусированное люминесцентным микроскопом, представляет собой ярко светящиеся объекты на черном фоне. При микроскопии возможна визуальная оценка антигенных структур клеток и тканей, а также микроорганизмов. При этом происходит связывание специфически меченных флюорохромом антител с изучаемыми клеточными или тканевыми антигенами микропрепарата.

Варианты метода при учете результатов с помощью люминесцентного микроскопа в различных модификациях под разными названиями – реакция иммунофлюоресценции (РИФ), прямой иммунофлюоресцентный анализ (ПИФ), метод флуоресцентного анализа (МФА) — широко применяются в настоящее время.

Популярность РИФ объясняется экономичностью, наличием широкого спектра диагностических наборов и быстротой получения ответа. Чаще всего РИФ используют для быстрого обнаружения возбудителя в патологическом материале. В этом случае из исследуемого материала готовят мазок на предметном стекле, как для обычной микроскопии. Препарат фиксируют метиловым спиртом, ацетоном или другим химическим фиксатором, иногда входящим в состав диагностического набора. На поверхность фиксированного мазка наносят меченные флуоресцеинизотиоцианатом сыворотки или моноклональные антитела.

Выделяют прямую и непрямую иммунофлюоресценцию.

Прямой иммунофлюоресценцией тканевые антигены, инфекционные агенты или отложения сывороточных белков в тканях или клетках обнаруживаются с помощью меченных флуорохромами антисывороток или моноклональных антител. Прямая иммунофлюоресценция используется преимущественно для морфологических исследований биопсий ткани, цитологических и микробиологических исследований. В диагностике аутоиммунных заболеваний метод прямой иммунофлюоресценции используется для обнаружения отложений иммуноглобулинов и факторов комплемента в биопсиях кожи и почек.

Непрямая иммунофлюоресценция относится к тестам, в которых применяются для обнаружения антигенов флуоресцентномеченные антитела. Криосрезы ткани, клетки или микроорганизмы используются как «субстрат», с которым связываются меченные аутоантитела. В результате с помощью люминесцентного микроскопа можно описать разные типы свечения. Так антиядерные антитела могут быть направлены как к антигенам

нуклеохроматина, который диффузно распределен в ядре, так и к компонентам ядрышка. Для того чтобы различить эти варианты выявления антинуклеарных антител, наряду с титром антинуклеарного фактора, описывается «тип свечения» ядра клетки. Типы свечения могут быть описаны при выявлении антинейтрофильных антител, антикератиновых антител, антимитохондриальных антител и многих других. Несомненным преимуществом непрямой иммунофлуоресценции является возможность оценки одновременного связывания аутоантител со всем разнообразием антигенов, которое имеется в тканевом субстрате. Это делает иммунофлуоресценцию удобной для скринингового использования и обуславливает большое значение этого метода в аутоиммунной диагностике. Возможно проведение всех стадий иммунофлуоресцентного анализа в полностью автоматическом режиме. Встроенная в микроскоп камера делает снимки высокого разрешения и автоматически сохраняет их в базе данных. Предварительная оценка результатов (положительный или отрицательный) происходит автоматически.

Инвертированные микроскопы. По расположению объектива относительно препарата и источника света микроскопы бывают прямые и инвертированные. Инвертированные микроскопы проходящего света представляют собой «перевернутую» конструкцию обычного микроскопа : осветитель проходящего света расположен над объективом и имеет большое рабочее расстояние, тем самым обеспечивается свободный доступ инструмента (манипулятора, иглы, пипетки) к препарату, который находится, например, в чашке Петри. При применении фазовоконтрастных устройств, конденсоров темного поля и косо́го освещения возможно наблюдение малоконтрастных препаратов.

Метод темного поля. Используют метод при исследовании малоконтрастных объектов, которые невозможно покрасить. Метод основан на эффекте, который достигается освещением объекта полым конусом света, внутренняя апертура которого превосходит числовую апертуру

применяемого объектива. Таким способом достигается эффект, что ни один прямой луч не попадает в объектив (темное поле). При наличии объекта будет наблюдаться яркое блестящее свечение контура вокруг объекта на темном фоне в отраженном свете. Метод применяется для наблюдения живых клеток. Микроорганизмов, прозрачных кристаллов и других элементов, когда достаточно наблюдать контур.

Метод фазового контраста. Метод позволят увидеть элементы внутренней структуры прозрачного объекта. Фазово-контрастное устройство дает возможность преобразовывать фазовые изменения световых волн, проходящих через объект, в амплитудные. В результате прозрачные объекты становятся видимыми.

Цитохимические исследования. Цитохимические методы представляют собой достаточно простые, воспроизводимые, не требующие сложной аппаратуры методики. Цитохимические исследования позволяют изучить ферментативную активность, содержание различных веществ в клетках крови, костного мозга, лимфатических узлов и других тканей, позволяют выявлять направленность дифференцировки кроветворных клеток. Цитохимические реакции выполняют на мазках, на предметных стеклах, применяя соответствующую фиксацию и докрашивание клеток. Оценка результатов в большинстве случаев ограничивается определением реакции – слабая, умеренная, интенсивная.

Основой идентификации клеток служат особенности метаболизма, специфичные для каждого типа клеток. Например, миелопероксидаза, являющаяся лизосомальным ферментом, локализуется преимущественно в специфических азурофильных гранулах в цитоплазме гранулоцитов и является маркером клеток миелоидного ряда. Липиды обнаруживаются практически во всех лейкоцитах, за исключением лимфоцитов. Однако основная масса липидов связана с клетками гранулоцитарного ряда. Определение неспецифической эстеразы используется для идентификации лейкозных моноцитарных предшественников. Определение активности

щелочной фосфатазы применяют для дифференцировки хронического миелолейкоза от других миелопролиферативных заболеваний и реактивных состояний. Окраска на кислую фосфатазу используется для выделения волосато-клеточного лейкоза из группы лимфолифолиферативных заболеваний.

Иммуноцитохимические исследования. Иммуноцитохимическими называют методы микроскопического выявления и идентификации молекулярных компонентов клеток, основанные на реакции антиген-антитела. Иммуноцитохимическое исследование – это комбинация цитологического и иммуноферментного методов. При постановке иммуноцитохимических методов требуется, прежде всего, так фиксировать исследуемый клеточный материал, чтобы в клетках сохранялась нативность выявляемых антигенов. Пероксидаза хрена в присутствии небольшого количества перекиси водорода катализирует окисление 3,3'-диаминобензидина с образованием нерастворимого золотисто-коричневого продукта. Если пероксидазу непосредственно или опосредованно присоединить к антителам, то эта реакция может происходить только там, где меченные ферментом антитела связались с антигеном. При микроскопии окрашенных препаратов на фоне обычной цитологической картины, например костного мозга, можно идентифицировать коричневый продукт ферментативной реакции, образовавшийся в местах связывания использованных антител с выявляемыми антигенами. Иммуноферментное маркирование можно осуществлять при помощи комплекса щелочная фосфатаза-антитела к щелочной фосфатазе. Конечный продукт ферментативной реакции имеет хорошо заметный красивый красный цвет.

Ионоселективный анализ. Ионоселективный анализ – один из наиболее широко используемых методов клинической биохимии. Он основан на использовании ионоселективных электродов, которые представляют собой электрохимические системы, формирующие потенциал в растворе электролита, зависящий от концентрации ионов. С помощью ионоселективных электродов

определяется активностью ионизированных молекул. Ионы, связанные с белками, другими анионами и находящиеся в комплексе, не регистрируются ионоселективными электродами, т.е. общая концентрация микроэлемента не регистрируется. Это важно, так как биологически активными являются именно ионизированные молекулы. В клинической биохимии широко определяемыми катионами являются H^+ (рН), K^+ , Na^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Li^+ и анион Cl^- .

Основным элементом ионоселективного электрода является мембрана, проницаемая только для определенного иона. Состав мембраны подбирается на производстве. В стеклянных электродах формируется кристаллическая решетка, ячейки которой чувствительны к тестируемому иону. В мембранных электродах в состав полимера вводится индуктор проводимости для соответствующего иона, который формирует каналы специфической проницаемости. В частности в мембрану для определения активности K^+ часто вводится валиномицин, Na^+ – нистатин. К достоинствам ионоселективных электродов относятся: возможность прямого измерения активности при контакте электрода с биологической жидкостью, портативность и минимальный объем биожидкости (микролитры), быстрый ответ, что позволяет использовать метод при неотложных состояниях.

Анализаторы ионоселективные измеряют активность ионов в сыворотке, плазме, цельной крови, диализатах, моче. Минимальный объем пробы 100 мкл. Как правило, диапазон измеряемых концентраций в сыворотке, плазме, цельной крови: K^+ 0,2-40,0 ммоль/л; Na^+ 20,0-200,0 ммоль/л; Ca^{2+} 0,10-6,00 ммоль/л; рН 6,0-8,0 ед. рН; Cl^- 25,0-200,0 ммоль/л. Разрешение: K^+ 0,01 ммоль/л; Na^+ 0,1 ммоль/л; Ca^{2+} 0,01 ммоль/л; рН 0,001 ед. рН; Cl^- 0,1 ммоль/л. Диапазон измерения и чувствительность вполне достаточны для измерения активности ионов в крови в норме и при патологии.

Анализ газов крови и гемоксиметрия. Газообмен в человеческом организме выполняет две основные функции:

1. Выведение из организма диоксида углерода, образующегося в результате катаболизма.

2. Обеспечение тканей и органов адекватным количеством кислорода, который является необходимым акцептором электронов цепи тканевого дыхания.

Кислород и CO_2 транспортируются между альвеолами и тканями в противоположных направлениях, и соответствующие парциальные давления этих газов в крови не всегда изменяются пропорционально. Этот факт объясняется следующим образом: во-первых, диоксид углерода обладает большей способностью к диффузии, чем кислород. Это приводит к тому, что, например, при интерстициальном отеке легких развивается нарушение диффузии кислорода в кровь, а следовательно и гипоксемия в то время как уровень $p\text{CO}_2$ сохраняется в норме. Во-вторых, кислород переносится от легких к тканям главным образом в связи с гемоглобином и очень небольшое количество O_2 находится в виде физически растворенного в крови. В артериальной крови гемоглобин практически полностью насыщен кислородом и гипервентиляция, таким образом, может приводить к выраженной гипокапнии, незначительно увеличивая при этом значения $p\text{O}_2$. Транспорт CO_2 обеспечивается за счет растворения в плазме и формирования бикарбонатной буферной системы и практически не связан с гемоглобином.

Концентрация углекислого газа в крови находится в большей зависимости от уровня вентиляции легких, чем содержание кислорода.

Транспорт диоксида углерода. Транспорт кровью, диффундирующего из тканей диоксида углерода, осуществляется в двух фазах: в плазме крови (внеклеточная фаза) и в эритроцитах (клеточная фаза). Как в плазме, так и в эритроцитах CO_2 транспортируется в основном в 2 транспортных формах: физически растворенный и в форме угольной кислоты и гидрокарбонат-аниона



Суммировать процессы, происходящие в эритроцитах, можно следующим образом: CO_2 , образующийся в тканях, поступает в эритроциты, где из него синтезируется угольная кислота, которая диссоциирует с образованием гидрокарбонат-иона и иона водорода. Ионы водорода связываются со свободным гемоглобином. Гидрокарбонат диффундирует из эритроцитов в плазму в обмен на анионы хлора. В легких идет обратная реакция. Восстановленный гемоглобин окисляется с образованием оксигемоглобина и ионов водорода, последние, связываясь с гидрокарбонатом, образуют угольную кислоту. H_2CO_3 диссоциирует с образованием диоксида углерода и воды. CO_2 диффундирует в альвеолы и выводится в окружающую среду.

Определение CO_2 . При анализе газов крови с диагностической целью измеряется парциальное давление газообразного CO_2 , растворенного в крови – $p\text{CO}_2$. Для этого используется $p\text{CO}_2$ -электрод, который состоит из стеклянного электрода для измерения pH, отделенного от исследуемого раствора мембраной, селективно проницаемой для диоксида углерода. Пространство между стеклянной мембраной и проницаемой для CO_2 мембраной заполнено раствором хлорида и гидрокарбоната натрия. Диоксид углерода, физически растворенный в пробе, диффундирует в электролитный раствор NaCl и NaHCO_3 , где происходит образование угольной кислоты и диссоциация ее с образованием протона. В результате изменение pH электролитного раствора находится в линейной зависимости от диффундирующего CO_2 и регистрируется стеклянным электродом. Линейность измерений для $p\text{CO}_2$ -электродов находится в диапазоне от 8 до 200 мм.Нг парциального давления диоксида углерода.

Транспорт кислорода. Как и диоксид углерода кислород в крови может находиться в двух фазах:

1. Растворенный в плазме крови (внеклеточная фаза);
2. Оксигемоглобин эритроцитов (клеточная фаза).

В 100 мл крови здорового человека, который дышит воздухом, содержится 0,3 мл растворенного кислорода, что несоизмеримо мало с потребностями организма. Количество потребляемого тканями кислорода в состоянии покоя составляет около 250 мл/мин.

Гемоглобин – это одно из наиболее значимых биохимических соединений. Он позволяет объему цельной крови связывать в 65 раз больше кислорода, чем такой же объем плазмы. Более того, связь кислорода с гемоглобином – обратима. График зависимости степени насыщения гемоглобина кислородом (HbO_2) от парциального давления кислорода в крови (PaO_2 , Hg), называемый кривой диссоциации оксигемоглобина, иллюстрирует процесс образования и диссоциации оксигемоглобина (рис. 2.12). Кривая, характеризующая эту зависимость, имеет S-образный вид. Степень насыщения гемоглобина ($s\text{O}_2$) кислородом определяется согласно формуле:

$$s\text{O}_2, \% = \frac{\text{количество } \text{O}_2, \text{ связанного с Hb}}{\text{кислородная емкость Hb}} \times 100$$

Кислородная емкость гемоглобина – максимальное количество кислорода, способного соединиться с Hb. 1 грамм гемоглобина теоретически может присоединить 1,39 мл O_2 . При $\text{PaO}_2 = 100$ мм Hg гемоглобин насыщен кислородом на 97,5%. Дальнейшее увеличение PaO_2 приводит к росту $s\text{O}_2$ лишь на 0,3%. Нижний сегмент кривой характеризует процесс диссоциации оксигемоглобина. При 40 мм Hg гемоглобин насыщен кислородом на 75%, а при PaO_2 10 мм Hg – только на 10%.

Измерение $p\text{O}_2$. Ключевым показателем при оценке метаболизма кислорода является парциальное его напряжение – $p\text{O}_2$. Этот показатель прослеживается при определении кислорода в воздухе, плазме крови, тканевой жидкости. Измеряется $p\text{O}_2$ амперометрически при помощи электрода Кларка. Он состоит из тонкой платиновой проволоки (катод, вплавленный в стеклянный цилиндр) и Ag/AgCl проволоки (анод, референтный), которые погружены в раствор фосфатного буфера и KCl. O_2

диффундирует через полупроницаемую мембрану в раствор электролита, где он восстанавливается на катоде. Сила образующегося при этом электрического тока пропорциональна величине pO_2 в исследуемом образце.

Параметр P_{50} характеризует сродство гемоглобина к кислороду. Эта величина определяет парциальное давление кислорода в крови, при котором происходит 50% насыщение гемоглобина кислородом. У человека при $37^\circ C$, pH крови = 7,4, $pCO_2 = 40$ мм Нг и $Hb = 150$ г/л, P_{50} составляет в среднем 26,8 мм Нг (3,6 кПа). Если сродство гемоглобина к кислороду увеличивается, то кривая диссоциации смещается влево и P_{50} уменьшается. При этом гемоглобин хорошо связывает кислород в легких, но плохо отдает его тканям. В случае уменьшения сродства гемоглобина кривая диссоциации смещается вправо, P_{50} увеличивается, при этом снижается способность гемоглобина связывать кислород в легких, но облегчается освобождение кислорода в тканях.

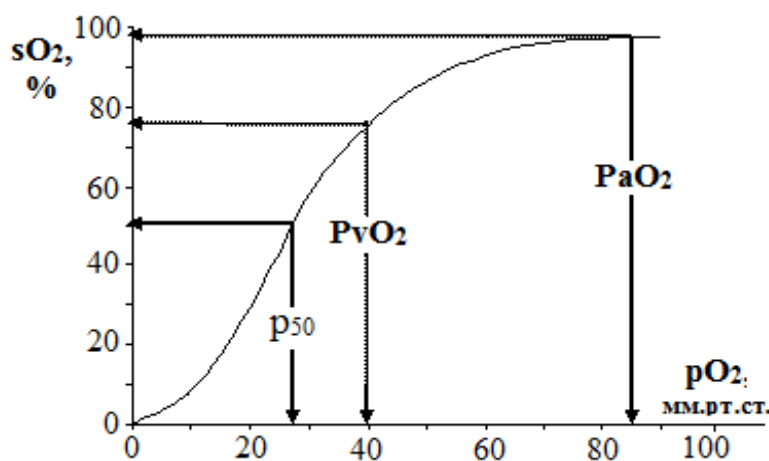


Рис. 2.12. Кривая диссоциации оксигемоглобина в норме

Молекулярно-генетические методы анализа. Молекулярная диагностика в лабораторных исследованиях занимается выявлением патологий, изучением их причин и механизмов развития на молекулярном уровне. Преимущество подхода заключается в том, что он дает возможность выявить склонность к тому или иному заболеванию задолго до его

клинических проявлений, вовремя принять профилактические меры, предотвратив его развитие или облегчив его течение, и, с учетом индивидуальных особенностей, применять терапию. Среди молекулярно-генетических технологий наиболее широко применяются в диагностической практике методы для выявления известных эндогенных и экзогенных ДНК последовательностей, которые можно разделить на два класса: гибридизационный анализ нуклеиновых кислот и амплификационные методы.

Гибридизационный анализ. В основе метода лежит способность нуклеиновых кислот к гибридизации – образованию двухцепочечных структур за счет взаимодействия комплементарных последовательностей нуклеотидов. Различают два типа гибридизационного анализа:

- методы гибридизационного анализа, проводимые в растворе (гомологичные);
- методы гибридизационного анализа, проводимые на твердом носителе (гетерогенные).

Последние получили более широкое распространение в связи с тем, что имеют большую аналитическую чувствительность и специфичность, являются более технологичными, их проще стандартизовать и автоматизировать.

Принцип метода основан на гибридизации зонда на твердой поверхности. В качестве твердой поверхности чаще всего используют полимерную нейлоновую мембрану. Анализ состоит из следующих стадий:

- пробоподготовка (выделение ДНК из образца);
- фиксация ДНК образца на мембране;
- гибридизация с ДНК-зондом, меченным флюорофором или ферментом;
- детекция результата.

В лабораторной практике применяется «сэндвич-технология». При этом подходе применяются 2 зонда, гомологичные различным участкам нуклеотидной цепи ДНК- или РНК-мишени. Один зонд фиксируют на мембране для того, чтобы связать искомую мишень, присутствующую в исследуемом образце. После осуществления гибридизации мембрану отмывают от исследуемого материала и добавляют раствор, содержащий второй зонд, который представляет собой конъюгат олигонуклеотида и какой-либо метки. Процесс гибридизации проводят повторно, при этом зонд с меткой взаимодействует с искомым участком ДНК (РНК). Детекция проводится в зависимости от природы метки ферментно-гибридизационным, радиографическим, автордиографическим, флюоресцентным или хемилюминесцентным методами. Преимущество этого подхода заключается в том, что практически сведены к минимуму подготовка клинического материала и очистка нуклеиновых кислот. В современных наборах реагентов, предлагаемых для диагностических исследований, применяется хемилюминесценция, которая обеспечивает чувствительную детекцию результатов гибридизации. Технология автоматизирована, время выполнения анализа составляет 2,5-3 ч.

По мере миниатюризации соответствующих носителей-подложек для гибридизации в практику вошли микрочипы (*microarrays*) с сотнями и тысячами ДНК-зондов для выявления практически любых известных генов, их вариантов и мутаций. Часто для гибридизации применяют не исходные нуклеиновые кислоты, а продукты амплификации целевых генов. Учет результатов гибридизации на биочипах осуществляется посредством оптических устройств, предлагаемых компанией-разработчиком.

Метод полимеразной цепной реакции. Полимеразная цепная реакция (ПЦР) – молекулярно-биологический метод исследования, получивший широкое распространение в современных лабораториях и используемый для диагностики инфекционных, наследственных и онкологических заболеваний, а также для исследования состава условнопатогенной флоры. Ценность

метода заключается в многократном копировании (амплификации) определенных, специфических только для данной мишени участков ДНК в процессе повторяющихся температурных циклов. На каждом цикле амплификации синтезированные ранее фрагменты вновь копируются ДНК-полимеразой. Благодаря этому происходит увеличение концентрации специфических для данной мишени фрагментов ДНК в миллионы раз, что значительно упрощает дальнейший анализ.

Для проведения полимеразной цепной реакции необходимо наличие в реакционной смеси ряда основных компонентов.

Праймеры – искусственно синтезированные олигонуклеотиды, имеющие, как правило, размер от 15 до 30 нуклеотидов, идентичные соответствующим участкам ДНК-мишени. Они играют ключевую роль в образовании продуктов реакции амплификации. Правильно подобранные праймеры обеспечивают специфичность и чувствительность тест-системы.

Taq-полимераза – термостабильный фермент (максимальная активность фермента проявляется при темп. 70-74°C (хотя фермент может работать и при более низких температурах). Источник происхождения этого фермента – микроорганизм *Thermus aquaticus*, время полужизни при 94°C составляет около 45 мин. Taq-полимераза обеспечивает достраивание 3'-конца второй цепи ДНК согласно принципу комплементарности. Смесь дезоксинуклеотидтрифосфатов (дНТФ) дезоксиаденозинтрифосфата (дАТФ), дезоксигуанозинтрифосфата (дГТФ), дезоксицитозинтрифосфата (дЦТФ) и дезокситимидинтрифосфата (дТТФ) – «строительный материал», используемый Taq-полимеразой для синтеза второй цепи ДНК.

Буфер – смесь катионов и анионов в определенной концентрации, обеспечивающая оптимальные условия для реакции, а также стабильное значение рН.

Анализируемый образец – это подготовленный к внесению в реакционную смесь препарат, который может содержать искомую ДНК, например ДНК микроорганизмов, служащую мишенью для последующего

многократного копирования. При отсутствии ДНК-мишени специфический продукт амплификации не образуется.

В идеальных условиях проведения реакции за 35 циклов ПЦР синтезируется несколько миллиардов копий ампликона определенной длины. Этого количества достаточно для достоверной визуальной детекции этого фрагмента, например, с помощью флуориметрии или методом электрофореза в агарозном геле.

Клоттинговые методы исследования гемостаза. Клоттинговые или коагуляционные методы основаны на определении промежутка времени от добавления стартового реактива, запускающего каскад свертывания плазмы, до момента образования сгустка (выпадения фибрина). При постановке коагуляционных тестов необходимо перемешать плазму с реактивом до гомогенной суспензии и поддерживать стабильной температуру реакции. Коагуляционные тесты в настоящее время наиболее распространенный методический подход для оценки плазменного гемостаза в клинико-диагностических лабораториях. Коагуляционные методы являются скрининговыми, тем не менее, на основе их сконструирован ряд методов для оценки активности факторов плазмы. Разработаны и активно применяются амидолитические тесты с хромогенными субстратами, часто дублирующие клоттинговые тесты. Тем не менее, клоттинговые являются приоритетными и выполняют роль референтных при анализе плазменного гемостаза.

Клоттинговые методы практически повсеместно автоматизированы и выполняются на коагулометрах. Это значительно расширило возможности оценки гемостаза в клинико-диагностических лабораториях. В то же время это требует качественного улучшения преаналитического этапа, жестких требований к пробоподготовке.

Коагулометры. В основе регистрации момента выпадения сгустка в коагулометрах используются несколько принципов: механический, турбидиметрический, оптико-механический.

Механические коагулометры. Принцип работы механических коагулометров представлен на рис. 2.13. В одном из вариантов кювета с плазмой вращается в наклонном положении. Металлический шарик в кювете начнет вращаться при свертывании плазмы. Момент захвата шарика выпавшим сгустком и начало его вращения вместе с кюветой фиксируется магнитным датчиком. При других вариантах регистрируется прекращение вращения внутри кюветы магнитной мешалки, захват сгустка опускающимся в кювету крючком или иные схемы, основанные на переходе жидкой плазмы в сгусток. Механические коагулометры характеризуются высокой надежностью и простотой в обслуживании. Принципиально то, что механические коагулометры могут работать на цельной крови. Основные проблемы возникают в ситуациях, когда формируется неплотный сгусток, например при использовании гепарина. В этих случаях выпадающий фибрин часто не может сразу увлечь за собой механическое устройство, результаты получаются плохо воспроизводимыми. Другой проблемой является формирование на шарике, мешалке или других устройствах, погруженных в кювету, белковых конгломератов, которые мешают регистрации.

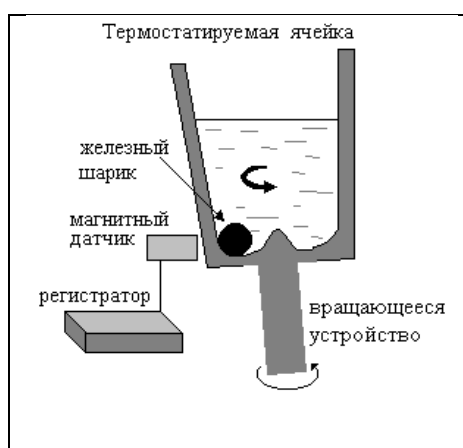


Рис. 2.13. Принцип работы механического коагулометра. Кювета с плазмой расположена под наклоном и вращается, шарик стоит на месте, не вращается. В момент свертывания шарик захватывается сгустком, как только шарик уходит от датчика меняется магнитное поле, прибор регистрирует момент свертывания плазмы

Оптико-механические коагулометры. Коагулометры этого класса характеризуются способностью регистрировать выпадающие хлопья фибрина даже без формирования плотного сгустка, что бывает при приеме пациентами антикоагулянтов, а также в случаях коагулопатий. Принцип оптико-механического коагулометра представлен на рис. 2.14. За счет использования следящей схемы регистрируется изменение подаваемого на лампу напряжения, чтобы обеспечивался заданный световой поток, проходящий через кювету с образцом. В этом случае резко уменьшается влияние исходной плотности плазмы, ее иктеричности и липемичности, в принципе, возможно исследовать свертывание плазмы с тромбоцитами.

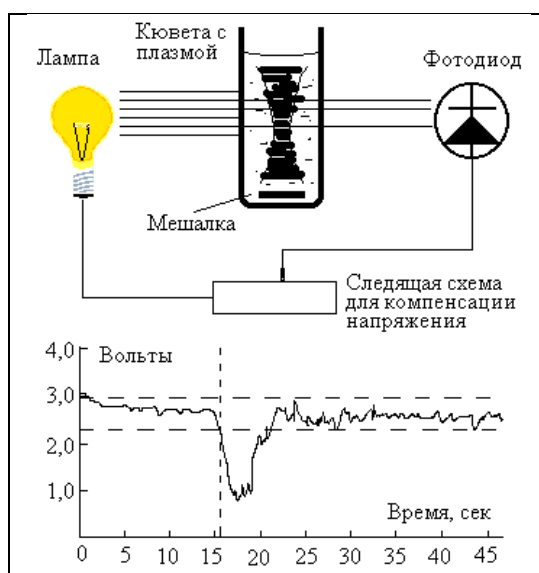


Рис. 2.14. Принцип регистрации выпадающего фибрина оптико-механическим коагулометром. Выпавшие в кювете нити фибрина меняют световой поток, падающий на фотодиод. Фотодиод связан через следящую схему компенсации с напряжением на лампе. В результате на лампу подается такое напряжение, которое меняет яркость свечения лампы, чтобы световой поток, попадающий на светодиод, поддерживался в заданном диапазоне. По изменению напряжения на лампе регистрируется начало выпадения фибринового сгустка

Турбидиметрические коагулометры. Турбидиметрические коагулометры регистрируют момент свертывания крови по приросту оптической плотности (рис. 2.15). При свертывании плазмы происходит резкое изменение светопропускания или рассеивания. В коагулометре программируется, при каком приросте оптической плотности по отношению

к исходному уровню (ΔA) регистрируется момент свертывания. Время от внесения в оптическую кювету индуктора свертывания до момента достижения заданного ΔA определяется как время свертывания плазмы в исследуемом тесте. Турбидиметрический принцип используется при определении показателей свертывания плазмы на многофункциональных фотометрах и биохимических анализаторах.

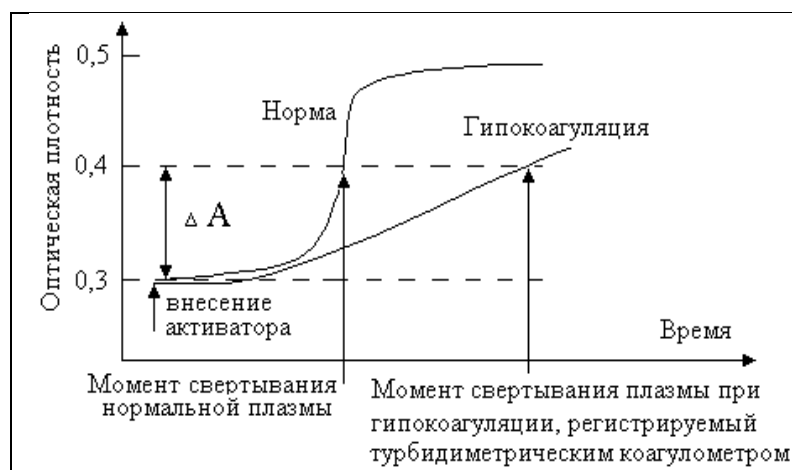


Рис. 2.15. Принцип регистрации момента образования сгустка турбидиметрическим коагулометром. При свертывании плазмы происходит резкое увеличение оптической плотности в фотометрической ячейке. Коагулометр определяет время от внесения активатора свертывания до момента изменения оптической плотности на ΔA (например, на 0,1 ед. оптической плотности)

Нефелометрические коагулометры.

Нефелометрические коагулометры определяют момент образования сгустка по изменению рассеяния света. Разработки в этой области технологий используют принцип определения сгустка по боковому рассеянию света (рис. 2.16). Метод рассеяния обеспечивает высокое качество анализов — высокую специфичность и чувствительность детекции сгустка даже для сложной липемичной или иктеричной плазмы.

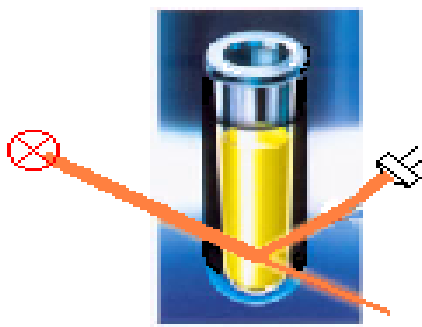


Рис. 2.16. Нефелометрический принцип измерения светорассеяния. Метод позволяет повысить точность измерений и воспроизводимость до 2-3%, а также снизить влияние на результат самого образца

Современные коагулометры сочетают в одном приборе несколько методов измерения, поэтому могут использоваться для комплексной оценки гемостаза.

Автоматизированный подсчет клеток крови. Автоматические счетчики крови оценивают размеры, структурные, цитохимические и другие характеристики клеток. Они анализируют около 10000 клеток в одном образце и имеют несколько различных каналов подсчета клеточных популяций и концентрации гемоглобина. На основании количества определяемых параметров и степени сложности их условно разделяют на 3 основных класса:

I класс – автоматические гематологические анализаторы, определяющие до 20 параметров, включая расчетные показатели красной крови и тромбоцитов, гистограммы распределения лейкоцитов, эритроцитов и тромбоцитов по объему, а так же частичную дифференцировку лейкоцитов на три популяции – лимфоциты, моноциты и гранулоциты (3Dif).

II класс – высокотехнологичные гематологические анализаторы, позволяющие проводить развернутый анализ крови, в том числе полную дифференцировку лейкоцитов по 5-ти параметрам-нейтрофилы, эозинофилы, базофилы, моноциты и лимфоциты (5Dif), гистограммы распределения лейкоцитов, эритроцитов и тромбоцитов по объему.

III класс – сложные аналитические системы, выполняющие не только развернутый анализ крови с дифференцировкой лейкоцитов, но и подсчет и анализ ретикулоцитов, некоторых субпопуляций лимфоцитов; при необходимости, комплектуются блоком для автоматического приготовления и окраски мазков из заданных образцов крови.

В основе работы анализаторов 1-го класса лежит кондуктометрический метод. Анализаторы 2 и 3-го классов используют в своей работе комбинации разных методов.

Кондуктометрические гематологические анализаторы. Технология автоматического подсчета клеток основана на подсчете числа и определении характера импульсов, возникающих при прохождении клеток через отверстие малого диаметра (апертуру), по обе стороны которого расположены два изолированных друг от друга электрода. Если через узкий канал, заполненный электропроводящим раствором, проходит клетка крови, то в этот момент сопротивление электрическому току в канале возрастает. Каждое событие – прохождение клетки через канал, сопровождается появлением электрического импульса. Концентрацию клеток определяют по числу электрических импульсов.

Разделение эритроцитов и тромбоцитов проводится по измерению амплитуды электрического сигнала: тромбоциты при прохождении измерительного канала генерируют электрические импульсы низкой амплитуды, эритроциты и лейкоциты – импульсы высокой амплитуды. После лизиса эритроцитов в суспензии остаются лейкоциты. Из первого счета импульсов высокой амплитуды вычитают импульсы высокой амплитуды второго счета (лейкоциты). Разница импульсов высокой амплитуды до и после лизиса соответствует количеству эритроцитов.

Разделение неизмененных лейкоцитов кондуктометрическим методом на основные субпопуляции невозможно в виду близости их объемов, однако подбирают такую композицию растворителя и гемолитика, что различные формы лейкоцитов претерпевают изменения размеров в разной степени и,

благодаря этому, могут разделяться. Изменение объема клетки зависит от многих факторов, включающих величину и форму ядра, объем цитоплазмы, наличие внутриклеточных включений, поэтому размер трансформированных клеток не соответствует размерам клеток при визуальном просмотре их в мазке крови. После трансформации лейкоциты распределяются на гистограмме следующим образом (рис. 2.17):

- Область малых объемов (35-90 фл) формируется лимфоцитами, которые под действием гемолитика значительно уменьшаются в объеме.
- Гранулоциты (нейтрофилы, базофилы и эозинофилы) напротив, подвергаются небольшому набуханию и расположены в области больших объемов (120-400 фл).
- Между двумя пиками имеется зона так называемых «средних лейкоцитов» (90-120 фл), которая лучше всего коррелирует с моноцитами. Однако в область средних клеток могут частично попадать базофилы, эозинофилы, различные патологические формы.

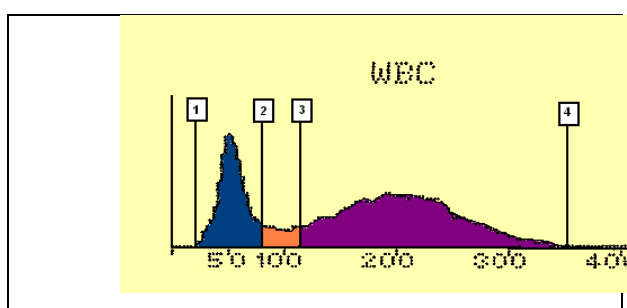


Рис. 2.17. Схема гистограммы распределения лейкоцитов по объему при кондуктометрической дифференцировке. Между 1 и 2 дискриминаторами располагается зона лимфоцитов, между 2 и 3 – «средних» клеток, между 3 и 4 – гранулоцитов

Высокотехнологические гематологические анализаторы.

Высокотехнологические гематологические анализаторы способны осуществлять дифференцированный счет лейкоцитов по 5-ти (5Diff) основным популяциям, используя различные принципы дифференцирования клеток: нейтрофилы, эозинофилы, базофилы, моноциты и лимфоциты,

оценивать наличие незрелых гранулоцитов, анализировать ретикулоциты и их субпопуляции, проводить оценку стволовых гемопоэтических клеток и субпопуляций лимфоцитов. Многочисленные функции гематологических анализаторов стали возможны, благодаря развитию новых технологий. В каждом случае в этой группе анализаторов применяется не менее 3 разных технологий, комбинированный результат которых дает возможность дифференцировать лейкоциты.

Технология VCS включает одновременный компьютерный анализ клеток по объему, электропроводности и дисперсии лазерного света. Полученные по трем каналам данные с помощью электроники комбинируются и анализируются, в результате происходит распределение клеток по дифференцировочным кластерам и, таким образом, лейкоциты разделяются на пять основных популяций: лимфоциты, моноциты, нейтрофилы, эозинофилы и базофилы (рис. 2.18). Результатом отображения объемного графика на плоскости является лейкоцитарная скатерограмма, на которой каждый тип клеток имеет свою зону расположения.

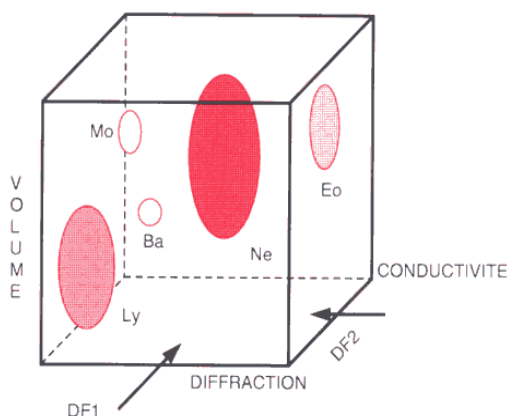


Рис.2.18. VCS-куб, определяющий лейкоцитарную скатерограмму. Клеточные кластеры размещаются на цветной объемной диаграмме, где по оси X – нормированная рассеивающая способность, по оси Y – объем клеток, по оси Z – структурная электропроводимость

Технология MAPSS – Multi Angle Polarized Scatter Separation – мультипараметрическая система лазерного светорассеивания – регистрация интенсивности рассеивания клетками поляризованного лазерного луча под разными углами. Этот метод заключается в компьютерном анализе дисперсии лазерного света клетками крови. Рассеивание клеткой поляризованного лазерного луча под разными углами дает сведения о таких ее свойствах, как:

- *размер клеток* – для чего оценивается прохождение поляризованного лазерного луча под малым углом рассеивания,
- *структура и степень сложности клеток* – оценивается по анализу рассеивания поляризованных лазерных лучей, направленных под углом до 7° ,
- *ядро-цитоплазматическое соотношение* - оценивается по анализу рассеивания поляризованных лазерных лучей, направленных под углом до 10° ,
- *оценка формы клеточного ядра* – осуществляется благодаря анализу светорассеивания поляризованных лазерных лучей под углом 90° ,
- *для оценки клеточной зернистости и дифференцировки эозинофилов* используется оценка светорассеивания деполяризованного луча под углом в 90° .

Принцип жидкостной цитохимии (измерение активности пероксидазы в лейкоцитах), в сочетании с методами кондуктометрии, гидродинамического фокусирования, оптической абсорбции, позволяет проводить дифференцировку лейкоцитов. Использование пероксидазной реакции основано на различной ее активности в лейкоцитах. Так, эозинофилы и нейтрофилы имеют интенсивную пероксидазную активность, моноциты – слабую, в лимфоцитах она не выявляется.

Проточная цитохимическая техника включает регистрацию рассеянного и поглощенного светового луча. В лейкоцитарном канале после лизиса эритроцитов и стабилизации лейкоцитов происходит цитохимическая

реакция, далее лейкоциты дифференцируются по двум признакам: размеру клеток, определяемому методом рассеивания лазерного луча, и пероксидазной активности – по поглощению клеткой светового потока. Дифференцировка базофилов от других гранулоцитов проводится в базоканале. Цитоплазма всех лейкоцитов за исключением базофилов подвергается лизису после обработки пробы специфическим лизатом.

Проточная цитофлуориметрия с использованием флуоресцентного красителя полиметина, который связывается с ДНК и РНК клеток, позволяет использовать его для дифференцировки лейкоцитов и для подсчета ретикулоцитов. Анализ клеток происходит в проточной кювете при пересечении луча лазера. После контакта лазерного луча с окрашенной клеткой происходит рассеивание последнего под большим и малым углами и возбуждение флуоресцентного красителя.

Гематологические анализаторы с полным дифференцированным подсчетом лейкоцитов позволяют с высокой точностью дифференцировать лейкоциты, провести скрининг нормы и патологии, динамический контроль за лейкоцитарной формулой и резко сократить ручной подсчет лейкоцитарной формулы.

Проточная цитофлуориметрия. В основе проточной цитофлуориметрии лежит проведение фотометрических и флуоресцентных измерений отдельных клеток, пересекающих одна за другой вместе с потоком жидкости лазерный луч монохроматического света. Фотометрические каналы используются для оценки размеров клеток и внутриклеточных структур. Частицы, отличающиеся по размерам, по-разному рассеивают свет, при этом характер рассеивания зависит от соотношения длины волны света и диаметра частиц. Если размер частиц меньше длины волны облучающего монохроматического света лазера (например, внутриклеточные структуры), то существенное количество света рассеивается под углом 90° (боковое светорассеяние). В том случае, когда длина волны облучения сопоставима с размерами рассеивающихся частиц,

световая волна как бы огибает частицу, взаимодействует с ней и отклоняется от прямолинейного распространения на небольшой угол – малоугловое светорассеяние. Такой тип рассеивания возникает при взаимодействии света с поверхностью клеток разного размера. При одновременной регистрации бокового и прямого светорассеяния возможно выделить все клеточные популяции лейкоцитов. Флюоресцентный канал применяется для изучения клеточных маркеров, при этом используются моноклональные антитела (МАТ) к мембранным и внутриклеточным компонентам, меченные различными флюорохромными красителями. При облучении клеток длиной волны, возбуждающей флюорохром, происходит поглощение света. Затем флюорохром испускает свет, но уже меньшей интенсивности (большей длины волны), чем поглощенный. Кроме того, флюорохром испускает свет во все стороны, поэтому флюоресценцию можно регистрировать под любым углом по отношению к облучаемому свету.

Проточные цитофлюориметры могут быть оборудованы одним, двумя или более лазерами. В случае использования двух или более лазеров в исследования могут быть включены флюорохромы, возбуждаемые на разных длинах волн. Использование нескольких флюоресцентных меток позволяет проводить одновременный двух-, трехцветный и более анализ, так как каждый флюорохром при прохождении через луч лазера испускает свет различной длины волны. Наиболее часто в качестве красящей метки применяется флюоресцеинизотиоционат (FITC), который спускает свет, улавливаемый в зеленой области спектра, фикоэритрин (PE) – красное свечение. При выборе сочетаний флюорохромов для одновременного определения нескольких клеточных маркеров следует учитывать способность оптической системы прибора разделять и одновременно регистрировать сигналы от используемых флюорохромов. Использование многоцветного проточноцитометрического исследования позволяет одновременно получить информацию о нескольких антигенах на поверхности клеток.

Проточная цитофлюориметрия – быстро развивающаяся технология в клинической лабораторной диагностике. Основными направлениями проточной цитометрии считаются количественная и функциональная характеристика клеток:

- поверхностные антигены;
- внутриклеточные цитоплазматические молекулы – цитокины, бактерицидные белки, сигнальные молекулы, белки цитоскелета;
- внутриклеточные ядерные молекулы (транскрипционные факторы, ядерные белки, ДНК и ее фрагменты, РНК, хромосомы, мембранный потенциал митохондрий, концентрация ионов Ca^{2+} , активность ферментов;
- оценка абсолютного числа $CD4^+$ Т-лимфоцитов для оценки активности ВИЧ.

Проточная цитофлюориметрия играет ключевую роль в онкогематологии. Она используется с целью диагностики и мониторинга опухолевой популяции при острых лейкозах и лимфопролиферативных заболеваниях (ЛПЗ), прогноза, подсчета абсолютного количества стволовых гемопоэтических клеток, диагностики пароксизмальной ночной гемоглобинурии.

Разработка гибридной технологии получения моноклональных антител (МАТ) предоставила возможность изучить линейно-специфические, дифференцировочные, активационные антигены клеток. МАТ со сходной специфичностью были объединены в группы (кластеры). Первоначальное значение понятия «кластер дифференцировки» (CD – cluster of differentiation) подразумевал набор МАТ, распознающих одну и ту же антигенную структуру на поверхности клеток. Со временем термин «кластер дифференцировки» стал означать саму структуру на клеточной мембране, отражающей фенотип клетки. Известно более 300 кластеров дифференцировки клеток человека и их число постоянно пополняется.

Проточная цитофлюориметрия позволяет исследовать антигены, имеющие прогностическое значение. Широкое использование в клинической

практике моноклональных антител значительно улучшило результаты лечения больных лимфомами. Для успешного их применения необходимо до начала терапии исследовать степень экспрессии антигенов на соответствующих клетках-мишенях. Используя метод проточной цитофлюориметрии, в процессе лечения можно проводить мониторинг остаточной популяции опухолевых клеток. Широкое использование проточной цитофлюориметрии в онкогематологии привело к качественно новой диагностике лейкозов и лимфом, а также к разработке новых подходов в оценке эффективности лечения и мониторинга минимальной остаточной болезни, определяющей дальнейшую тактику ведения больных.

Электрофорез. Электрофорез – движение заряженных частиц в растворе под действием электрического поля. Электрофоретический метод в клинической лабораторной диагностике – это способ пространственного разделения молекул, имеющих разный заряд и размеры, путем помещения их в электрическое поле. Электрофореграмма белков биологических жидкостей человека (сыворотка крови, моча, спинномозговая жидкость) позволяет получить значительную диагностическую информацию. У здорового человека относительное содержание белковых фракций при определении их в сыворотке крови методом электрофореза на бумаге, следующее: альбумины – 55-65%, α 1-глобулины 3-6%, α 2-глобулины 7-10%, β -глобулины – 7-12%, γ -глобулины – 13-19%.

При многих заболеваниях наблюдается изменение соотношения фракций, тогда как общее количество белка обычно мало изменяется. Выявление этих изменений с помощью метода электрофореза широко используется в диагностических целях.

Основными типами электрофореза являются: зональный электрофорез, изотахофорез, изоэлектрическое фокусирование, иммуноэлектрофорез.

Зональный электрофорез ведется при постоянном (не изменяющемся) значении pH буферного раствора, заполняющего данный носитель (бумагу, гель, др.). Исследуемый образец наносится пятном или тонким слоем на

носитель, по которому и перемещается в электрическом поле. Усложненным вариантом зонального электрофореза является диск-электрофорез (многофазный зональный электрофорез), при котором рН и другие характеристики, постоянные внутри одной «фазы», при переходе к другой «фазе» скачкообразно изменяются.

При изоэлектрическом фокусировании в среде для электрофореза создается плавный градиент рН. Белок останавливается в зоне, где значение рН равно его изоэлектрической точке (рI). Для создания градиента рН обычно используют раствор полиамино-поликарбонновых кислот, которым насыщают носитель. В отсутствие электрического поля эта смесь обычно имеет рН=6,5. При наложении электрического поля указанные кислоты обеспечивают линейный градиент рН от 3 до 10.

При изотахофорезе заряженные ионы сначала разделяются в соответствии с величинами их заряда и подвижности, а затем перемещаются в электрическом поле с одинаковыми и постоянными скоростями.

Иммуноэлектрофорез сочетает в себе электрофоретическое разделение белков с иммунопреципитацией, основанной на реакции «антиген – антитело». Этот тип электрофореза превосходит остальные по чувствительности и разрешающей способности.

В электрофорезе важен тип носителя жидкой фазы. Преимущества и ограничения нескольких носителей, используемых в клинической биохимии представлены в табл. 2.3.

С помощью электрофореза возможно разделение не только белковых фракций, но также липопroteидов, изоферментов лактатдегидрогеназы, щелочной фосфатазы, выделений фракции гликированного гемоглобина. Это достигается в новых разработках, в частности при использовании капиллярного электрофореза.

Капиллярный электрофорез основан на разделении компонентов сложной смеси в кварцевом капилляре под действием приложенного электрического поля. Микрообъем анализируемого раствора (около 2 нл)

вводят в капилляр, предварительно заполненный подходящим буфером – электролитом. После подачи к концам капилляра высокого напряжения (до 30 кВ), компоненты смеси начинают двигаться по капилляру с разной скоростью, зависящей от заряда и массы и в разное время достигают зоны детектирования.

Таблица 2.3

Преимущества и ограничения носителей при электрофорезе

Название метода	Преимущества метода и/или носителя	Недостатки
На фильтровальной или хроматографической бумаге	Сниженная конвекция, разделенные зоны можно зафиксировать и окрасить. Простое оборудование	Непрозрачность. Загрязнения и неоднородность бумаги мешают разделению. «Хвосты» на электрофореграммах из-за высокой адсорбционной емкости. Фон окрашивается.
На пленках из ацетата целлюлозы	Быстрый, требует меньшего количества пробы для анализа. Низкая адсорбционная емкость помогает избежать появления “хвостов”. После окрашивания фон остается бесцветным. Пригоден для иммуноэлектрофореза.	Непрозрачность в водных растворах (можно добиться прозрачности, погрузив в минеральное масло). Дороже, чем при использовании бумаги. Мало пригоден для препаративного электрофореза.
В агаровом и агарозном гелях	Удовлетворительная прозрачность, высокая пластичность (проще резать, удобнее красить и определять ферментативную активность прямо в геле), простота изготовления.	Из-за отрицательного заряда на сульфатных и СООН-группах сетки агара возникает электроосмос, приводящий к неравномерному распределению электрического поля, а иногда – гидростатического давления. Возможно химическое взаимодействие веществ с агаром.
В полиакриламидном (ПААГ) геле	Химически инертен, можно кипятить. Можно задать необходимый размер пор и обеспечить свойства молекулярного сита. Высокая прозрачность. Легко готовить. Упругий, прочный.	На сегодняшний день наилучший носитель, но готовится из акриламида - ядовитого вещества

Хроматографические методы. Хроматография – физико-химический метод разделения и анализа смесей, основанный на распределении их

компонентов между двумя фазами – неподвижной и подвижной (элюент), протекающей через неподвижную. Хроматографический анализ является критерием однородности вещества: если хроматографическим способом анализируемое вещество не разделилось, то его считают однородным (без примесей). Принципиальным отличием хроматографических методов от других физико-химических методов анализа является возможность разделения близких по свойствам веществ. После разделения компоненты анализируемой смеси можно идентифицировать и количественно определять (массу, концентрацию) любыми химическими, физическими и физико-химическими методами.

В зависимости от природы взаимодействия, обуславливающего распределение компонентов между элюентом и неподвижной фазой, различают следующие виды хроматографии – *адсорбционную, распределительную, ионообменную, эксклюзионную (молекулярно-ситовую)*.

Адсорбционная хроматография основана на различии сорбируемости разделяемых веществ адсорбентом (твёрдое тело с развитой поверхностью); распределительная хроматография – на разной растворимости компонентов смеси в неподвижной фазе и элюенте; ионообменная хроматография - на различии констант ионообменного равновесия между неподвижной фазой (ионитом) и компонентами разделяемой смеси; молекулярно-ситовая хроматография – на разной проницаемости молекул в неподвижную фазу (высокопористый неионогенный гель). В соответствии с агрегатным состоянием элюента различают:

- газовую хроматографию ГХ (GC);
- жидкостную хроматографию ВЭЖХ (HPLC).

Газовая хроматография применяется для газов разделения, определения примесей вредных веществ в воздухе, воде, определения состава продуктов основного органического синтеза, лекарственных препаратов.

Жидкостная хроматография используется для анализа, разделения и очистки синтетических полимеров, лекарственных препаратов, детергентов,

белков, гормонов и др. биологически важных соединений. Использование высокочувствительных детекторов позволяет работать с очень малыми количествами веществ (10^{-11} - 10^{-9} г), что исключительно важно в биологических исследованиях.

Микрочиповая технология. Биологические микрочипы - технология, которая выполняется одновременно на большом количестве микрозон (микроаррэев), в которые нанесены специфические антигены (белковый анализ) или праймеры нуклеиновых кислот (ДНК\РНК анализ). Микрочипы предназначены для выявления большого количества возможных вариантов биохимических, иммунохимических, молекулярно-биологических реакций. Высокая производительность, относительно низкая стоимость анализа, наряду с высокой чувствительностью и специфичностью определения, делают это направление в клинической лабораторной диагностике наиболее перспективным. Благодаря высокой чувствительности, биочип-анализатор способен обнаруживать очень низкие концентрации аналитов. Можно говорить о регистрации отдельных молекул, если их плотность в микроаррэях составляет около 1 молекулы на квадратный микрон.

Конкурентные преимущества микропланшетных иммуночипов обусловлены тем, что их применение позволяет кардинально поднять производительность лабораторий. Кроме того, снижаются затраты на расходные реагенты, так как стоимость мультиплексных тестов в расчете на один выявляемый аналит значительно ниже. Микропланшетный формат технологии позволяет легко адаптировать ее для любой клинической лаборатории, так как не требуется иное дополнительное оборудование, кроме биочип-анализатора. Подготовка проб осуществляется также как и в иммуноферментном анализе с использованием обычного лабораторного оборудования для работы с микропланшетами (шейкеры, промыватели, диспенсеры). Преимущества технологии иммуночипов очевидны, когда речь заходит о получении комплексной картины заболевания, формируемой с помощью лабораторных тестов, а также при анализе малых количеств

тестируемого материала, например при скрининге новорожденных с использованием микрообразцов крови, высушенной на фильтровальной бумаге. Микрочиповые системы разрабатываются для осуществления биохимических, энзиматических, иммуноферментных реакций, реакций ДНК-гибридизации, полимеразно-цепной реакции (ПЦР). Особый интерес подобные системы представляют для анализа молекул ДНК методом ПЦР для диагностики таких заболеваний как туберкулез, вирусный гепатит, инфекций, передающихся половым путем, онкологических и генных заболеваний, а также для определения генома человека и идентификация личности. С открытием ДНК-микрочипирования стало легче диагностировать генетические заболевания. Речь идет о таких хромосомных болезнях, которые вызывают умственную отсталость у рожденного ребенка и другие пороки развития – как умственного, так и физического.

Культуральный метод. Культуральный метод является отличительной особенностью микробиологических (бактериологических) исследований. Наличие культурального метода в клинической лаборатории дает основание для выделения бактериологического отделения. Главная составляющая культуральных методов – культивирование возбудителя на питательных средах, в организме лабораторных животных или на культурах тканей с целью выделения его в чистой культуре и последующей идентификации;

Задачи, решаемые культуральным методом:

- этиологическая расшифровка инфекционного заболевания;
- идентификация биологического вида бактерии-возбудителя;
- идентификация и дифференциация вирулентных (патогенных) вариантов возбудителя (*C. diphtheriae*, *Cl. difficile*, *E. coli*, *Y. enterocolitica*);
- контроль эффективности лечения, контроль излеченности, контроль эрадикации инфекции (при туберкулезе, сифилисе, дифтерии, острых кишечных инфекциях, сальмонеллезах, брюшном тифе, инфекции, вызванной *H. pylori*);
- выявление и дифференциация суперинфекции, рецидива,

реинфекции (при туберкулезе, инфекции, вызванной *H. pylori*, других хронических инфекциях);

- контроль антибиотикорезистентности (первичной, вторичной) штаммов возбудителей бактериальных инфекций;

Рост инфекционного агента в культуре – единственный надежный показатель жизнеспособности патогена. Иммунохимические, молекулярно-биологические, генетические подходы позволяют доказать наличие патогена в биоматериале, но только культуральный метод доказывает его жизнеспособность. Методы, не позволяющие дифференцировать живые и «убитые» микроорганизмы (ПЦР, РИФ), следует с осторожностью использовать при контроле излеченности. Подобные исследования необходимо проводить не ранее, чем через несколько недель после окончания этиотропной терапии, так как погибшие микробные клетки или их антигены могут длительное время сохраняться в организме и выявляться с помощью этих методов.

Успех выделения чистой культуры микроорганизма определяется правильностью выбора питательной среды и условий культивирования. Универсальной питательной среды, использование которой гарантирует выделение любого микроорганизма, не существует. Обнаружение возбудителей в исследуемом материале, содержащем значительное количество сопутствующей микрофлоры (например, фекалиях), требует применения селективных питательных сред, предназначенных для выделения конкретных видов микроорганизмов. Для некоторых бактерий необходимы особые условия культивирования (микроаэрофильные – для кампилобактеров, анаэробные – для клостридий и бактероидов, атмосфера, обогащенная углекислым газом – для нейссерий). Все это следует учитывать при направлении материала в лабораторию.

Методы экспресс-анализа. Методы экспресс-анализа получили распространение за счет разработки, производства и использования портативных аналитических устройств, свойства которых позволяют их

применение по месту лечения пациента или оказания неотложной помощи. Несомненный выигрыш при таком способе выполнения лабораторных исследований – резкое сокращение сроков получения лабораторной информации клиницистами. Лабораторное исследование становится частью непосредственного оказания помощи пациенту. Однако при проведении таких исследований необходимо сохранять контроль со стороны традиционных стационарных лабораторий для обеспечения качества и надежности результатов (ГОСТ Р ИСО 22870 «Исследования по месту лечения. Требования к качеству и компетентности»).

К методам экспресс анализа в первую очередь следует отнести иммунохроматографию, которая развивается для выявления как инфекционных агентов, так и неинфекционных аналитов. Иммунохроматографические тесты предназначены для качественного выявления различных аналитов в биологических образцах. Эти методы иммуноанализа представляют собой хорошо отлаженный и очень технологичный механизм производства анализа в различных условиях: point-of-care (POC) диагностика, самодиагностика и экспресс диагностика. Преимущества иммунохроматографических тестов хорошо известны:

- Высокая чувствительность.
- Относительная простота производства тестов.
- Длительная стабильность – 12-24 месяцев.
- Простота использования и интерпретации.
- Возможность использования небольших объемов и несколько различных типов образцов.
- Возможность автоматизированного учета результатов реакции.
- Относительно невысокая стоимость теста.

В основе теста лежит принцип взаимодействия антигенов и антител. Тест представляет собой иммунологическую полоску, состоящую из комбинации моноклональных антител и пористых материалов (рис. 2.19). В

зоне тестовой линии на мембране теста закреплены специфические антитела против искомого анализата. Анализируемый образец абсорбируется поглощающим участком теста. При наличии в анализируемом образце искомого антигена он связывается с нанесённым на полоску конъюгатом моноклональных антител, связанных с наночастицами золота. Образовавшийся комплекс движется по пористым материалам за счет капиллярных сил и в тестовой зоне взаимодействует с моноклональными детектирующими антителами. Иммунохроматографические экспресс-тесты активно применяются для диагностики инфаркта миокарда на основе определения комплекса биомаркеров: тропонина, сердечного белка, связывающего жирные кислоты (СБСЖК), МВ изофермента креатинкиназы (КК-МВ), миоглобина. Очень часто иммунохроматографические бесприборные экспресс-тесты используются для качественного выявления антигенов возбудителей различных инфекционных заболеваний (инфекции ЖКТ, респираторные инфекции и т.п.) в различных биологических образцах с целью диагностики возможного инфицирования.

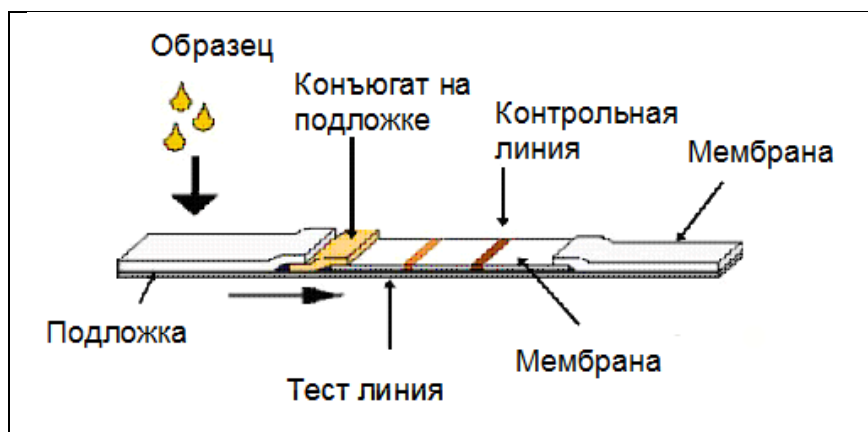


Рис. 2.19. Схема строения иммунохроматографического теста

Несмотря на очевидную привлекательность иммунохроматографических тестов, они имеют существенные недостатки:

- Большое количество ложноположительных результатов.
- Возможность фальсификации результатов.

- Сложность проведения контроля качества.
- Перекрестное реагирование аналитов в мультиплексных тестах.
- Высокие коэффициенты вариации (CV-10-20%), проблемы воспроизводимости от теста к тесту.

2.6.1. Стандарты лабораторных медицинских технологий (стандарты аналитического этапа лабораторного анализа)

При всем разнообразии практических форм лабораторного обеспечения медицинской помощи, определяемых конкретными условиями в данном медицинском учреждении, существуют общие принципы организации деятельности лабораторных структур, поставляющих клинически важную информацию о состоянии внутренней среды пациентов. Эти принципы сформулированы в международных и национальных стандартах. Стандарт ГОСТ Р ИСО 15189 «Лаборатории медицинские. Частные требования к качеству и компетентности» устанавливает основные требования к системе менеджмента качества и технические требования ко всем сторонам деятельности клинико-диагностических лабораторий. Стандарт затрагивает все ключевые стороны организации работы КДЛ. Федеральные органы по надзору в сфере здравоохранения рассматривают положения ГОСТ Р ИСО 15189 как основу тех требований, которые должны предъявляться при сертификации процессов выполнения лабораторных исследований. Фактически выполнение стандартов, затрагивающих лабораторные исследования, является на современном уровне системой основополагающей для обеспечения качества лабораторных услуг. Система лабораторных стандартов затрагивает все этапы лабораторного анализа, а также процедуры контроля качества лабораторных исследований. Ниже приведены примеры лабораторных стандартов, касающиеся аналитического этапа лабораторного анализа.

Стандарт ГОСТ Р 52905-2007 (ИСО 15190:2003) «Лаборатории медицинские. Требования безопасности» содержит комплекс требований к обеспечению в деятельности лабораторий мер безопасности по отношению ко всем видам опасности, начиная с биологической.

Федеральным агентством по техническому регулированию и метрологии утверждены национальные стандарты РФ по медицинским лабораторным технологиям. Положения этих стандартов коррелируют с основными положениями ГОСТ Р ИСО 15189 и конкретизируют применение его требований к различным сторонам процесса клинического лабораторного исследования.

ГОСТ Р 53022.1-2008 «Технологии лабораторные медицинские. Требования к качеству клинических лабораторных исследований». Часть 1. Правила менеджмента качества клинических лабораторных исследований.

ГОСТ Р 53022.2-2008 «Технологии лабораторные медицинские. Требования к качеству клинических лабораторных исследований». Часть 2. Оценка аналитической надежности методов исследования.

ГОСТ Р 53022.3-2008 «Технологии лабораторные медицинские. Требования к качеству клинических лабораторных исследований». Часть 3. Правила оценки клинической информативности лабораторных тестов.

ГОСТ Р 53022.4-2008 «Технологии лабораторные медицинские. Требования к качеству клинических лабораторных исследований». Часть 4. Правила разработки требований к своевременности предоставления лабораторной информации.

ГОСТ Р 53079.1-2008 «Технологии лабораторные медицинские. Обеспечение качества клинических лабораторных исследований». Часть 1. Описание методов исследования.

ГОСТ Р 53079.2-2008 «Технологии лабораторные медицинские. Обеспечение качества клинических лабораторных исследований». Часть 2. Руководство по качеству исследований в клинико-диагностической лаборатории. Типовая модель.

ГОСТ Р 53133.1-2008 «Технологии лабораторные медицинские. Контроль качества клинических лабораторных исследований». Часть 1. Пределы допускаемых погрешностей результатов измерения аналитов в клиничко-диагностических лабораториях.

ГОСТ Р 53133.2-2008 «Технологии лабораторные медицинские. Контроль качества клинических лабораторных исследований». Часть 2. Правила проведения внутрिलाбораторного контроля качества количественных методов клинических лабораторных исследований с использованием контрольных материалов.

ГОСТ Р 53133.3-2008 «Технологии лабораторные медицинские. Контроль качества клинических лабораторных исследований». Часть 3. Описание материалов для контроля качества клинических лабораторных исследований.

ГОСТ Р 53133.4-2008 «Технологии лабораторные медицинские. Контроль качества клинических лабораторных исследований». Часть 4. Правила проведения клинического аудита эффективности лабораторного обеспечения деятельности медицинских организаций.

Согласно российскому законодательству применение ГОСТов является добровольным. Тем не менее, существующие системы лицензирования и сертификации используют положения ГОСТов при вынесении положительных решений.

2.7. ПОСТАНАЛИТИЧЕСКИЙ ЭТАП ЛАБОРАТОРНОГО АНАЛИЗА

Постаналитический атап лабораторного анализа можно разделить на лабораторную и внелабораторную части.

2.7.1. Внутрिलाбораторная часть постаналитического анализа

Проверка результата анализа специалистом лаборатории. Проверка квалифицированным лабораторным специалистом результата анализа является основным элементом *внутрिलाбораторной части* постаналитического этапа. Проверка проводится на предмет аналитической

достоверности результата анализа, правдоподобия, а также сопоставление результата с *референтными интервалами*, с ранее проведенными аналогичными исследованиями или параллельно проведенными другими исследованиями у того же больного. Лучшим источником для референтных интервалов международные эксперты признают общепризнанные книги по лабораторной медицине (например, Tietz Textbook of Clinical Chemistry). Полезно сопоставить эти интервалы с интервалами, предлагаемыми производителем аналитической системы. Если по какой-то причине в этой книге нет искомого аналита или представленной информации недостаточно, можно использовать референтные интервалы, предлагаемые производителем аналитической системы.

Формирование лабораторного заключения. Верификация результатов исследования в лабораториях проводится врачами клинической лабораторной диагностики. В общем виде используется следующий алгоритм проверки: результаты внутреннего контроля качества; правильность занесения данных в ЛИС; адекватность данных диагностической задаче; адекватность данных индивидуальным особенностям пациента; оценка референтных интервалов. В случае отсутствия проблемных зон, врач верифицирует данные. В случае выявления отклонений, врач принимает одно из следующих решений: повторная постановка исследования; внесение корректировок в данные, в случае технической ошибки; внесение информации в ЛИС – интерпретация результатов, комментариев к результату исследования; выбраковка данных с соответствующим комментарием на бланке.

Форматирование бланков отчетов заслуживает особого внимания сотрудников лаборатории. Хорошо использовать группировку результатов анализов по патофизиологическому принципу и, помимо цифрового, графическое представление данных относительно референтных пределов, что значительно упрощает трактовку результатов. В целом, клиницист должен быть в состоянии, взглянув на бланк, быстро получить наиболее важную

информацию, не отвлекаясь на количество нулей после запятой, единицы или неактуальные референтные интервалы.

Если результаты анализов сгруппированы на бланке правильно, приведены соответствующие референтные величины, выделены результаты, превышающие референтные величины, и дополнительно дано заключение о возможных причинах, вызвавших патологические отклонения в результатах, то это будет только способствовать эффективному использованию лабораторных исследований в лечебно-диагностическом процессе и, в конечном итоге, улучшит качество оказания медицинской помощи пациентам.

На этапе формирования лабораторного заключения нужно учитывать факторы, препятствующие определению аналита. Степень влияния внешних факторов часто зависит от метода измерения аналита. Если на преаналитической стадии сомнительная проба была принята на исследование, то при окончательной проверке результатов в бланке отчета следует каким-то образом выделить аналиты, на измерение которых эти факторы могли оказать влияние. Подобные комментарии в окончательном отчете о лабораторном исследовании необходимы.

Важными факторами, способными изменить лабораторные результаты являются *медикаменты и их метаболиты*. Уловить такую интерференцию при оценке результатов – одна из задач врача клинической лабораторной диагностики. Однако эта задача остается практически мало разрешимой из-за огромного разнообразия лекарственных средств, предлагаемых современным фармацевтическим рынком, и в силу появления в крови и моче большого разнообразных метаболитов лекарств, зачастую более активно препятствующих проведению измерения. Можно попытаться совместно разработать информационный материал по влиянию используемых в клинике медикаментов на результаты лабораторных исследований и постоянно дополнять его новыми сведениями по мере их появления. При наличии современных медицинских и лабораторных информационных систем эта

задача становится выполнимой. Опираясь на госпитальную информационную систему, где расписаны все препараты, принимаемые пациентом, программа, интегрированная в лабораторную информационную систему, будет проводить автоматическую проверку лабораторных результатов перед формированием отчетов по пациентам и при необходимости снабжать их комментариями типа: «Подобное изменение концентрации может быть связано с применением...», которые в свою очередь перед распечаткой будет подтверждать специалист лабораторной диагностики.

Очень важно указать в отчете о лабораторном исследовании время его отправки из лаборатории. Этот критерий обязательно необходимо учитывать, особенно если анализы выполнялись по неотложным показаниям, так как задержка лабораторией результатов может оказать серьезное влияние на своевременность оказания помощи пациенту.

Эта часть этапа заканчивается подписью (авторизацией) бланка отчета, т.е. формированием конечного продукта лабораторного процесса и передачей его клиницисту.

Руководство лаборатории ответственно за вид представления отчетов о результатах исследований. Вид представления отчета (электронный или на бумажном носителе) и способ передачи из лаборатории должны быть согласованы с пользователями лабораторных услуг. Существует несколько способов передачи бланков отчетов. Централизованные лаборатории часто используют для этого курьеров. Здесь особенно важно организовать четкую систему регистрации времени доставки и эффективную обратную связь с заказчиками лабораторных исследований. После верификации данных в лаборатории они становятся доступны у администраторов, которые выдают их физическим лицам согласно регламенту администраторов медицинских центров. Выдача результатов исследований юридическим лицам проводится в соответствии с договорами, данные передаются юридическим лицам

посредством электронной почты с соблюдением шифрования и защиты данных.

Копии или электронные версии отчетов о результатах должны храниться в лаборатории таким образом, который обеспечивает быстрое востребование информации. Длительность периода хранения может варьировать, однако сообщенные результаты должны храниться так долго, как это диктуется медицинскими потребностями или национальными, региональными или местными правилами.

Консультирование лечащего врача по результатам лабораторных исследований. В случае получения значительного отклонения в результатах жизненно важных параметров их немедленно обсуждают с врачами-клиницистами. При необходимости исследования повторяют. Аналогично поступают и в отношении других результатов, вызывающих сомнение.

Полезно бывает сформулировать и использовать понятие «критическая величина анализа», за которой стоит необходимость немедленных действий (табл. 2.4). Обнаружив такую величину, врач клинической лабораторной диагностики должен немедленно сообщить об этом клиницисту, что в отдельных случаях может спасти жизнь пациенту.

Формы и содержание заключений врачей клинической лабораторной диагностики по результатам лабораторных исследований необходимо обсуждать совместно с клиницистами.

Трактовку лабораторных исследований проводят и в лаборатории, и в клинических отделениях. Здесь специалисты лабораторной диагностики и клиницисты совместно должны выработать общие подходы к целому ряду проблем, например:

- проблема многообразия факторов, влияющих на результаты исследований;
- проблема биологической вариации анализов;

- понятие «референтный интервал» и многообразие этих интервалов (пол, возраст, беременность и прочее);
- понятие о клинически значимых отклонениях лабораторных результатов;
- понятие о диагностической чувствительности и специфичности лабораторных тестов.

Таблица 2.4

Критические величины результатов лабораторных исследований, требующие немедленных действий (Davis, Mass, 1999)

Аналит	<i>Критическая величина</i>
Гематология	
Гематокрит	<14 % или >60 %
Лейкоциты	<2,0·10 ⁹ /л у нового пациента или разница в 1,0·10 ⁹ /л по сравнению с предыдущим анализом при уровне 4,0·10 ⁹ /л >50,0·10 ⁹ /л у нового пациента
Мазок крови	Наличие лейкоэмических клеток (програнулоцитов или бластов)
Тромбоциты	<20,0·10 ⁹ /л или >1000,0·10 ⁹ /л
Ретикулоциты	>20 %
Протромбиновое время	>40 сек
Микробиология	
Культура крови	Положительная
Окраска по Граму ликвора, плевральной, синовиальной и других жидкостей	Положительная
Биохимия	
билирубин	>300 мкмоль/л (новорожденные)
тропонин Т	>0,1 нг/мл
креатинкиназа-МВ	>6 % от активности общей креатинкиназы
кальций	<1,5 ммоль/л или >3,2 ммоль/л
глюкоза	<2,22 ммоль/л или >27,75 ммоль/л
фосфаты	<0,32 ммоль/л
калий	<2,5 ммоль/л или >6,5 ммоль/л
натрий	<120 ммоль/л или >160 ммоль/л
бикарбонаты	<10 ммоль/л или >40 ммоль/л
Д-димер	>500 мкг/мл
В артериальной или капиллярной крови:	
pO ₂	<40 мм Hg
pH	<7,2 или >7,6
pCO ₂	<20 мм Hg или >70 мм Hg

Результаты лабораторных исследований подвержены влиянию биологической и аналитической вариации. Величина биологической вариации зависит от целого комплекса факторов. В целом, высокое качество проведения преаналитической стадии лабораторного исследования снижает биологическую вариацию, прежде всего, за счет стандартизации условий взятия материала (например, взятие крови в одно и то же время дня, после отдыха, натощак, с учетом положения тела, с одной и той же длительностью наложения жгута). Но даже, если взятие материала для анализов производится в стандартных условиях, результаты повторных измерений (например, ежедневные определения концентрации глюкозы в крови натощак) будут подчиняться законам нормального распределения, группируясь вокруг «типичной» для данного индивидуума величины. Внутрииндивидуальная вариация наблюдается у одного и того же человека в результате влияния биологических ритмов, например (концентрация кортизола в крови утром и вечером), образа жизни (уровень физической активности, питание, прием алкоголя, лекарств и т.д.). Расовые, возрастные и половые отличия концентрации аналитов – типичный пример межиндивидуальной вариации. Это явление приводит к многообразию референтных интервалов для одного и того же аналита. В частности, этим объясняется отличие концентрации половых стероидов у женщин и мужчин, концентрации тироксина в крови в популяции здоровых беременных женщин от таковой у здоровых женщин, или активности щелочной фосфатазы в крови у подростков и взрослых.

2.7.2. Внелабораторная часть постаналитического анализа

Внелабораторная часть постаналитического этапа – это, прежде всего оценка лечащим врачом клинической значимости информации о состоянии пациента, полученной в результате лабораторного исследования. Авторизованный отчет с результатами лабораторных исследований

поступает клиницисту, который клинически интерпретирует полученную лабораторную информацию, сопоставляет ее с данными собственного наблюдения за пациентом и результатами других видов исследований и использует ее для оказания пациенту медицинской помощи. Доступность консультаций со стороны специалистов лаборатории, а также участие последних в обсуждении отдельных клинических случаев – обязательная практика для лаборатории любого типа. Полезно ввести в практику запись в истории болезни результатов оценки лабораторных исследований, что облегчит оценку эффективности использования лабораторной информации.

Сроки выполнения лабораторных тестов могут оказывать серьезное влияние на качество оказания медицинской помощи пациентам, особенно, если они проводятся по неотложным или жизненным показаниям. Лечащие врачи должны знать сроки выдачи всех видов анализов. Кроме того, в лечебном учреждении должен быть налажен диалог с ведущими клиницистами и администрацией по определению эффективных сроков выполнения анализов в соответствии с медицинскими нуждами и стоимостью анализов. Так, для неотложных исследований принятое время от доставки материала в лабораторию до получения результатов – один час. Для исследований по жизненным показаниям (чаще всего это такие аналиты, как гемоглобин, гематокрит, рН/газы крови и показатели кислотно-основного состояния, натрий, калий, хлориды, лактат, глюкоза), когда пациент находится, например, в операционной или отделении интенсивной терапии, это время сокращается до 5 минут. Сроки выполнения обычных и срочных тестов нужно регулярно контролировать и это должно быть частью инспекционных проверок лаборатории.

Практика получения клиницистом результатов по телефону должна быть ограничена и в минимальные сроки подтверждена бумажной или электронной копией с подписью ответственного лабораторного специалиста.

Клиническая интерпретация результатов лабораторных исследований и их использование для решения задач, стоящих перед клиницистом (диагноз,

слежение за состоянием пациента и развитием заболевания, изменение схемы лечения), важный, но не единственный показатель эффективного использования лабораторных исследований. Большее значение имеет определение критериев влияния этой информации на качество оказания медицинской помощи пациентам. Проведение оценки такого влияния требует значительных интеллектуальных усилий и затрат времени. Вместе с тем только она позволяет реально оценить вклад лаборатории в лечение пациента. Здесь можно выделить следующие основные критерии:

- влияние лабораторных анализов на уменьшение числа осложнений при лечении пациентов;
- сокращение срока пребывания пациента в отделении интенсивной терапии или реанимации;
- уменьшение затрат на медикаменты для группы пациентов, которым проводились те или иные лабораторные тесты;
- сокращение длительности пребывания пациента в стационаре, в целом, и для отдельных групп пациентов, которым проводились те или иные лабораторные тесты;
- сокращение смертности или инвалидизации в результате внедрения новых лабораторных тестов.

Совместно с клиницистами, опираясь на международные стандарты и рекомендации, нужно написать, утвердить у руководителя лечебно-профилактического учреждения инструкцию по качеству (внутренний стандарт) проведения постаналитического этапа лабораторного исследования и следовать ей в повседневной работе. Этот документ будет основой, как для обеспечения, так и для контроля качества проведения этой стадии.

2.8. Контрольные материалы к главе 2

Контрольные вопросы:

1. Какие процессы лабораторного исследования выполняются на преаналитическом, аналитическом и постаналитическом этапах?
2. Какие антикоагулянты применяются и для каких исследований?
3. Для каких лабораторных исследований необходимо брать кровь натощак?
4. Основные принципы взятия материала для цитологических, коагулологических, микробиологических исследований?
5. Что такое стандартная операционная процедура, составьте СОП для процедурной сестры, берущей кровь из вены?
6. Каковы основные процедуры при настройке лабораторного микроскопа для морфологических исследований в лаборатории?
7. Что отличает биохимическое исследование в ручном исполнении, полуавтоматическое и автоматическое?
8. Оцените достоинства и ограничения иммуноферментного и иммунофлуоресцентного анализа.
9. Какие условия должны выполняться, чтобы обозначить метод в качестве референтного?
10. Какие действия необходимо выполнить специалисту клиничко-диагностической лаборатории при получении критического значения анализа?

ТЕСТЫ

Инструкция: Выбрать один правильный ответ

02.01. Цитрат и оксалат стабилизируют плазму за счет

- А) связывания ионов кальция
- Б) активации антитромбина
- В) предупреждения активации фактора Хагемана
- Г) ингибирования тромбопластина
- Д) ингибирования акцелератора

02.02. Оценка результатов лабораторного анализа происходит на этапе

- А) преаналитический
- Б) аналитический
- В) постаналитический

- Г) преаналитическом и постаналитическом
- Д) на любом из лабораторных этапов

02.03. У пациентов в реанимационном отделении нельзя брать кровь из:

- А) вены
- Б) артерии
- В) подключичного катетера
- Г) пальца
- Д) мочки уха

02.04. Для исследования коагуляции недопустимо в качестве антикоагулянта использование:

- А) ЭДТА
- Б) цитрата натрия
- В) оксалата натрия
- Г) гепарина
- Д) СТАД-систем со стабилизатором, включающим цитрат натрия, трифосаденин, теофиллин и дипиридамо́л

02.05. Не допускается при взятии крови на коагулограмму:

- А) использовать вакуумный пробурки вакуэты, наполненные цитратом
- Б) использовать пластиковые пробирки с цитратом
- В) использовать силиконированные пробирки с цитратом
- Г) наполнять пробирки с цитратом при помощи шприцов для инъекций
- Д) забирать кровь из вены с помощью иглы

02.06. Бактериовыделение при туберкулезе диагностируется микроскопией препаратов мокроты, окрашенных по:

- А) Романовскому –Гимза
- Б) Папаниколау
- В) Цилю-Нильсену
- Г) Лейшману
- Д) Мак Грюнвальду

02.07. Чтобы освободиться от примеси "путевой" крови, попадающей в результате повреждения иглой кровеносных сосудов, расположенных в области эпидурального пространства, нужно:

- А) отцентрифугировать ликвор
- Б) пропустить ликвор через фильтр
- В) первые 3-5 капель ликвора не брать
- Г) провести ликвороферез
- Д) добавить в ликвор тромбин для активации свертывания

02.08. Правильность измерения в клинической биохимии определяют с использованием:

- А) калибратора
- Б) проб пациента
- В) атестованной контрольной сыворотки
- Г) неатестованной контрольной сыворотки
- Д) государственных стандартов

02.09. К методам срочной лабораторной диагностики следует отнести определение :

- А) активности кислой фосфатазы
- Б) белковых фракций
- В) опухолевых маркеров
- Г) общего холестерина
- Д) билирубина у новорожденных

02.10. При постановке количественного метода ИФА получена неправильная форма графика калибровочной зависимости. Из представленного списка только одна не может быть причиной этой ошибки. Укажите какая:

- А) неправильно приготовлен раствор стандарта
- Б) ошибка в последовательности при внесении стандартов
- В) неправильная промывка и удаление раствора из ячеек
- Г) загрязнение дна ячеек микропланшета
- Д) высокая температура воздуха в помещении лаборатории

Ответы

02.01	02.02	02.03	02.04	02.05	02.06	02.07	02.08	02.09	02.10
А	В	В	А	Г	В	В	В	Д	Д

ГЛАВА 3. ОБЩИЕ ВОПРОСЫ ГЕМАТОЛОГИИ

3.1. Современные представления о кроветворении

Гемопоз – многостадийный процесс постоянного образования гемопоэтических клеточных клонов в специализированных органах кроветворения. Это сбалансированная, непрерывно обновляющаяся система, подчиняющаяся строгим механизмам регуляции, направленным на поддержание равновесия между образованием клеток и их разрушением. Отличительной чертой гемопоза является разнообразие как видов клеток,

их функций, морфологии, продолжительности жизни, так и места пребывания в организме.

Основные принципы кроветворения:

- сохранение постоянства количественного и качественного состава клеточных ростков;
- поддержание необходимой клеточной массы кроветворных органов;
- поддержание равновесия процессов регенерации в костном мозге и деградации в тканях/органах кроветворения по принципу обратной связи;
- наличие механизмов регуляции элементов кроветворной системы.

Пролиферация, дифференцировка и апоптоз – генетически заложенные программы, предопределяющие существование и функционирование клеток крови. Каждый из этих процессов имеет свои механизмы, регулируется определенными генами, ростовыми факторами, цитокинами, стромальным микроокружением. Стромальные клетки секретируют большое количество регулирующих факторов, без которых невозможна пролиферация стволовых кроветворных клеток (СКК), дифференцировка и функционирование клеток. Пролиферация и дифференцировка клеток крови в костном мозге происходят параллельно. Созревание клетки идет непрерывно, постепенно замедляется синтез ДНК вплоть до его прекращения, что делает зрелую дифференцированную клетку неспособной к делению. Пролиферативный пул костного мозга представлен исключительно молодыми, способными к делению, кроветворными клетками.

Важным физиологическим регулятором гемопоеза является апоптоз. Учитывая огромную продукцию клеток крови (около 5-7 тонн клеток в течение всей жизни), для поддержания клеточного равновесия и поддержания гомеостаза должен существовать механизм удаления избыточных, поврежденных и старых клеток. Этим механизмом является

апоптоз. Программа самоуничтожения клетки, которая осуществляется различными внешними и внутренними сигналами, уравнивается программой ее блокирования. Дифференцировка гемопоэтических клеток возможна только при условии их выживания, для чего необходимы антиапоптотические факторы. Самыми мощными антиапоптотическими стимулами для нормального кроветворения являются ростовые факторы. Диапазон их действия достаточно широк, начиная со стволовой клетки и заканчивая зрелыми элементами, которым они обеспечивают нормальное функционирование. Любые нарушения в апоптотической системе могут приводить к нежелательным последствиям, изменяя гомеостаз любой клеточной системы, что часто лежит в основе патогенеза различных заболеваний.

3.2. Структурная организация костного мозга, гемопоэз

Структуру кроветворных органов (костный мозг, тимус, селезенка, лимфатические узлы) составляют соединительная ткань, паренхима, сосуды. Основная масса паренхимы – специализированные клетки, которые постоянно меняются в процессе жизненного цикла. Зоны активной клеточной пролиферации отделены от зон дифференцировки, по мере созревания клетки из одних зон перемещаются в другие. Миграция клеток из костного мозга через стенку синусов в периферическую кровь имеет, очевидно, свой избирательный специфический механизм. Ответ органов кроветворения, которые работают как один слаженный механизм, на различные факторы (естественную убыль клеток, кровопотерю, гемолиз, инфекции и другие) может быть как за счет изменения количества клеток, так их морфологии и функции.

В нормальных условиях кроветворные клетки (миелоидные и лимфоидные) обновляются за счет стволовых кроветворных клеток (СКК), ранее заселивших органы, а также за счет вновь поступающих в него предшественников. От действия местных гемопоэтических факторов зависит

вхождение СКК в митоз, размеры и число колоний, а также вид клеточного потомства. По мере роста и развития организма происходит замещение активного костного мозга на жировой костный мозг.

3.2.1. Эритропоэз

Морфологическая и функциональная характеристика клеточных элементов эритроидного ряда. Эритропоэз – процесс образования и созревания эритроидных клеток в костном мозге. Система, объединяющая самые ранние предшественники эритроидного ряда, морфологически идентифицируемые пролиферирующие и непролиферирующие ядродержащие клетки, ретикулоциты и эритроциты обозначается термином – эритрон. В норме количество циркулирующих эритроцитов поддерживается на постоянном уровне. У взрослого человека массой тела 70 кг в костном мозге ежедневно продуцируется $20-25 \times 10^{10}$ новых эритроцитов. Такое количество клеток необходимо для поддержания нормального уровня гемоглобина. Развитие эритроидных клеток осуществляется процессами дифференцировки и созревания. Схема дифференцировки клеток эритропоэза представлена на рис. 3.1.

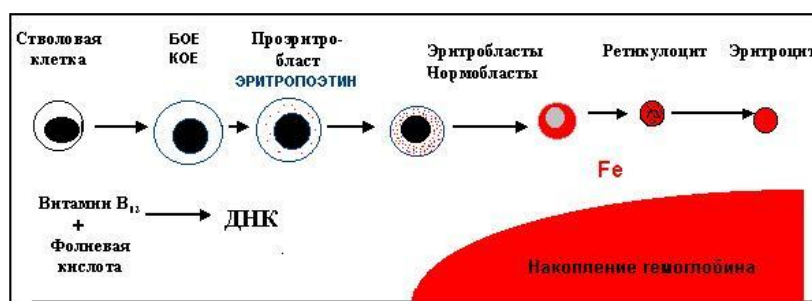


Рис. 3.1. Схема дифференцировки клеток эритропоэза. БОЕ – бурстобразующие единицы, КОЕ – колониеобразующие единицы

Родоначальными клетками эритропоэза являются частично детерминированные миелоидные предшественники (КОЕ-ГЭММ). Они образуются из стволовой полипотентной клетки, претерпевая 5-10 делений. Коммитированные монопотентные клетки-предшественники, бурстобразующие единицы эритропоэза (БОЕ-Э), гетерогенны по своему составу, проходят 11-12 делений. Их различия определяются степенью дифференцировки клеток. В этот период 60-65% клеток находится в митозе. По мере созревания клеток число делений сокращается. КОЕ-Э дифференцируются в проэритробласты – самые ранние морфологически идентифицируемые костномозговые предшественники эритроцитов, способные к синтезу гемоглобина. Проэритробласт в течение 3-5 суток подвергается дальнейшей дифференцировке, проходит стадии базофильного, полихроматофильного и оксифильного эритробласта. На этом этапе функционирования эритронона клетки проходят до 7 митотических делений. Однако число делений может сокращаться, что сопровождается уменьшением количества эритроцитов, срока их созревания и увеличением размера клетки. Этот процесс называется «перескок деления». Полихроматофильный эритробласт – последняя делящаяся клетка в эритроидном ряду, созревающая в оксифильный эритробласт.

Процесс дифференцировки эритроидных клеток характеризуется постепенным уменьшением размеров клеток, ядра, конденсацией хроматина, накоплением гемоглобина в цитоплазме. Ядро оксифильного нормобласта превращается в плотную, пикнотичную массу, выталкивается из цитоплазмы при прохождении клетки через узкие эндотелиальные отверстия в синусоидах костного мозга. После удаления ядра из нормобластов образуются костномозговые ретикулоциты, в которых продолжается синтез гемоглобина еще в течение 3-4 суток. Ретикулоциты созревают в костном мозге в течение 36-44 часов, после чего поступают в кровь, где дозревают в течение 24-30 часов. Незрелые ретикулоциты имеют большое количество

РНК-содержащих структур (рибосомы) и, несмотря на отсутствие ДНК, способны синтезировать гемоглобин, липиды, пурины. В митохондриях синтез АТФ осуществляется за счет использования кислорода, одновременно в этих клетках протекает и анаэробный гликолиз. Ретикулоцит имеет на поверхности те же молекулы, что и зрелый эритроцит, включая гликофорин А, антигены группы крови и системы резус. Благодаря рецепторам к трансферрину ретикулоцит абсорбирует молекулы железа, плотность которых более выражена у менее зрелых ретикулоцитов.

Диаметр ретикулоцитов составляет 7,7-8,5 мкм. Средний объем ретикулоцитов на 24-35% больше эритроцитов (101-128 фл), а концентрация гемоглобина в них ниже, чем в зрелом эритроците, что объясняет появление гипохромных макроцитов в периферической крови при состояниях, сопровождающихся ретикулоцитозом. В процессе созревания ретикулоцитов клетка освобождается от рибосом, утрачивает митохондрии, места связывания с трансферрином, в результате синтез гемоглобина прекращается. Характерной морфологической особенностью ретикулоцитов является наличие в цитоплазме зернисто-сетчатой субстанции, представляющей собой остатки рибосом, выявляемой при суправитальном методе окраски. В различных ретикулоцитах она отличается полиморфизмом; чем клетка моложе, тем субстанция более обильная.

Количество ретикулоцитов отражает скорость продукции эритроцитов в костном мозге, поэтому их подсчет имеет значение для оценки степени активности эритропоэза. Левый сдвиг ретикулоцитов в сторону незрелых клеток на фоне ретикулоцитоза имеет место при активации эритропоэза. Нормальное количество ретикулоцитов в периферической крови здорового взрослого человека колеблется в пределах 0,2-1,2 %. Ретикулоцитоз отражает повышенную регенеративную способность костного мозга. Сохраняющийся ретикулоцитоз может свидетельствовать о продолжающемся кровотечении. Ретикулоцитопения - индикатор угнетения эритропоэза.

Поддержание нормального состава эритрона находится под контролем различных механизмов, основными из которых являются парциальное давление кислорода в тканях и секреция эритропоэтина. Уровень оксигенации тканей зависит от интенсивности кровотока, концентрации гемоглобина, степени его насыщения кислородом и сродства гемоглобина к кислороду. Центральная роль в регуляции эритропоэза принадлежит **эритропоэтину (ЭПО)**. Уменьшение снабжения тканей кислородом или увеличение потребности в кислороде стимулирует продукцию ЭПО и наоборот избыток кислорода в тканях (гипероксия) подавляет образование гормона.

Понятие об эффективном, неэффективном и терминальном эритропоэзе. Синтез гемоглобина в эритрокариоцитах костного мозга начинается на ранней стадии развития эритробласта и заканчивается в ретикулоците с исчезновением последней рибосомы. Скорость синтеза гемоглобина в проэритробластах и базофильных эритробластах составляет 0,5 пг в час в 1 клетке. В делящихся клетках после митоза количество гемоглобина уменьшается наполовину, в течение интерфазы приближается к исходному уровню. К концу второго митотического цикла (перед делением) клетки содержат 21,6 пг гемоглобина, а в разделившихся дочерних клетках, которые по своей морфологии являются базофильными эритробластами, по 10,8 пг. В конце митоза количество гемоглобина в базофильном эритробласте составляет 25,2 пг, а у образовавшихся из него ранних полихроматофильных эритробластов – 13 пг. После деления раннего полихроматофильного эритробласта образуются средние полихроматофильные эритробласты с концентрацией гемоглобина внутри клетки, достигающей критической величины – 13,5 пг. При этом прекращается синтез ДНК, клетка выключается из митотического цикла, скорость синтеза гемоглобина замедляется. Дальнейшее созревание клеток красного ряда *происходит без деления*.

При *нормальном эритропоэзе* эритрокариоциты проходят в среднем 5 митозов, в результате из 1 эритробласта получается 32 эритроцита с количеством Hb 27-31 пг.

В небольшой популяции эритроидных клеток синтез гемоглобина осуществляется быстрее, и на стадии раннего полихроматофильного эритробласта клетка подходит к митозу с количеством гемоглобина более 27 пг, при этом она теряет способность к делению. Дальнейшее развитие этой тетраплоидной клетки происходит без деления. Из нее образуется крупный ретикулоцит и затем макроэритроцит, содержащий более 30 пг гемоглобина. Этот тип деления эритрокариоцитов получил название *терминального*. В норме терминальный эритропоэз составляет не более 5 %. Наличие его дает возможность быстро регулировать количество эритроцитов в зависимости от различных физиологических состояний.

Достигнув критической массы гемоглобина (27 пг) на стадии базофильного эритробласта, 5-10% эритрокариоцитов гибнут в костном мозге, подчиняясь законам апоптоза (неэффективный эритропоэз). В физиологических условиях *неэффективный эритропоэз* – один из факторов регуляции эритрона, поддержания необходимого количества эритроцитов в крови. Для оценки величины неэффективного эритропоэза может быть использован цитохимический метод определения количества PAS-положительных эритрокариоцитов. В костном мозге здорового человека их число не превышает 3-8%. Увеличение объема неэффективного эритропоэза свидетельствует о накоплении или увеличении клеток с ошибочной дифференцировочной или пролиферативной программой. Такие клетки подлежат элиминации посредством физиологической гибели, поэтому *уровень неэффективного эритропоэза отражает интенсивность апоптоза*.

Иммунология эритроцитов. На мембране эритроцита имеется более 250 эритроцитарных антигенов, которые располагаются подобно мозаике. Роль антигенов заключается в регуляции дифференцировки и созревания

клеток. Наиболее изучены антигены систем АВО и резус. Эритроцитарные антигены не меняются в течение жизни человека и могут тысячелетиями сохраняться у трупов при низких температурах и неопределенно долго при высыхании. Системы эритроцитарных антигенов наследуются обычно независимо друг от друга. Наследуемые изменения (мутация) генов приводят к появлению аллелей. Ген, определяющий группу крови системы АВО, обладает тремя аллелями – в виде антигенов А, В и отсутствия этих антигенов в виде третьей формы – О. Антигены А и В являются кодоминантными и доминируют над О-антигеном. Резус-антигены при передаче их от обоих родителей могут проявляться в двойной дозе (гомозиготы) или в простой дозе (гетерозиготы) при передаче от одного из родителей. Например, антигены группы А (II) – в виде АА или АО, резус антигены: CDE/CDE или CDE/cDe. Резус-антигены находятся на мембране эритроцитов независимо от пола и возраста, равномерно распределяясь во всех группах крови. Формирование резус антигенов начинается с 3-4 месяца внутриутробного развития.

Начальные этапы эритропоэза характеризуются появлением на мембране клеток HLA I и II классов, CD34, рецептора к трансферрину (CD71), раннего миелоидного антигена CD33 и Rh-антигенов, а также небольшим количеством рецепторов к ЭПО. Более зрелые предшественники – КОЕ-Э, отличаются высокой чувствительностью к ЭПО и экспрессией максимального количества эритроидных маркеров: рецепторов к ЭПО, специфического протеина – гликофорина А и рецепторов к трансферрину.

Обмен витамина В12, фолиевой кислоты, порфиринов.
Витамин В₁₂ – цианкобаламин, источником поступления организм являются только продукты животного происхождения: мясо, яйца, сыр, молоко, особенно много его в печени и почках. При обычной диете человек получает от 5 до 15 мкг витамина В12 ежедневно, суточная потребность от 2 до 5 мкг. После прекращения поступления витамина в организм человека анемия развивается в течение нескольких лет. В период беременности, роста и

состояниях, сопровождающихся повышенным метаболизмом цианкобаламина, увеличиваются суточные потребности в витамине В12.

После освобождения от пищи витамин В12 в желудке связывается с R-белком, а затем в подвздошной кишке с внутренним фактором (ВФ), вырабатываемым париетальными клетками слизистой желудка. Комплекс ВФ-В12 всасывается после специфического связывания с рецепторами подвздошной кишки. В кровотоке В12 переносится специализированными транспортными белками транскобаламинами (ТК), которые доставляют В12 в костный мозг, печень, почки. Для нормального обмена витамина В12 необходимы следующие факторы: наличие витамина в пище, адекватная желудочная секреция, панкреатическая секреция, интактная подвздошная кишка, транскобаламины, синтезируемые печенью. Дефект одного из этих факторов может привести к развитию В12-дефицитной анемии.

Витамин В₁₂ участвует в превращении метилтетрагидрофолата, поступающего в клетку из крови, в тетрагидрофолат – коферментная форма фолиевой кислоты. Образующиеся активные фолаты необходимы для синтеза пуриновых и пиримидиновых оснований – предшественников ДНК и РНК. Дефицит витаминов В12 и фолиевой кислоты нарушает метаболизм нуклеиновых кислот, вызывает ингибирование клеточного деления. Эти нарушения наиболее выражены со стороны гемопоэтических клеток и клеток желудочно-кишечного тракта.

Наиболее частой причиной развития дефицита витамина В₁₂ является *атрофический гастрит*, частота и выраженность которого увеличивается с возрастом. Существенное значение в развитии дефицита витамина В₁₂ имеют генетические факторы. Семейная предрасположенность выявляется у 20-30% больных. В большинстве случаев семейная предрасположенность связана с выработкой аутоантител к париетальным клеткам желудка и внутреннему фактору. Все антитела к внутреннему фактору относятся к IgG.

При дефиците витамина В₁₂ костный мозг гиперклеточный за счет увеличения количества эритрокариоцитов. Соотношение лейко-/эритро- 1:2

– 1:3 (норма 3:1– 4:1). Характерен мегалобластический тип кроветворения с высоким уровнем неэффективного эритропоэза. Клетки не способны синтезировать достаточное количество ДНК для клеточного деления, клеточный цикл замедляется. В результате нехватки ДНК для вступления в стадию митоза костный мозг переполняется клетками, что создает видимость повышенного эритропоэза. Во время продолжительной фазы покоя хроматин диффузно рассеивается на всем протяжении ядра, придавая ему мегалобластный вид.

В результате нарушения клеточного деления эритроидные клетки становятся крупными (мегалобласты) и качественно изменяется их структура. Ядра мегалобластов всегда имеют характерное нежносетчатое распределение хроматина, асинхронное созревание ядра и цитоплазмы (при выраженной гемоглобинизации ядро сохраняет свой незрелый вид).

Фолиевая кислота в организме человека содержится в количестве 5-10 мг; суточная потребность составляет 50-100 мкг. Запасы ее истощаются через 3-4 месяца после прекращения поступления в организм. Фолаты синтезируются растениями и микроорганизмами. Наибольшее количество фолиевой кислоты содержится в зеленых овощах, фруктах, печени, почках, дрожжах. Фолиевая кислота всасывается в двенадцатиперстной кишке и проксимальном отделе тощей кишки. В плазме крови она связывается с транспортными белками (β_2 -макроглобулином, альбумином). Основным депо фолатов является печень, где она находится в неактивном состоянии (в виде тетрагидрофолиевой кислоты) и переходит в активную форму по мере метаболических потребностей. Фолаты, также как и витамин B_{12} , занимают ключевое положение во многих видах клеточного метаболизма, включая синтез аминокислот и нуклеиновых кислот, особенно необходимых для пролиферирующих клеток. Коэнзимы фолиевой кислоты необходимы для образования пуриновых соединений, биосинтеза метионина.

Порфирины – органические вещества, широко распространены в природе в виде комплексов с ионами железа – гемоглобин и миоглобин.

Основным местом синтеза порфиринов являются эритробласты костного мозга и клетки печени, на основе порфиринов в эритроблестах костного мозга синтезируется гемоглобин.

Начинается синтез гема в митохондриях с присоединения сукцинил-кофермента-А (CoA) к глицину, в результате чего образуется δ -аминолевулиновая кислота (АЛК). Этот процесс идет с участием фермента *АЛК-синтетазы*, в качестве кофермента которого выступает пиридоксаль-5-фосфат (производное витамина B₆). Активность фермента может быть угнетена химическими веществами, в частности свинцом, алкоголем, снижена глюкозой или гемом. Заканчивается синтез порфиринов включением двухвалентного железа в протопорфирин. Процесс катализируется митохондриальным ферментом *феррохелатазой* (*гемсинтетаза*), в результате чего образуется гем.

Цепь реакций синтеза порфиринов регулируется механизмом обратной связи, где конечный продукт гем регулирует синтез АЛК на уровне транскрипции и трансляции. В результате дефицита одного из ферментов синтеза гема развивается порфирия. При порфирии из-за нарушения синтеза гема снимается механизм обратной связи, прекращается ингибирование скорость-лимитирующего фермента *АЛК-синтетазы*, поэтому при легких формах порфирии удается поддерживать адекватный синтез гема (анемия не развивается), а происходит накопление промежуточных продуктов, которые водорастворимы и при накоплении экскретируются с мочой, при этом моча приобретает розовый или красный оттенок.

Обмен железа. Железо является необходимым элементом многих белков и ферментов, участвующих в ключевых процессах метаболизма, роста, пролиферации и регенерации клеток, транспорте кислорода к тканям, тканевом дыхании. Дефицит железа приводит к нарушению синтеза гемоглобина и развитию гипоксии. Вместе с тем железо может быть исключительно токсичным элементом, если присутствует в организме в повышенных концентрациях, превышающих емкость железосодержащих

белков. Потенциальная токсичность свободного двухвалентного железа (Fe^{2+}) объясняется его способностью запускать цепные свободнорадикальные реакции, приводящие к перекисному окислению липидов биологических мембран, образованию высоко реактивных кислородных радикалов, способных повреждать мембраны клеток, белки, нуклеиновые кислоты и в целом вызывать гибель клетки. Двойственная сущность функций железа диктует необходимость формирования жесткой регуляции концентрации железа в организме человека.

Системный гомеостаз железа регулируется на уровне всасывания железа в тонком кишечнике, процесс выведения (экскреции) железа пассивный, нерегулируемый. В норме баланс железа остается стабильным, и потери железа уравниваются повышением доставки его во время абсорбции. Транспорт и депонирование железа осуществляется специальными белками – трансферрином, трансферриновым рецептором 1 и ферритином. Показатели нормального обмена железа представлены в табл. 3.1.

Таблица 3.1

Лабораторные показатели нормального обмена железа

Сывороточное железо	Мужчины: 0,5 – 1,7 г/л (11,6 – 31,3 мкмоль/л) Женщины: 0,4 – 1,6 г/л (9 – 30,4 мкмоль/л) Дети: до 2 лет 0,4 – 1,0 г/л (7 – 18 мкмоль/л) 7 – 16 лет 0,5 – 1,2 г/л (9 – 21,5 мкмоль/л)
Общая железосвязывающая способность (ОЖСС)	2,6 – 5,0 г/л (46 – 90 мкмоль/л)
Трансферрин	Дети (3 мес – 10 лет) 2,0 – 3,6 г/л Взрослые 2 – 4 г/л (23 – 45 мкмоль/л) Пожилые (> 60 лет) 1,8 – 3,8 г/л
Насыщение трансферрина железом (НТЖ)	15 – 45 %
Ферритин сыворотки крови	Мужчины: 15 – 200 мкг/л Женщины: 12 – 150 мкг/л Дети: 2 – 5 месяцев 50 – 200 мкг/л 0,5 – 16 лет 7 – 140 мкг/л

В норме из пищи всасывается в тонком кишечнике 1-2 мг железа. Обязательные суточные потери также составляют около 1-2 мг. Повышенные

потери железа во время менструации (0,5-1 мг в день) или повышенные потребности в железе во время беременности (около 500 мг) компенсируются увеличением всасывания алиментарного железа (максимальная способность всасывания – 3 мг в день). Ежедневная потребность в железе превышает его поступление с пищей и составляет около 20 мг, которые в основном расходуются на синтез гемоглобина. Она удовлетворяется за счет реутилизированного железа, образующегося в макрофагах селезенки и других органах системы мононуклеарных фагоцитов (СМФ) при фагоцитозе старых или поврежденных эритроцитов.

Железо в сосудистом русле находится в связи с трансферрином. Который синтезируется гепатоцитами в соответствии с наличием железа в организме. В ответ на дефицит железа повышается транскрипция трансферриновой мРНК и уровень трансферрина в крови увеличивается, при исчезновении недостатка железа синтез трансферрина снижается. В норме насыщение трансферрина железом составляет около 30%, но может достигать 100% при выраженной перегрузке железом. В физиологических условиях и при дефиците железа только трансферрин осуществляет железотранспортную функцию. Неспецифическое связывание железа с другими транспортными белками, в частности альбумином, наблюдается при перегрузке железом. Биологическая функция трансферрина заключается в его способности легко образовывать диссоциирующие комплексы с железом, что обеспечивает создание нетоксического пула железа в кровотоке, который доступен и позволяет распределять и депонировать железо в организме. Связывая железо, трансферрин предохраняет клетки от токсического воздействия супероксидных и гидроксильных радикалов, перекиси, и от инфекции, лишая некоторые микроорганизмы возможности использовать железо для поддержания своего метаболизма. Нормальная концентрация трансферрина в крови составляет 2-4 г/л.

Железо, связанное с трансферрином, необходимо всем соматическим клеткам организма человека. Поступление в клетку комплекса Fe^{3+} –

трансферрин происходит через специфические рецепторы к трансферрину путем эндоцитоза. В сформированной везикуле при низких значениях pH ионы железа освобождаются от трансферрина и транспортируются во внутриклеточный лабильный пул железа, а комплекс апотрансферрин-рецептор возвращается на наружную поверхность клетки, апотрансферрин поступает в плазму крови, а рецептор остается на мембране. В эритрокариоцитах часть Fe^{3+} превращается в Fe^{2+} , которое используется на синтез гемоглобина. Эритробласт может одновременно присоединить до 100.000 молекул трансферрина и получить 200.000 молекул железа. Судьба Fe^{3+} в клетке неоднозначна: либо используется на синтез железосодержащих ферментов, либо откладывается в виде ферритина. Внутриклеточный свободный пул железа участвует в регуляции пролиферации клетки, экспрессии трансферриновых рецепторов. Неиспользуемая часть железа хранится внутриклеточно в молекуле ферритина в нетоксичной форме (Fe^{3+}) и его агрегированной форме гемосидерине. Они депонируют железо особенно интенсивно в печени, селезенке, мышцах, костном мозге. Увеличение внутриклеточного лабильного пула железа приводит к стимуляции синтеза ферритина и снижению экспрессии трансферриновых рецепторов.

Определенная часть рецепторов к трансферрину в виде мономеров сбрасывается клеткой в сосудистое русло, образуя растворимые трансферриновые рецепторы, способные связывать трансферрин. Количество мембранных рецепторов находится в прямой пропорции с рецепторами, обнаруженными в плазме крови. При перегрузке железом число клеточных и растворимых рецепторов к трансферрину снижается. При сидеропении, лишённая железа, клетка реагирует повышенной экспрессией трансферриновых рецепторов на своей мембране, увеличением растворимых трансферриновых рецепторов в плазме крови и снижением количества внутриклеточного ферритина. Чем выше плотность экспрессии трансферриновых рецепторов, тем выраженнее пролиферативная активность

клетки. Таким образом, экспрессия рецепторов трансферрина зависит от двух факторов – количества депонированного железа в составе ферритина и пролиферативной активности клетки. Растворимые трансферриновые рецепторы являются чувствительным индикатором, как активности эритропоэза, так и дефицита железа.

Ферритин, циркулирующий в крови, практически не участвует в депонировании железа, однако концентрация ферритина в сыворотке в физиологических условиях прямо коррелирует с количеством депонированного железа в организме. При дефиците железа, которое не сопровождается другими заболеваниями, также как при первичной или вторичной перегрузке железом показатели ферритина в сыворотке дают достаточно точное представление о количестве железа в организме. Поэтому в клинической диагностике концентрация ферритина должна использоваться в первую очередь как параметр, оценивающий депонированное железо. В отличие от ферритина гемосидерин не растворим в воде, поэтому железо гемосидерина с трудом подлежит мобилизации и практически не используется организмом.

В регуляции обмена железа большое значение имеет белок гепсидин. Этот гормон, синтезируется преимущественно в печени. Гепсидин ингибирует всасывание железа в кишечнике, блокирует транспорт железа через плаценту, блокирует выход железа из макрофагов, обладает как антибактериальной активностью, так и противогрибковой активностью. Когда запасы железа адекватны или высокие, синтезирующийся в печени гепсидин циркулирует в тонком кишечнике и приводит к блокаде единственного пути транспорта железа из энтероцита в плазму. При снижении запасов железа продукция гепсидина подавляется повышается выход железа из макрофагов в плазму и связывание его с трансферрином. При воспалительных заболеваниях, сопровождающихся высокой продукцией гепсидина, блокируется выход железа из макрофагов, что объясняет присутствие макрофагов, перегруженных железом. Сниженная секреция

гепсидина имеет место при железо-дефицитной анемии (ЖДА), гипоксии, неэффективном эритропоэзе.

Анемии, характеризующиеся перегрузкой железа, сопровождаются неэффективным эритропоэзом и повышением всасывания железа в тонком кишечнике. Наиболее часто такая анемия регистрируется при талласемиях. Парадоксальная ситуация возникает с синтезом гепсидина при талласемии. У этих больных концентрация гепсидина в моче низкая, несмотря на высокое содержание ферритина в сыворотке крови. Ингибицию гепсидина рассматривают как нецелесообразный физиологический ответ, который приводит к ухудшению перегрузки железом в тканях. Данный факт интерпретируется влиянием анемии на синтез гепсидина, ассоциированной с повышенным или неэффективным эритропоэзом. Низкий уровень гепсидина при наследственных анемиях может быть одним из факторов, приводящих к гиперабсорбции железа, перегрузке и повреждению тканей, развитию фиброза.

Согласно современным представлениям наиболее адекватными тестами для оценки метаболизма железа в организме является определение концентрации железа, трансферрина, ферритина в сыворотке крови, насыщения трансферрина железом, гепсидина, содержания растворимых трансферриновых рецепторов в сыворотке крови.

Обмен гемоглобина. Гемоглобин (Hb) – дыхательный пигмент, сложный белок – хромопротеид. Его небелковая часть (простетическая группа), включающая железо, называется гемом, белковый компонент – глобином. На долю глобина приходится 96% сухого веса Hb, на долю гема – 4%. Молекула Hb имеет 4 гема. Благодаря присутствию в составе гема иона железа гемоглобин переносит кислород от легочных альвеол к тканям. Синтез гемоглобина начинается на самой ранней стадии развития эритроидных элементах. При его нарушении содержание Hb в эритроците снижается, ячейки цитоскелета остаются незаполнены гемоглобином, что проявляется гипохромией эритроцитов в мазках крови, и повышением в них

концентрации неиспользованного на синтез порфирина. В эритроцитах взрослых людей 95-98% приходится на Hb A (adult – взрослый), 2-3% – на Hb A₂, 1-2% – на HbF (fetus – плод). Гемоглобин F у новорожденных составляет 70-90%, но к концу первого года его количество резко снижается. HbF может присутствовать не во всех эритроцитах.

По содержанию в крови взрослого человека >1% выделяют несколько производных гемоглобина:

- оксигемоглобин (HbO₂);
- восстановленный гемоглобин или дезоксигемоглобин (HbH);
- фетальный гемоглобин (HbF со своими собственными производными);
- карбоксигемоглобин (HbCO);
- сульфгемоглобин (HbS);
- метгемоглобин (HbMet) или гемиглобин (Hi).

Как в оксигемоглобине, так в восстановленном гемоглобине или карбоксигемоглобине, сульфгемоглобине железо находится в закисленной двухвалентной форме (Fe⁺²). При окислении в метгемоглобин железо переходит в трехвалентную окисленную форму (Fe⁺³), в этой форме гемоглобин не способен взаимодействовать с кислородом. В крови гемоглобин существует чаще всего в пяти основных формах: оксигемоглобин, дезоксигемоглобин, карбоксигемоглобин, метгемоглобин и сульфгемоглобин. Карбоксигемоглобин, метгемоглобин и сульфгемоглобин не участвуют в переносе кислорода, поэтому их называют дисгемоглобинами.

Повышение концентрации гемоглобина наблюдается при реактивных и опухолевых эритроцитозах, обезвоживании.

Снижение концентрации гемоглобина имеет место при анемиях, гипергидратации. В зависимости от концентрации гемоглобина выделяют

три степени тяжести анемии: легкую (Hb >90 г/л), среднюю (Hb 70-90 г/л), тяжелую (Hb <70 г/л).

Обмен желчных пигментов. При распаде гемоглобина в селезенке и в купферовских клетках печени клетках образуется билирубин. В плазме крови билирубин связан с альбумином. Это неконъюгированный билирубин, он нерастворим в воде. В печени билирубин отделяется от альбумина и в гепатоцитах подвергается энзиматической конъюгации с глюкуроновой кислотой, превращаясь в конъюгированный билирубин. Конъюгированный билирубин водорастворим, он поступает с желчью в желчный пузырь, где частично восстанавливается в мезобилирубин и в i-уробилиноген и поступает через общий желчный проток в двенадцатиперстную кишку. В толстой кишке под воздействием нормальной кишечной флоры дериваты билирубина восстанавливаются до бесцветного стеркобилиногена. В дистальном отделе толстой кишки основное количество стеркобилиногена окисляется в стеркобилин, который окрашивает каловые массы в различные оттенки коричневого цвета. Незначительная часть стеркобилиногена всасывается слизистой толстой кишки и через геморроидальные вены попадает в кровь, по нижней полой вене поступает в почки и фильтруется через почечный фильтр в мочу.

3.2.2. Гранулоцитопоз

Дифференцировка и созревание клеток гранулоцитопоза происходит в костном мозге, где из морфологически неидентифицируемых клеток-предшественников – КОЕ-ГМ (колониеобразующая единица грануломоноцитопоза) и КОЕ-Г (колониеобразующая единица гранулоцитопоза) формируется пул пролиферирующих гранулоцитов, состоящий из миелобластов, промиелоцитов и миелоцитов. Пролиферация и созревание этих клеток приводит к образованию созревающих клеток – метамиелоцитов, палочкоядерных и сегментоядерных гранулоцитов. Процесс созревания сопровождается изменением морфологии клеток: уменьшением

ядра, конденсацией хроматина, исчезновением ядрышек, сегментацией ядра, появлением специфической зернистости, утратой базофилии и увеличением объема цитоплазмы.

Процесс формирования зрелого гранулоцита из миелобласта осуществляется в костном мозге в течение 10-13 дней. Регуляция гранулоцитопоэза обеспечивается колониестимулирующими факторами: ГМ-КСФ (гранулоцитарно-макрофагальный) и Г-КСФ (гранулоцитарный колониестимулирующий фактор), действующих до конечной стадии созревания гранулоцитов. Клетки, коммитированные в сторону миелопоэза, характеризуются экспрессией ранних линейных миелоидных маркеров – CD33, CD117, CD13, миелопероксидаза. Основными маркерами зрелых клеток крови гранулоцитарного ряда являются CD45, CD10, CD11c, CD13, CD 15, CD16, CD18, CD32, CD33, CD50, CD65w, CD117, лактоферрин. Цитохимическими маркерами клеток миелопоэза являются миелопероксидаза, щелочная фосфатаза, липиды, хлорацетатэстераза, PAS-положительная субстанция, концентрация которых увеличивается по мере созревания клеток.

Морфологическая и функциональная характеристика клеточных элементов гранулоцитарного ряда. Нейтрофилы составляют 60-70% общего числа лейкоцитов крови. После выхода нейтрофильных гранулоцитов из костного мозга в периферическую кровь, часть их остается в свободной циркуляции в сосудистом русле (циркулирующий пул), другие занимают пристеночное положение, образуя маргинальный или пристеночный пул. У здоровых людей соотношение циркулирующего и маргинального пулов 1:3. Зрелый нейтрофил пребывает в циркуляции 8-10 часов, затем поступает в ткани, образуя по численности значительный пул клеток. Продолжительность жизни нейтрофильного гранулоцита в тканях составляет в среднем 2-3 дня. При этом клетка «стареет», приобретая пикнотичный вид. У человека за сутки вырабатывается около 10^{11} нейтрофильных гранулоцитов, поэтому, наряду с продукцией, крайне важным для организма

является их удаление, что осуществляется по механизму апоптоза. Дефект любого звена жизненного цикла нейтрофилов приводит к нарушению системы защиты организма, что отражается в рецидивирующих тяжелых бактериальных и грибковых инфекциях.

Нейтрофилы рассматриваются как первая линия защиты от внешних и внутренних агентов. Основная функция нейтрофилов – участие в борьбе с микроорганизмами путем фагоцитоза. Нейтрофилы убивают микроорганизмы с помощью двух механизмов: кислородзависимого и кислороднезависимого. Кислородный или дыхательный взрыв – это процесс образования продуктов, обладающих высокой антимикробной активностью (синглетный кислород, свободные радикалы, перекись водорода). Развитие кислородного взрыва осуществляется в течение нескольких секунд, что и определило название этих процессов как «взрыв». Содержимое гранул способно разрушить практически любые микробы. В азурофильных и специфических гранулах нейтрофилов содержится более 20 различных протеолитических ферментов, миелопероксидаза, интегрин, бактерицидные белки (лактоферрин, катионный антимикробный белок), лизоцим, лактоферрин, щелочная фосфатаза, вызывающие бактериолиз и переваривание микроорганизмов. В азурофильных гранулах имеется большое количество эластазы, которая может быть фактором, приводящим к деструкции тканей в очаге воспаления. Две металлопротеиназы, коллагеназа, желатиназа могут вызывать деградацию внеклеточного матрикса. На мембране нейтрофилов присутствуют различные группы рецепторов, которые осуществляют связь нейтрофилов с их микроокружением и регулируют функциональную активность нейтрофилов: хемотаксис, адгезию, дегрануляцию, поглощение. Это рецепторы для Fc-фрагмента иммуноглобулинов, компонентов комплемента (C3, C5a, CR1). Нейтрофилы способны синтезировать и секретировать ряд цитокинов (ФНО- α , ИЛ-1 α , ИЛ-1 β , ИЛ-6, ИЛ-8, ИЛ-12), колониестимулирующих факторов (ГМ-КСФ, Г-КСФ, М-КСФ), трансформирующий фактор роста β . Эти биологически

активные вещества позволяют нейтрофилам участвовать в реакции воспаления, обеспечивают их созревание и функциональную активность, а также определяют влияние нейтрофилов на эффекторные функции других клеток.

Таким образом, нейтрофилы содержат разнообразные по химическому составу и направленности действия соединения, благодаря которым могут влиять на клетки крови, стромы, эндотелий сосудов и другие системы организма, во взаимодействии с которыми они выступают и как эффекторы, и как мишени. Разнообразие активных веществ, содержащихся в нейтрофилах, свидетельствует об их участии в киллинге, остром воспалении и тканевой деструкции.

Эозинофилы составляют 0,5-5% от всех лейкоцитов крови, циркулируют в течение 6-12 ч, затем поступают в ткани, срок их жизни – около 12 суток. Тканевые эозинофилы распределены неравномерно. Наибольшее количество эозинофилов выявляется в тканях, соприкасающихся с внешней средой: подслизистый слой дыхательного, пищеварительного и частично мочеполового тракта. Эозинофилы, покинувшие кровеносное русло, повторно в него не возвращаются и разрушаются путем апоптоза в тканях.

На поверхности мембраны эозинофила имеются рецепторы к Fc-фрагменту молекулы иммуноглобулина, рецепторы для компонентов комплемента, молекулы адгезии, CD52, CD69, CD40. В клетках содержится значительное количество гранул, основным компонентом которых является главный щелочной белок (катионный белок), а также перекиси, обладающие бактерицидной активностью. Главный щелочной белок обладает цитотоксичностью, повреждает некоторые личинки гельминтов, нейтрализует гепарин. Гранулы эозинофилов содержат кислую фосфатазу, арилсульфатазу, коллагеназу, эластазу, глюкуронидазу, катепсин, эозинофильную пероксидазу, простагландины и другие ферменты. Простагландины угнетают дегрануляцию тучных клеток. Арилсульфатаза

ингибирует анафилактические вещества, тем самым, уменьшая реакцию гиперчувствительности немедленного типа. С помощью различных ферментов нейтрализуются продукты секреции тучных клеток. Эозинофилы обуславливают внеклеточный цитолиз, тем самым, участвуя в противогельминтном иммунитете. Объектом фагоцитоза эозинофилов могут быть бактерии, грибы, продукты распада тканей, иммунные комплексы. Основное значение эозинофилов заключается в их участии в механизмах защиты при гельминтозах, паразитозах, в реакциях гиперчувствительности немедленного типа, связанных с острой аллергией.

Базофилы и тучные клетки имеют костномозговое происхождение. Созревшие базофилы поступают в кровяной ток, где период их полужизни составляет около 6 ч. На долю базофилов приходится всего 0,5% от общего числа лейкоцитов крови. Базофилы мигрируют в ткани, где через 1-2 суток после осуществления основной эффекторной функции погибают. В гранулах этих клеток содержатся гистамин, гистидин, хондроитинсульфаты А и С, гепарин, серотонин, ферменты (трипсин, химотрипсин, пероксидаза, РНКаза, арилсульфатаза, α -глюкуронидаза), лейкотриены, тромбоксаны, простагландины, фактор хемотаксиса эозинофилов, фактор активации тромбоцитов, фактор хемотаксиса нейтрофилов, ИЛ-3, ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-6, ГМ-КСФ, ФНО- α .

Тучные клетки локализуются в эпителии, подслизистом слое желудочно-кишечного, дыхательного и урогенитального трактов, в коже, соединительной ткани, окружающей капилляры, серозных оболочках. Микроокружение определяет окончательный фенотип тучных клеток, среди которых выделяют две субпопуляции: соединительтканые и слизистые тучные клетки, которые фиксируются на специфических структурах соединительной ткани, таких как фибронектин и ламинин. Белки внеклеточного матрикса влияют на окончательную дифференцировку, состояние активности и выживаемость клеток. Тучные клетки способны к делению и имеют большой срок жизни (месяцы, годы).

Тучные клетки крупнее базофилов, имеют округлое ядро и большое количество полиморфных гранул, которые по составу аналогичны гранулам базофилов. На поверхности тучных клеток и базофилов имеются рецепторы для комплемента, Fcγ-рецепторы, высокой плотности рецепторы к IgE, обеспечивающие не только связывание IgE, но и освобождение гранул, содержимое которых обуславливает развитие аллергических реакций. IgE, секретируемые плазматическими клетками в слизистых оболочках, фиксируется на рецепторах тучных клеток. Такая фиксация может сохраняться очень долго (до года) и не сопровождается активацией клеток. Состояние организма, характеризующееся фиксацией на рецепторах тучных клеток IgE к конкретному аллергену, называется сенсibilизацией к данному аллергену. При фиксации аллергена со специфическими к нему IgE-антителами на поверхности тучных клеток происходит активация клетки, слияние мембран гранул с цитоплазматической мембраной и выброс содержимого гранул наружу. Дегрануляция осуществляется в течение нескольких секунд и не приводит к гибели клетки. В тучных клетках (но не в базофилах) возможен процесс восстановления гранул. Следствием активации и дегрануляции тучных клеток являются: местная дилатация и повышение проницаемости сосудов, гиперемия и зуд, гиперпродукция слизи, раздражение нервных окончаний, т.е. реакция гиперчувствительности немедленного типа. Тучные клетки и базофилы секретируют эозинофильный хемотаксический фактор, с помощью которого в очаг воспаления мигрируют эозинофилы, поглощающие и нейтрализующие гистамин. Реакции, определяемые базофилами и тучными клетками, необходимы для формирования воспалительного процесса как главной реакции иммунной системы на чужеродные агенты.

3.2.3. Моноцитопоз

Клетки, объединенные в систему мононуклеарных фагоцитов (СМФ), включают костномозговые предшественники, пул циркулирующих в

сосудистом русле моноцитов и тканевые макрофаги. ×Дифференцировка моноцитов из монобласта происходит в костном мозге в течение 5 дней, после чего они сразу выходят в кровяной ток, не создавая (в отличие от гранулоцитов) костномозгового резерва. В крови моноциты распределяются на циркулирующий и пристеночный пулы, количественные соотношения которых могут меняться. В периферической крови моноциты составляют от 1 до 10% всех лейкоцитов ($80-600 \times 10^9/\text{л}$). Моноциты циркулируют в кровяном токе от 36 до 104 ч, а затем покидают сосудистое русло, взаимодействуя со специализированными адгезивными молекулами на эндотелиальных клетках. За сутки в ткани из кровяного русла уходит $0,4 \times 10^9$ моноцитов. При воспалении увеличивается количество моноцитов, поступающих в кровь и покидающих кровяное русло, время их транзита через кровь при этом сокращается.

Морфологическая и функциональная характеристика клеточных элементов моноцитарного ряда:

Моноцит – клетка диаметром 14-20 мкм. Ядро светло-фиолетовое, расположено центрально. Характерно разнообразие форм ядра: лопастное, бобовидное, сегментированное, палочковидное. Хроматин рыхлый, светлый, расположен неравномерно. Цитоплазма обильная, сероватого или бледно-голубого цвета, непостоянно присутствуют многочисленные пылевидные азурофильные гранулы.

Макрофаг – диаметр 15-80 мкм. Форма клеток неправильная, ядро овальной или продолговатой формы, хроматин петлистый, распределен неравномерно, цитоплазма обильная, без четких границ, голубоватого цвета с азурофильными гранулами и вакуолями, придающими клетке пенистый вид. Могут содержаться остатки фагоцитированного материала.

Цитохимические маркеры клеток СМФ: неспецифическая эстераза, подавляемая фторидом натрия, кислая фосфатаза, активность которых наиболее высокая в МФ. По мере созревания клеток моноцитарного ряда снижается активность миелопероксидазы, отмечается незначительное

содержание гликогена и липидов. В тканях моноциты дифференцируются в тканевые макрофаги (гистиоциты). В основном обновление макрофагов происходит за счет притока моноцитов из крови. Тканевой пул мононуклеарных фагоцитов в 25 раз превышает их содержание в крови; наибольшее количество макрофагов содержится в печени (клетки Купфера, 56%), легких (15%), селезенке (15%), перитонеальной полости (8%), несколько меньше в центральной нервной системе (клетки микроглии и астроциты), костной ткани (остеокласты) и других тканях. Продолжительность жизни тканевых макрофагов исчисляется месяцами и годами.

Макрофаги, в соответствии с их структурно-функциональными параметрами, разделены на 2 класса: антигенперерабатывающие (профессиональные фагоциты) и антигенпредставляющие (дендритные клетки). Класс профессиональных фагоцитов включает свободные макрофаги соединительной ткани, подкожного жирового слоя, серозных полостей, альвеолярные макрофаги, фиксированные макрофаги печени, центральной нервной системы, костного мозга, селезенки, лимфоузлов. К антигенпредставляющим макрофагам относятся фолликулярные дендритные клетки (ФДК), интердигитальные дендритные клетки, клетки Лангерганса, специфической функцией которых является захват, переработка и представление антигенов лимфоцитам.

Мононуклеарные фагоциты секретируют цитокины и другие биологически активные вещества, регулирующие пролиферацию, дифференцировку и функциональную активность различных клеток. Основные этапы фагоцитоза у моноцитов/макрофагов аналогичны нейтрофилам. Эти клетки участвуют не только в удалении микроорганизмов, но и обломков собственных клеток, апоптотических телец, циркулирующих иммунных комплексов и других молекул. Многие патогенные микроорганизмы в процессе эволюции приобрели способность избегать захвата и переваривания в макрофагах. Так, полисахаридная капсула

пневмококков и клебсиелл предохраняет их от взаимодействия с рецепторами макрофага, возникает устойчивость капсульных бактерий к фагоцитозу. Микобактерии могут быть фагоцитированы, но такой фагоцитоз не сопровождается активацией дыхательного взрыва. Кроме того, микобактерии ингибируют слияние лизосом с фагосомой, что препятствует их перевариванию в макрофагах (незавершенный фагоцитоз). Доза микроорганизмов может быть слишком велика и макрофаги не справляются с их элиминацией.

Захват и переработка (процессинг) антигена макрофагом является началом индукции специфического иммунного ответа. Макрофаги относят к профессиональным антигенпредставляющим клеткам (АПК), способным взаимодействовать с Т-лимфоцитами. Последовательность событий процесса представления (презентации) антигена Т-лимфоцитам следующая. Попавший в клетку антиген, например бактерии, подвергается переработке с образованием отдельных пептидных фрагментов, часть которых соответствует антигенным эпитопам, т.е. имеют специфичность данного антигена. Эти фрагменты в цитоплазме АПК формируют комплексы с собственными антигенами HLA II класса, которые транспортируются к мембране АПК, где и представляются Т-хелперам (CD4+). Другой вариант презентации касается представления эндогенно образующихся антигенов, например, при внутриклеточной репликации вируса. В этом случае вирусные белки образуют комплексы с собственными антигенами АПК HLA I класса, которые транспортируются к мембране и представляются Т-киллерам (CD8+).

Активированные макрофаги продуцируют огромное количество цитокинов, обладающих эффекторной и регуляторной активностью, способных запускать каскад воспалительных реакций. Среди них провоспалительные цитокины (ИЛ-1, ИЛ-6, ИЛ-8, ИЛ-12, ИЛ-18, ФНО- α , интерферон- α , моноцитарный хемотаксический протеин, миграцию ингибирующий фактор) и противовоспалительные цитокины (ИЛ-10,

трансформирующий ростовой фактор β). С высоким уровнем ИЛ-1 связаны лихорадка, анорексия, нейтрофилез, активация эндотелиальных клеток с повышением экспрессии на них молекул адгезии, активация нейтрофилов, усиленный синтез острофазных белков, компонентов комплемента, глюкокортикоидов, синтез коллагена и коллагеназ, активация остеокластов, усиление протеолиза в мышечной ткани.

Многочисленные функции мононуклеарных фагоцитов дают основание считать их ключевыми клетками в инициации и регуляции иммунного ответа, гемопоэза, в реализации неспецифической резистентности организма.

3.2.4. Мегакариопоэз

Дифференцировка и созревание клеток мегакариопоэза происходит в костном мозге, где из коммитированных, морфологически неидентифицируемых, клеток-предшественников – КОЕ-мгкц формируются колонии мегакариоцитарных клеточных элементов. При созревании клетки проходят три морфологически дифференцируемые стадии: мегакариобласт, который не превышает 10% всей популяции, промегакариоцит (около 15%) и мегакариоцит, на его долю приходится от 75 до 85%. Мегакариобласт – самая ранняя морфологически распознаваемая клетка мегакариоцитарного ряда. Процесс преобразования мегакариобластов в мегакариоциты продолжается около 25 ч. Время созревания мегакариоцита составляет примерно 25 ч, а жизненный цикл его – около 10 суток.

Регуляция мегакариопоэза осуществляется по принципу обратной связи: избыток тромбоцитов в крови тормозит тромбоцитопоэз, а тромбоцитопения его стимулирует. Основными регуляторами, стимулирующими мегакариопоэз, являются ИЛ-1, ИЛ-3, ИЛ-4, ИЛ-6, ИЛ-11, фактор стволовых клеток, лейкоз-ингибирующий фактор, ГМ-КСФ, Г-КСФ, эритропоэтин, тромбопоэтин. К факторам, ингибирующим тромбоцитопоэз, относят тромбоцитарный фактор 4, трансформирующий фактор роста $\beta 1$, интерфероны- α и γ и другие ингибиторы.

Морфологическая и функциональная характеристика клеточных элементов мегакариоцитарного ряда. Отличительной чертой клеточных элементов мегакариоцитопоэза является их способность к эндомитозу (полиплоидизации) – делению ядра без деления цитоплазмы, что приводит к появлению гигантского размера клеток (мегакариоцитов). В процессе мегакариоцитопоэза клетки прodelьвают от 3 до 6 эндомитозов, что соответствует плоидности мегакариоцита от $8n$ до $64n$.

Созревание мегакариоцитарных элементов сопровождается накоплением в цитоплазме гранул. В α -гранулах мегакариоцитов содержится значительное количество белков: фактор Виллебранда, тромбоцитарный фактор 4, тромбоспондин, фибриноген, фибронектин, тромбоцитарный ростовой фактор.

Основная функция мегакариоцитопоэза – формирования тромбоцитов, поддержание их количества в кровотоке на постоянном уровне. Мегакариоциты располагаются в костном мозге вблизи костномозговых синусов и по мере созревания внутрь клетки вырастают разделительные мембраны, по которым в дальнейшем происходит деление цитоплазмы на тромбоциты.

Тромбоцит – безъядерная клетка диаметром 2-4 мкм, средний объем 7,5 (от 3 до 10 мкм³). В кровотоке в неактивном состоянии тромбоциты имеют дискоидную форму. При активации клетки приобретают сферичность и образуют псевдоподии и нити. Активные (возбужденные) тромбоциты имеют звездчатую форму с нитевидными отростками – псевдоподиями. Период созревания тромбоцитов в среднем составляет 8 дней, продолжительность пребывания в кровотоке от 9 до 11 дней. В циркуляции находится около 67% тромбоцитов. Располагаются тромбоциты в кровеносном русле в двух позициях – в кровотоке и пристеночно. Тромбоциты – основной компонент тромбоцитарно-сосудистого гемостаза, в котором формируется тромбоцитарный тромб. Тромбоциты способны вызвать локальную вазоконстрикцию, стимулировать репарацию тканей,

участвуют в регулировании местной воспалительной реакции за счет высвобождения соответствующих медиаторов из пулов хранения.

В цитоплазме тромбоцитов расположены гранулы, содержащие пулы хранения различных веществ. В тромбоцитах выделяют 3 вида органелл хранения: α -гранулы, электронноплотные тельца (δ -гранулы) и лизосомы (γ -гранулы). В *α -гранулах* хранится до 30 различных белков, большинство из которых были синтезированы еще в мегакариоцитах: β -тромбоглобулин, фактор 4 тромбоцитов, фактор V, фактор Виллебранда, фибриноген, тромбоспондин, фибронектин, витронектин, α_2 -макроглобулин, P-селектин, фактор роста тромбоцитов (PDGF), ингибитор тканевого активатора плазминогена тип 1 (PAI-1), α_2 -антиплазмин, α_1 -антитрипсин, протеин S и другие. В *плотных тельцах* (δ -гранулы) хранятся субстанции, вызывающие, прежде всего, сосудистые реакции и агрегацию тромбоцитов: нуклеотиды (АТФ, АДФ, АМФ, ц-АМФ, ГДФ), серотонин, адреналин, норадреналин, ДОФАмин, гистамин, Ca^{2+} и другие. Высвобождающиеся из пула хранения АТФ и АДФ быстро метаболизируются в плазме до АМФ и аденозина; последние обладают прямым коронарорасширяющим действием. АДФ является важнейшим физиологическим метаболитом, обеспечивающим первичный гемостаз, стимулируя агрегацию тромбоцитов. В *лизосомах* (γ -гранулы) находятся гидролитические ферменты – пероксидаза, глюкозидазы, галактозидаза, кислая фосфатаза, неспецифическая эстераза. Лизосомы секретируют хранящийся в них секрет только при необратимой активации.

Тромбоциты способны секретировать содержимое гранул как частично при обратимой активации и в процессе трофических взаимодействий с органной капиллярной сетью, так и полностью при реакции освобождения, связанной с необратимой активацией. После дегрануляции цитоплазма тромбоцитов «опустошена». После секреции большинство гранулярных мембран деградирует, гранулы не восстанавливаются, и тромбоциты теряют

свою физиологическую активность. Если они находятся в токе крови, измененная форма способствует их быстрой элиминации в селезенке.

3.2.5. Лимфоцитопоз

Лимфоциты, также проходят начальные этапы дифференцировки в костном мозге. На долю лимфоидных клеток в костном мозге приходится около 10% кариоцитов. Из общей лимфоидной популяции около 60% находится в процессе созревания, остальные – зрелые клетки, готовые к эмиграции или наоборот, мигрировавшие в костный мозг из крови. В крови лимфоциты составляют всего 0,1% от общего пула лимфоцитов, а среди лейкоцитов крови – 20-35%.

Лимфоциты – *клетки иммунной системы*, гетерогенная популяция, отличающаяся по иммунофенотипическим и функциональным характеристикам. На каждой стадии развития клетки иммунной системы экспрессируют на своей поверхности мембранные белки, выполняющие роль рецепторов, молекул адгезии, лигандов, необходимых для функционирования клетки. Мембранные белки, иммунохимически охарактеризованные в качестве маркёров тех или иных клеток, получили обозначение CD (англ. *cluster designation*). Различные субпопуляции Т-лимфоцитов отличаются друг от друга и от В-лимфоцитов набором CD-белков. Отдельные CD-белки обозначают цифрами, например CD1, CD2, CD3. Список CD-антигенов, внесённых в номенклатуру, постоянно пополняется, в настоящее время содержит более 350 CD-антигенов и их подтипов.

В отсутствии контакта с антигеном лимфоциты представляют собой покоящиеся клетки, они не делятся, не секретируют активные вещества, их метаболическая активность минимальна. Морфологически такие клетки представляют собой малые лимфоциты. Только после связывания антигенов происходит активация лимфоцитов, приводящая к их дифференцировке в эффекторные и регуляторные клетки. На каждом лимфоците имеется

уникальный по специфичности рецептор, передающийся дочерним клеткам. В результате возникают клоны, отличающиеся по специфичности рецепторов. Каждый клон настроен на свой собственный антиген, а в совокупности все клоны лимфоцитов узнают огромное множество антигенов, существующих в природе. При попадании в организм антигена в иммунный ответ вовлекается тот клон (обычно группа клонов), клетки которого несут соответствующий рецептор.

Морфологическая и функциональная характеристика клеточных элементов лимфоидного ряда. *Лимфоцит* – диаметр 7-12 мкм. Ядро округлой или бобовидной формы, расположено в центре или эксцентрично. Цитоплазма светло-синяя, с перинуклеарной зоной.

Т-лимфоциты - большая часть лимфоцитов периферической крови; они так названы, поскольку после образования в костном мозге проходят дифференцировку в тимусе. В костном мозге формируются ранние предшественники Т-лимфоцитов, которые затем заселяют тимус и далее периферические лимфоидные органы. Наиболее ранним Т-клеточным маркером является CD7, появление которого на стволовых гемопоэтических клетках указывает на Т-клеточную направленность дифференцировки. Практически одновременно с CD7 начинается цитоплазматическая экспрессия CD2 и CD3. На этом же этапе или близком к нему на Т-клетках появляется мембранный антиген CD5, а затем и CD2. На ранних этапах дифференцировки Т-лимфоцитов может отмечаться экспрессия CD10.

Миграция предшественников Т-лимфоцитов из костного мозга в тимус сопровождается преодолением гематотимического барьера. Под влиянием микроокружения тимуса клетки проходят ряд стадий сначала в кортикальном, затем в медуллярном слое, в ходе которых формируется Т-клеточный рецептор, служащий для распознавания антигена. Этап дифференцировки тимоцитов в медуллярном слое характеризуется появлением мембранных маркеров CD3, CD2, TCR $\alpha\beta$, разделением Т-

лимфоцитов на две субпопуляции – Т-хелперы (CD4+) и цитотоксические клетки (CD8+).

Т-лимфоциты покидают тимус через сосуды кортико-медуллярной зоны и, поступив в кровоток, становятся частью единого пула рециркулирующих Т-лимфоцитов. После ряда последовательных делений дифференцировка заканчивается образованием сенсibilизированных (эффeкторных) Т-хелперов (CD4), либо Т-цитотоксических лимфоцитов (CD8) и формированием клеток памяти (CD45RO+), доля которых составляет почти 50% лимфоцитов.

Основным и наиболее специфичным маркером Т-лимфоцитов является CD3. Менее специфичны, но почти всегда присутствуют на Т-клетках CD7, CD2, CD5. Молекулы CD4 определяют субпопуляцию Т-лимфоцитов – Т-хелперы и CD8 субпопуляцию Т-киллеров (цитотоксические лимфоциты).

Таким образом, дифференцировка Т-лимфоцитов в тимусе приводит: к выбору пути развития Т-клеток, приобретению основных (CD3, CD4, CD8) и сопутствующих рецепторных структур, обеспечивающих пролиферацию и созревание клеток, перегруппировке генов и формированию Т-клеточного рецептора, созреванию основных субпопуляций (Т-хелперы, Т-цитотоксические и регуляторные Т-клетки), а также выходу клеток в периферические органы иммунной системы.

В-лимфоциты проходят дифференцировку в костном мозге, где содержание их выше, чем Т-лимфоцитов и их предшественников. Основной характеристикой В-лимфоцитов является наличие на их мембране рецепторов для распознавания антигенов, основу которых составляют молекулы иммуноглобулинов.

В-лимфоциты в костном мозге проходят *этап антигеннезависимой дифференцировки*. На этой стадии происходит начальный этап перестройки генов тяжелых μ -цепей иммуноглобулинов и появляется на мембране CD19, который является общим (пан – В-клеточным) маркером для всех В-лимфоцитов и участвует в процессах активации клеток. Появление CD19

происходит в клетках, экспрессирующих молекулы HLA-DR. Отличительной чертой следующего этапа дифференцировки В-лимфоцитов является экспрессия на мембране CD10 (CALLA) и цитоплазматического CD22 антигенов. Затем происходит появление цитоплазматических μ -цепей иммуноглобулинов и молекулы CD20: клетка приобретает иммунофенотип **пре-В-лимфоцита**. На этой стадии происходит перестройка генов легких цепей, которая завершает процесс генетических преобразований в В-лимфоцитах. Следствием реаранжировки генов L-цепей является экспрессия полноценного мембранного IgM в сочетании с другими мембранными маркерами. Этот этап соответствует стадии **незрелой В-клетки**. Процесс антигеннезависимой дифференцировки В-лимфоцитов завершается экспрессией IgD, который сосуществует с IgM-рецептором. Присутствие на мембране IgM + IgD, CD19, CD20 антигенов позволяет считать В-лимфоцит **зрелой (наивной) клеткой**. С момента завершения формирования рецепторного комплекса В-клетка приобретает способность взаимодействовать с антигеном. Зрелые наивные В-клетки покидают костный мозг, имея сформированный иммуноглобулиновый рецептор.

В-лимфоциты попадают в циркуляцию и поступают в периферические лимфоидные органы, где при встрече с антигеном они проходят этап антигензависимой дифференцировки. В этих органах они выполняют свои функции, локализуясь в наружных слоях коры лимфатических узлов, краевой зоне и фолликулах белой пульпы селезенки. Продолжительность жизни большинства зрелых В-лимфоцитов в отсутствие антигенной стимуляции составляет несколько месяцев. Основным источником обновления популяции В-лимфоцитов служит костный мозг. Зрелые В-лимфоциты располагают необходимыми мембранными молекулами, чтобы не только распознать антиген, но и эффективно контактировать с другими клетками иммунной системы, молекулами иммуноглобулинов, компонентами комплемента, цитокинами. Лимфоциты экспрессируют на мембране CD19, CD20, CD21, CD22, CD24, CD37, т.е. имеют фенотип периферических В-клеток. Чаще

всего эти клетки содержат мембранные IgM+IgD или IgM. Активационные антигены CD23, CD5, CD38, а также CD10, как правило, отсутствуют. При взаимодействии с антигеном происходит активация и пролиферация В-лимфоцитов, отражением которой является появление на мембране молекулы CD23, повышенная экспрессия HLA-DR, утрата мембранного IgD. Особая группа антигенов, включающая главным образом аутологичные и немногочисленные (преимущественно тимуснезависимые) экзогенные антигены, ведет к появлению экспрессии CD5 в процессе активации В-лимфоцитов. Активированные CD5-CD23+ В-лимфоциты мигрируют в фолликул лимфатического узла, структура которого из-за быстрой пролиферации видоизменяется – появляется зародышевый центр и, так называемая, мантийная зона.

В условиях микроокружения зародышевого центра происходит многоступенчатый процесс антигензависимого созревания и дифференцировки В-клеток. В зародышевом центре часть клеток дифференцируется в *центроциты*, на которых появляются мембранные иммуноглобулины (IgG, IgA или IgE). Если клетка подверглась антигенной стимуляции, то с продукции IgM синтез переключается на IgG, IgA и IgE. Из центроцитов формируются В-клетки памяти и плазматические клетки. Направленность дифференцировки В-лимфоцитов в клетки памяти или в плазматические клетки регулируется в апикальной светлой зоне зародышевых центров. Связывание молекулы CD40 на В-клетках с соответствующим лигандом Т-лимфоцитов ведет к формированию В-клеток памяти. Плазмоцитарная дифференцировка В-лимфоцитов происходит после их взаимодействия с растворимым фрагментом CD23 или с антигеном CD23. Зрелые плазматические клетки выполняют основную функцию – синтез и секрецию иммуноглобулинов, обеспечивающих гуморальную защиту организма. При этом плазматическая клетка теряет большинство В-клеточных мембранных рецепторов, на их поверхности определяется только CD38. Субпопуляция CD5+ В-клеток присутствует на границе зародышевого

центра и внутреннего слоя мантии. Эти клетки способны к дифференцировке в плазмоциты и к переключению классов иммуноглобулинов с IgM на IgG и IgA.

Общими маркерами В-лимфоцитов являются CD19, CD20, CD22, CD79a. Основная функция В-лимфоцитов – реализация гуморального иммунного ответа, в основе которого лежит активация В-клеток и их дифференцировка в антителообразующие плазматические клетки. В процессе ответа происходит переключение синтеза антител с IgM на IgG – антитела, а при иммунном ответе в слизистых оболочках – на IgA-антитела. Антитела нейтрализуют свободные антигены, образуя иммунные комплексы, опсонизируют клетки-мишени фагоцитов и естественных киллеров, активируют комплемент.

В результате иммунного ответа образуются Т- и В-клетки памяти, которые обеспечивают ускоренное развитие реакции на повторное попадание в организм тех же антигенов – вторичный иммунный ответ. Клетки памяти представляют собой малые лимфоциты, обладающие способностью к рециркуляции и большой продолжительности жизни, которая обуславливает длительное сохранение иммунитета к возбудителям инфекционных заболеваний и другим чужеродным агентам. В случае, если лимфоциты не получили комплекса активирующих сигналов, а также после выполнения своих функций или при действии некоторых факторов (радиация, глюкокортикоиды), они подвергаются апоптозу.

Естественные киллеры (NK-клетки) – фракция лимфоцитов, лишенных маркеров Т- и В-клеток, их фенотип CD3-CD16+CD56+. Они не имеют перестройки генов Т-клеточного рецептора, экспрессируют на мембране рецептор к комплементу (C3d), вирусу Эпштейна–Барр (CD21), Fc-рецептор. Содержание этих клеток наиболее значительно в печени и селезенке, незначительно – в лимфатических узлах, костном мозге, легких, лимфоидных фолликулах тонкой кишки. В периферической крови на долю NK-клеток приходится от 5 до 25% лимфоцитов. Морфология этих клеток

соответствует большим гранулярным лимфоцитам – 12–15 мкм в диаметре, имеют азурофильные гранулы в цитоплазме. В гранулах содержатся перфорин – белок, обуславливающий образование пор в мембране клеток-мишеней, гранзимы – ферменты, вызывающие индукцию апоптоза при проникновении в клетки-мишени, хондроитинсульфат А, защищающий НК-клетки от аутолиза. Основная функция естественных киллеров – контактный цитолиз клетки-мишени (инфицированные вирусом, опухолевые и быстро пролиферирующие клетки) с выбросом сигнальных молекул, включающих апоптоз.

3.3. Исследования в лабораторной гематологии

3.3.1. *Общий анализ крови*

Анализ результатов исследования крови составляет неотъемлемое звено в диагностическом процессе. При анализе гемограммы любые изменения трактуют как патологические, что требует тщательного обследования пациента. Они могут иметь неспецифический характер, в этих случаях их используют для динамического наблюдения за больным. При системных заболеваниях кроветворной системы общий анализ крови приобретает первостепенное диагностическое значение.

На показатели крови оказывает влияние эмоциональное состояние пациента, циркадные и сезонные ритмы, положение пациента в момент взятия крови. С увеличением высоты над уровнем моря повышается уровень гематокрита и гемоглобина. Физические упражнения могут приводить к существенным изменениям числа лейкоцитов, что обусловлено гормональными сдвигами. Смена пациентом положения тела (лёжа-стоя) приводит к повышению показателей гемоглобина, гематокрита и числа эритроцитов и лейкоцитов. Этот эффект обусловлен проникновением воды и фильтрующихся веществ из сосудистого русла в ткани в результате повышения гидростатического давления. Выраженные диарея и рвота могут приводить к значительной дегидратации и гемоконцентрации, и наоборот —

после регидратации наблюдают снижение уровня гемоглобина и гематокрита, что может быть ошибочно принято за кровопотерю.

Таблица 3.2

**Показатели периферической крови у взрослых (Приказы МЗ СССР
№960 от 1974 г. и №1175 от 1979 г)**

Показатель	Нормальные значения
Гемоглобин, г/л	мужчины – 130-160 женщины – 120-140
Эритроциты (RBC), $\times 10^{12}/л$	мужчины – 4-5 женщины – 3,9-4,7
Гематокрит, %	мужчины – 40-48 женщины – 36-42
Средний объём эритроцита (MCV), фл, мкм^3	80-100
Среднее содержание гемоглобина в эритроците (MCH), пг	27-31
Средняя концентрация гемоглобина в эритроците (MCHC), г/дл	30-38
Ширина распределения эритроцитов по объёму, (RDW-CV), (%)	11,5-14,5
Ретикулоциты, ‰ (или %)	2-12 (0,2-1,2)
Лейкоциты, $\times 10^9/л$	4-9
Нейтрофилы, %, ($\times 10^9/л$): палочкоядерные сегментоядерные	1-6 (0,04-0,3) 47-72 (2-5,5)
Эозинофилы	0,5-5 (0,02-0,3)
Базофилы	0-1 (0-0,065)
Лимфоциты	19-37 (1,2-3)
Моноциты	3-11 (0,09-0,6)
Плазматические клетки	–
Тромбоциты, $\times 10^9/л$	180-320
Средний объём тромбоцита (MPV), фл	7,4-10,4
Ширина распределения тромбоцитов по объёму (PDW), %	10-20
Тромбокрит (PCT), %	0,15-0,4
СОЭ, мм/ч	мужчины – 2-10 женщины – 2-15

Для устранения или сведения к минимуму влияния этих факторов кровь для повторных анализов необходимо брать в одних и тех же условиях. Кровь для клинического анализа берут у пациента из пальца, вены или из

мочки уха, у новорождённых – из пятки. Кровь следует брать натощак (после примерно 12 час голодания, воздержания от приёма алкоголя и курения), между 7 и 9 час утра, при минимальной физической активности непосредственно перед взятием (в течение 20-30 мин), в положении пациента лёжа или сидя.

3.3.2. Автоматизированное исследование клеток крови

Автоматические счётчики крови оценивают размеры, структурные, цитохимические и другие характеристики клеток. Они анализируют большие популяции клеток в одном образце и имеют несколько различных каналов подсчёта клеточных популяций и концентрации гемоглобина. Гематологические анализаторы позволяют не только автоматизировать процесс подсчёта клеток крови, но и получить дополнительные информативные характеристики клеток крови.

В гематологических анализаторах разных производителей нормальные показатели крови, установленные на приборе, могут существенно варьировать в зависимости от норм, используемых в той или иной стране. Перед началом работы на анализаторе рекомендовано, следуя инструкции прибора, установить референтные показатели в соответствии с нормами, принятыми в нашей стране.

Эритроцитарные параметры. RBC (*red blood cells*) – количество эритроцитов крови ($\times 10^{12}/л$). Считаются все частицы размером более 36 фл. Возможные ошибки подсчета эритроцитов на гематологических анализаторах представлены в табл. 3.3.

Таблица 3.3

Возможные ошибки подсчета эритроцитов на гематологических анализаторах

Ложное повышение	Ложное понижение
гигантские тромбоциты (с объемом более 30 фл); криоглобулинемия	агглютинация эритроцитов; выраженный микроцитоз

высокий лейкоцитоз (более $50 \times 10^9/\text{л}$)	эритроцитов гемолизированные образцы крови
---	---

Криоглобулинемия может наблюдаться у больных миеломой, макроглобулинемией Вальденстрема, злокачественными новообразованиями, лейкозом, лимфопролиферативными и аутоиммунными заболеваниями, вирусным гепатитом, сахарным диабетом. Агглютинация эритроцитов может привести к занижению показателей RBC, увеличению MCV. Это можно проверить по повышенным значениям MCH и MCHC.

Нормобласты (NRBC) – большинство гематологических анализаторов подсчитывает все ядродержащие клетки, поэтому при наличии нормобластов в периферической крови они определяются как лейкоциты и могут быть причиной увеличения WBC и лимфоцитов, т.к. нормобласты имеют размер малого лимфоцита. В этих случаях необходим строгий визуальный контроль и коррекция истинного количества лейкоцитов. Нормобласты появляются в периферической крови при онкогематологических заболеваниях, анемиях (гемолитические, B_{12} - и фолиеводефицитные), тяжелых септических состояниях и интоксикациях. Наличие в крови нормобластов может расцениваться как маркер гипоксии и воспаления.

Hb (hemoglobin) – концентрация гемоглобина (г/дл или г/л) в большинстве гематологических анализаторов определяется фотометрически гемиглобинцианидным или гемихромными методами. Коэффициент вариации при этом не превышает 2%.

Таблица 3.4

Возможные ошибки измерения гемоглобина

Ложное повышение	Ложное понижение
------------------	------------------

высокий лейкоцитоз (более $50 \times 10^9/\text{л}$) присутствие нестабильных гемоглобинов (HbS, HbC) гиперлипидемия гипербилирубинемия криоглобулинемия гемолиз (in vivo) резистентные к лизису эритроциты	Образование микросгустков в пробе крови
--	---

Повышение концентрации гемоглобина наблюдается при реактивных и опухолевых эритроцитозах, обезвоживании.

Снижение концентрации гемоглобина имеет место при анемиях, гипергидратации.

НСТ (*hematocrit*) – гематокрит. Показатель отражает сумму прямо измеренных объемов эритроцитов в единице объема крови. Проблемы «остаточной» плазмы (плазмы, оставшейся между эритроцитами при центрифугировании) в гематологических анализаторах по сравнению с гематокритной центрифугой не существует. Коэффициент вариации для автоматического метода – менее 1%, в сравнении с 1-2% при определении показателя методом центрифугирования.

Повышение гематокрита наблюдается при реактивных и опухолевых эритроцитозах, уменьшении объема циркулирующей плазмы (ожоговая болезнь, дегидратация). *Снижение гематокритной величины* имеет место при анемиях, беременности (второй триместр), гипергидратации.

Таблица 3.5

Возможные ошибки измерения гематокрита

Ложное повышение	Ложное понижение
гигантские тромбоциты (с объемом более 30 фл) криоглобулинемия высокий лейкоцитоз (более $50 \times 10^9/\text{л}$) гипергликемия (> 600 мг/дл) диабетический кетоацидоз	агглютинация эритроцитов выраженный микроцитоз эритроцитов (< 36 фл)

При гипергликемии и диабетическом кетоацидозе отмечается гиперосмолярность плазмы крови. При разведении крови in vitro изотоническим раствором происходит быстрое набухание эритроцитов, что и

вызывает завышение значения гематокрита. В этих случаях определение гематокрита на гематокритной центрифуге является более точным.

MCV (*mean corpuscular volume*) – средний объем эритроцита, выражается в кубических микрометрах (мкм^3) или в фемтолитрах (1 фл = 1мкм^3 или $1 \times 10^{-15}/\text{л}$). MCV определяется большинством гематологических анализаторов благодаря прямой зависимости амплитуды электрического импульса от объема клетки. Вычисляется MCV делением суммы клеточных объемов на число эритроцитов.

В то же время MCV – это средний показатель объема всей популяции эритроцитов, содержащихся в диапазоне от 36-360 фл. Поэтому нормальное значение MCV может быть при наличии у пациента одновременно выраженного макро- и микроцитоза, большом количестве аномальных эритроцитов (например, при серповидно-клеточной анемии; выраженном пойкилоцитозе). В этом случае особую диагностическую важность приобретает анализ эритроцитарной гистограммы и морфология клеток в мазках крови.

Таблица 3.6

Возможные ошибки измерения MCV

Ложное повышение	Ложное понижение
холодовые агглютинины диабетический кетоацидоз гиперосмолярность плазмы гипернатриемия высокий лейкоцитоз (более $50 \times 10^9/\text{л}$) длительное хранение крови (более 8 часов) ретикулоцитоз макротромбоцитоз	повышенное содержание фрагментов эритроцитов в крови вследствие механического гемолиза коагулопатия потребления

MCV является важным показателем в дифференциальной диагностике анемий. На основании MCV анемии разделяют на нормоцитарные (MCV 80-100 фл), микроцитарные (MCV менее 80 фл) и макроцитарные (MCV более 100 фл).

MCV – показатель, отражающий изменения, возникающие в эритроцитах при длительном хранении крови. Изменения в мембране эритроцитов возникают раньше, чем в лейкоцитах и тромбоцитах, поэтому хранение крови более 8 часов вызывает увеличение MCV.

МСН (*mean corpuscular hemoglobin*) – среднее содержание гемоглобина в эритроците (пг), характеризует среднее содержание гемоглобина в отдельном эритроците в абсолютных единицах. Рассчитывается по формуле:

$$МСН = \frac{\text{Гемоглобин (г/л)}}{\text{Количество эритроцитов} \times 10^{12}}$$

В норме МСН составляет 27-31 пг. МСН – более объективный параметр, чем устаревший цветовой показатель, который не отражает синтез гемоглобина и его содержание в эритроците.

Возможные ошибки измерения. Параметр МСН является расчетным, поэтому к ложноповышенным результатам приводят все факторы, влияющие на увеличение значений гемоглобина и снижение количества эритроцитов.

Изменения МСН лежат в основе разделения анемий на нормохромные (МСН – 27-31 пг), гипохромные (МСН менее 27 пг) и гиперхромные (МСН более 31 пг). Снижение МСН наблюдается при анемиях обусловленных нарушением синтеза гемоглобина (железодефицитной анемии, порфирии), повышение – при макроцитарных и особенно мегалобластных анемиях.

МСНС (*mean corpuscular hemoglobin concentration*) – средняя концентрация гемоглобина в эритроците (г/дл). Вычисляется по формуле:

$$МСНС = \frac{\text{Гемоглобин (г/дл)}}{\text{Гематокрит (\%)}} \times 100 \quad (\text{г/дл})$$

Различия между двумя последними индексами заключаются в том, что МСН указывает на массу гемоглобина в одном эритроците и выражается в долях грамма (пикограммах). МСНС показывает концентрацию гемоглобина в одном эритроците, т.е. соотношение содержания гемоглобина к объему клетки. Он отражает насыщение эритроцита гемоглобином и в норме составляет 30-38 г/дл. МСНС не зависит от клеточного объема и является

чувствительным показателем нарушения процессов гемоглинообразования.

Снижение значения МСНС наблюдается при заболеваниях, сопровождающихся нарушением синтеза гемоглиина.

Повышение МСНС выше 38 г/дл встречается редко (врожденный сфероцитоз), т.к. это может закончиться кристаллизацией гемоглиина и гемолизом эритроцита. Чаще всего увеличение МСНС свидетельствует об ошибках, допущенных при измерении пробы (погрешности определения гемоглиина или MCV). Поэтому, данный параметр часто используется в качестве индикатора ошибок, допущенных на аналитическом или преаналитическом этапе работы.

RDW (*red cell distribution width*) – показатель гетерогенности эритроцитов по объему, характеризует степень анизоцитоза. Этот показатель вычисляется большинством современных гематологических анализаторов на основании гистограммы распределения эритроцитов, как коэффициент вариации объема эритроцитов:

$$RDW - CV (\%) = \frac{SD}{MCV} \times 100 ,$$

где SD – стандартное среднеквадратическое отклонение объема эритроцита от среднего значения. На этот показатель влияет MCV, поэтому как при микроцитозе, так и при макроцитозе отмечается тенденция к увеличению RDW-CV.

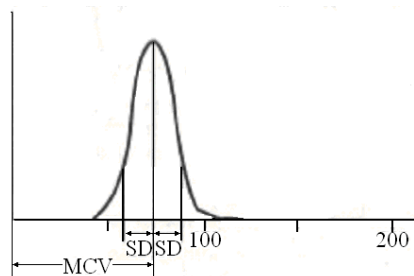


Рис.3.2. Схематическое изображение распределения эритроцитов по объему (MCV), на основании которого рассчитывается показатель анизоцитоза (RDW)

RDW отражает вариабельность эритроцитов по объему. Повышение

RDW предполагает присутствие смешанной популяции клеток (нормоциты и микроциты или макроциты и нормоциты). Анизоцитоз улавливается прибором значительно быстрее, чем при визуальном просмотре мазка крови. Оценка степени анизоцитоза под микроскопом сопровождается целым рядом ошибок. RDW характеризует колебания объема клеток внутри популяции, этот показатель не связан с абсолютной величиной объема эритроцитов. Поэтому, при наличии в крови популяции эритроцитов с измененным, но достаточно однородным размером (например, микроциты), значения RDW могут быть в пределах нормы (11,5-14,5%). В то же время при выраженном анизоцитозе эритроцитов показатель MCV, характеризующий средний объем всей клеточной популяции, является нормальным, а RDW будет повышенным. Таким образом, сочетанное использование двух параметров - RDW и MCV – позволяет точнее характеризовать изменения в периферическом звене эритрона.

Гистограмма – это графическое распределение различных видов клеток по их количеству и объему. Для построения гистограмм гематологические анализаторы подсчитывают миллионы клеток в одном образце, сортируют импульсы по амплитуде и распределяют частицы объемом от 24 до 360 фл по 256 каналам, каждый из которых соответствует объему частиц.

Эритроцитарная гистограмма, как правило, подчиняется закону нормального (гауссова) распределения. Гистограмма должна начинаться и заканчиваться на базовой линии и между нижним и верхним дискриминатором. По горизонтали откладывается объем измеряемой клетки в фл ($1\text{фл}=10^{-15}$ /л), вертикальная ось на графике фиксируется как 100% шкала. Нормальная эритроцитарная гистограмма имеет симметричную (куполообразную) форму (рис. 3.3). При появлении патологических или нескольких популяций эритроцитов форма гистограммы меняется.

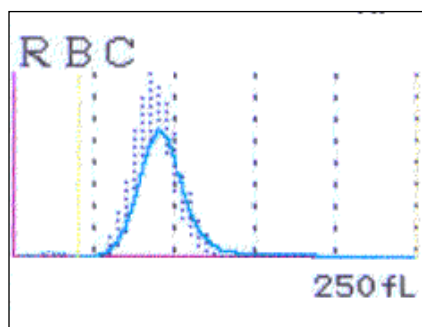


Рис. 3.3. Нормальная эритроцитарная гистограмма имеет симметричную (куполообразную) форму. Гистограмма начинается и заканчивается на базовой линии (пунктирными линиями указана зона расположения нормальной RBC-гистограммы, сплошной – гистограмма конкретного пациента)

Ретикулоцитарные параметры. Ретикулоциты – незрелые эритроциты, содержащие остатки РНК и образующиеся после потери нормобластами ядер. Ретикулоцитоз с резким увеличением фракции незрелых ретикулоцитов на фоне активного эритропоэза отражает повышенную регенераторную способность костного мозга. Сохраняющийся ретикулоцитоз может свидетельствовать о продолжающемся кровотечении. Ретикулоцитопения – индикатор угнетения эритропоэза. Нормализация абсолютного количества ретикулоцитов (RET#) – показатель восстановления пролиферативной активности эритрокариоцитов

Классические параметры ретикулоцитов:

- RET% – относительное количество ретикулоцитов (в %);
- RET# – абсолютное количество ретикулоцитов ($\times 10^9/\text{л}$).

Таблица 3.7

Возможные ошибки измерения ретикулоцитов

Ложное повышение
<ul style="list-style-type: none"> • включения в эритроцитах (тельца Жолли, малярийные паразиты) • высокий лейкоцитоз • аномальные формы гемоглобина • гипертромбоцитоз • гигантские тромбоциты

Показатели, характеризующие степень зрелости ретикулоцитов

LFR% – популяция малых зрелых RET (87-99%),

MFR% – популяция средних RET (2-12%),

HFR% (1-2%) – популяция больших незрелых RET.

MFR+HFR определяется как фракция незрелых ретикулоцитов – **IRF** (*Immature Reticulocyte Fraction*) (2-14%). Показатель служит индикатором активности эритропоэза. Увеличение фракции незрелых ретикулоцитов свидетельствует об ускоренном выбросе незрелых клеток из костного мозга. Фракция незрелых ретикулоцитов повышается как правило, на 2 дня раньше, чем процент ретикулоцитов и может служить наиболее чувствительным маркером в мониторинге за состоянием эритропоэтической активности костного мозга и эффективности лечения витамином В12, фолиевой кислотой, препаратами железа и ЭПО.

Исследование ретикулоцитов используется для:

- оценки активности эритропоэза при состояниях, сопровождающихся гемолизом или кровопотерей;
- детекции нарушения регенераторной способности костного мозга при дефиците железа, витаминов В₁₂, В₆, фолатов, меди и мониторинга терапии;
- оценки состояния эритропоэза на фоне лечения эритропоэтином;
- оценки способности костного мозга к регенерации после цитотоксической терапии и трансплантации костного мозга;
- оценки восстановления синтеза ЭПО после трансплантации почки.

Тромбоцитарные параметры. **PLT** (*platelet*) – количество тромбоцитов. Автоматические счетчики крови анализируют тромбоциты и эритроциты без предварительной обработки. Это создает проблему дифференцирования больших форм тромбоцитов (макротромбоцитов) и сравнимых с ними по объему эритроцитов (микроцитов). Все импульсы, соответствующие размерам частиц от 1,8 до 30,0 фл подсчитываются как тромбоциты. Если доля частиц с объемами в области 30 фл превышает запрограммированный порог, то выводится на экран сообщение «Micro RBC», либо «Macro PLT». При этом достоверность определения количества

тромбоцитов снижена. Для большинства современных гематологических анализаторов коэффициент вариации показателя PLT не превышает 5%.

MPV (mean platelet volume) – средний объем тромбоцитов варьирует от 7,4 до 10,4 фл и имеет тенденцию к увеличению с возрастом. «Молодые» кровяные пластинки имеют больший объем, поэтому при ускорении тромбоцитопоэза средний объем тромбоцитов возрастает. Увеличение среднего объема тромбоцитов наблюдается при идиопатической тромбоцитопенической пурпуре, гипертиреозе, атеросклерозе, сахарном диабете, у курильщиков и лиц, страдающих алкоголизмом, детей с врожденными пороками сердца «синего типа». Крупные тромбоциты с аномальной морфологией появляются при миелопролиферативных заболеваниях. Уменьшение этого показателя отмечается после спленэктомии, рецидиве болезни Крона и неспецифическом язвенном колите.

PDW (platelet distribution width) – ширина распределения тромбоцитов по объему, измеряется в процентах (коэффициент вариации тромбоцитометрической кривой) и количественно отражает гетерогенность популяции этих клеток по размерам (степень анизоцитоза тромбоцитов). В норме этот показатель составляет 10-20%.

Увеличение PDW одновременно со снижением MPV свидетельствует о преобладании микротромбоцитов и указывает на угнетение тромбоцитопоэза. Сочетание повышенного PDW с увеличением MPV отражает нарастание числа макротромбоцитов – усиление продукции тромбоцитов. Увеличение PDW являются диагностическим признаком развития деструктивной тромбоцитопении (идиопатическая тромбоцитопеническая пурпура). Увеличение PDW может наблюдаться при миелопролиферативных заболеваниях. Уменьшение PDW наблюдается при железодефицитной анемии.

PCT (platelet crit – тромбокрит) является параметром, который отражает долю объема цельной крови, занимаемую тромбоцитами, выражается в процентах. В норме тромбокрит составляет 0,15-0,40%. PCT

является чувствительным показателем для оценки риска возникновения кровотечений. Снижение параметра PCT ниже 0,1% коррелирует с возникновением послеоперационных кровотечений у пациентов с развивающейся тромбоцитопенией. Повышение PCT увеличивает риск тромбозов.

Лейкоцитарные параметры. *WBC (white blood cells)* – количество лейкоцитов в крови. Измерение числа лейкоцитов на гематологических анализаторах происходит после полного лизиса эритроцитов специальным реагентом. Все частицы объемом более 35 фл считают как лейкоциты. Коэффициент вариации при автоматическом определении этого показателя составляет 1-3%, в то время как при ручном подсчёте – 6,5-15% в зависимости от числа лейкоцитов.

Гематологические анализаторы 3Diff, анализирующие клетки крови на основе кондуктометрической технологии представляют *гистограмму* распределения лейкоцитов по 3 популяциям; высокотехнологические гематологические анализаторы дифференцируют лейкоциты по 5-ти (5Diff) популяциям и представляют эти популяции в виде *скетогрaмм* в 3-х мерном изображении.

Подсчет лейкоцитарной формулы. Гематологические анализаторы, определяющие 18 параметров крови, дифференцируют все WBC на три популяции (3Diff) и определяют как относительное, так и абсолютное их содержание:

- Лимфоциты, % – LYM% или LY%;
- Лимфоциты, кл/мкл – LYM или LY#;
- Гранулоциты, % – GRN% или GR%;
- Гранулоциты, кл/мкл – GRN или GR#;
- Моноциты, % – MON% или MO%;
- Моноциты, кл/мкл – MON или MO#.

Главным преимуществом автоматического подсчета лейкоцитарной формулы является повышение точности результатов за счет измерения большого количества клеток по сравнению с микроскопическим исследованием. Ограниченное число клеток, анализируемое при подсчете мазка крови, неравномерное распределение лейкоцитов в препарате, использование нестандартных методов подсчета являются главными причинами расхождения результатов обоих методов. В тоже время при микроскопическом исследовании врач дифференцирует лейкоциты не только по их размерам, но и оценивает в полном объеме морфологию клетки (ядерно-цитоплазматическое отношение, структуру распределения хроматина и особенности окраски ядра, наличие зернистости в цитоплазме), что позволяет ему с гораздо большей точностью отнести клетку к тому или иному виду лейкоцитов. Поэтому анализаторы с неполным дифференцированным подсчётом лейкоцитов рекомендовано использовать для динамического наблюдения за состоянием крови пациентов.

Гематологические анализаторы 5 Diff способны осуществлять дифференцированный счёт лейкоцитов по пяти основным популяциям, с использованием различных принципов дифференцирования клеток: нейтрофилы, эозинофилы, базофилы, моноциты и лимфоциты. Некоторые высокотехнологические анализаторы способны оценивать наличие незрелых гранулоцитов, проводить оценку стволовых гемопоэтических клеток и субпопуляций лимфоцитов. Использование таких приборов позволяет повысить точность дифференциального подсчёта лейкоцитов, провести скрининг нормы и патологии, динамический контроль за лейкоцитарной формулой и резко сократить ручной подсчёт лейкоцитарной формулы, оставляя примерно 15–20% образцов крови для световой микроскопии, что связано с неспособностью гематологических анализаторов идентифицировать незрелые гранулоциты и бластные клетки.

3.3.3. Оценка скорости оседания эритроцитов (СОЭ)

Скорость оседания эритроцитов – показатель, входящий в общий анализ крови. СОЭ рассматривается как неспецифический тест, меняющийся в зависимости от целого ряда физиологических и патологических факторов. Основным фактором, определяющим СОЭ, является Z-потенциал на эритроцитарной мембране, который способствует взаимному отталкиванию эритроцитов и поддержанию их во взвешенном состоянии. В то же время белковый состав плазмы влияет на поверхностный заряд эритроцитов, белки блокируют реакционные группы и тем самым меняют СОЭ.

Международным комитетом по стандартизации в гематологии (ICSH) для определения СОЭ рекомендован метод Вестергрена, при классической постановке он проводится на венозной крови в капилляре длиной 200 мм. Серийно выпускаются автоматические и полуавтоматические анализаторы СОЭ, которые на основе кинетических измерений экстраполируют результаты к методу Вестергрена. В нашей стране исторически более распространенным является метод Панченкова, который ставится на капилляре длиной 100 мм, не автоматизирован и не снабжен системой документирования результатов. Хотя метод Панченкова не дорог и прост, он требует не менее 1 ч для выполнения, проводится вручную. Методы Панченкова и Westergren в диапазоне нормальных значений (1-20 мм/ч) хорошо коррелируют между собой. Однако при увеличении значений СОЭ метод Westergren дает более высокие цифры (до 200 мм/ч), это, в частности связано с тем, что метод Панченкова имеет измерительную шкалу лишь до 100 мм.

Клиническое значение. Увеличение СОЭ наблюдается при различных воспалительных процессах, интоксикациях, острых и хронических инфекциях, при инфаркте миокарда, опухолях, после кровопотери, оперативных вмешательств. При острых воспалительных и инфекционных процессах ускорение оседания эритроцитов наступает через 24 ч. Особенно выраженное ускорение СОЭ (60-80 мм/ч) характерно для парапротеинемических гемобластозов (множественная миелома,

макроглобулинемия Вальденстрема, острый плазмобластный лейкоз и др.) и моноклональных парапротеинемий, сопутствующих злокачественным новообразованиям, хроническому гепатиту, циррозу печени, туберкулезу, амилоидозу, коллагенозам. Замедление СОЭ наблюдается при эритремии и симптоматических эритроцитозах.

3.3.4. Исследование пунктата костного мозга

Костный мозг получают посредством аспирационной биопсии в области грудины на уровне третьего-четвертого межреберий или в области рукоятки грудины, а также гребня подвздошной кости. Количество аспирационной взвеси клеток зависит от объема и характера предполагаемых исследований. Для диагностических целей достаточно 0,1-0,2 мл, однако для проведения дополнительных исследований (цитогенетических, иммунологических, культуральных) требуется несколько миллилитров костного мозга.

Нормальный костный мозг кровянистый, содержит небольшое количество мелких белесоватых комочков. Для приготовления хороших препаратов необходимо освободиться от примеси крови, количество которой может быть различное. Учитывая повышенную свертываемость костного мозга, необходимо делать мазки быстро.

Врач, выполняющий пункцию, помещает весь полученный пунктат (не более 0,5 мл) в пробирку, содержащую 1-1,5 мг К₂ЭДТА, тщательно ее перемешивает, маркирует и незамедлительно направляет материал в лабораторию вместе с бланком-направлением. Последующая работа по приготовлению препаратов из пунктата костного мозга выполняется в лаборатории сразу же после получения материала.

Из полученных или приготовленных непосредственно в лаборатории 10 мазков для цитологического исследования отбираются 5, остальные 5 мазков предназначены для цитохимического исследования клеток костного мозга. На первом этапе фиксируются и окрашиваются 3 мазка, если ситуация

требует (при первичном обследовании пациента, сложном для вынесения цитологического заключения случае, наличии большого количества бластов) дополнительно обрабатываются и изучаются все оставшиеся мазки.

Микроскопическое исследование костного мозга (миелограмма).

Исследование костномозговых элементов – *миелограмма* – отражает клеточность костного мозга, процессы пролиферации и дифференцировки отдельных ростков кроветворения, его клеточный состав и функциональное состояние. Характеристика костномозгового кроветворения включает:

- подсчет клеточности костного мозга; процентного состава миелокариоцитов; индексов миелограммы;

- описание миелограммы и морфологических особенностей клеточных элементов гемопоэза.

Подсчет миелокариоцитов в окрашенных мазках костного мозга.

Количество миелокариоцитов считается нормальным, если при просмотре препарата с иммерсионным объективом в каждом поле зрения встречается 15-25 миелокариоцитов. При количестве миелокариоцитов менее 15 в поле зрения, костный мозг оценивается как гипоклеточный, более 25 – гиперклеточный.

Подсчет миелокариоцитов в счетной камере Фукса-Розенталя. Для этого используется взвесь костного мозга в разведении 1:20. Подсчет миелокариоцитов проводится по всей сетке камеры Фукса–Розенталя.

Количество клеток рассчитывают по формуле: $x = \frac{n \cdot 20}{3,2}$, где X – количество миелокариоцитов в 1 мкл; n – количество миелокариоцитов по всей камере; 20 – разведение костного мозга; 3,2 мкл – объем камеры Фукса–Розенталя. Референтные величины: количество миелокариоцитов составляет $50,0 \times 10^6$ – 150×10^6 в 1 л.

Подсчет мегакариоцитов в окрашенных мазках костного мозга.

Подсчет мегакариоцитов в окрашенных мазках костного мозга проводится под малым увеличением. Препарат просматривается в области щеточки, где

преимущественно концентрируются мегакариоциты. Количество в препарате более 3-4 мегакариоцитов считается нормальным. Вычисляется процентное соотношение каждого вида клеток. Дополнительную информацию для оценки костномозгового кроветворения получают при расчете следующих индексов: лейкоэритробластическое соотношение (Л/Э), индекс созревания нейтрофилов (ИСН), индекс созревания эритрокариоцитов (ИСЭ).

Лейкоэритробластическое соотношение (Л /Э). Индекс определяет соотношение всех клеток белого ростка (гранулоцитарного, моноцитарного и лимфоидного) к ядродержащим клеткам эритроидного ряда. В норме соотношение равно 2,1-4,5. Повышение индекса при нормальной или повышенной клеточности пунктата костного мозга расценивается как гиперплазия клеток белого ростка (лейкопоза). При пониженной клеточности костного мозга – как сужение эритроидного ростка. Снижение индекса при высокой клеточности костного мозга является признаком гиперплазии клеток красного ряда; при пониженной клеточности костного мозга – признаком угнетения пролиферации клеток (сужения) белого ростка (лейкопоза). Изменения индекса Л/Э при различных заболеваниях представлены в табл. 3.8.

Таблица 3.8

Изменения лейкоэритробластического индекса

Изменени е индекса	Клеточность костного мозга	Характер изменения гемопоза	Заболевания
Л/Э ↑	Нормальная или высокая	Гиперплазия белого ростка	Сепсис, хронический миелолейкоз, хронический лимфолейкоз и др.
	Низкая	Редукция красного ростка	Апластическая анемия, парциальная красноклеточная аплазия и др.
Л/Э ↓	Нормальная или высокая	Гиперплазия красного ростка	Гемолитические анемии, железодефицитная анемия, мегалобластные анемии и др.
	Низкая	Редукция белого ростка	Агранулоцитоз и др.

Индекс созревания нейтрофилов (ИСН). Индекс отражает соотношение

незрелых и зрелых нейтрофилов костного мозга.

$$ИСН = \frac{\text{ПроМц} + \text{Мц} + \text{МетаМц}}{\text{П/Я} + \text{С/Я}}, \text{ где ПроМц} - \text{промиелоциты; Мц} -$$

миелоциты; МетаМц – метамиелоциты; П/Я – палочкоядерные нейтрофилы; С/Я – сегментоядерные нейтрофилы. В норме соотношение составляет: 0,5-0,9.

Повышение ИСН при нормальной или высокой клеточности костного мозга свидетельствует о задержке созревания нейтрофилов, при сниженной – о повышенной элиминации зрелых нейтрофилов из костного мозга.

Снижение ИСН при повышенной клеточности костного мозга указывает на задержку выхода зрелых нейтрофилов; при бедном костном мозге – на разведение его периферической кровью.

При высокой степени разведения пунктата периферической кровью невозможно адекватно оценить костномозговое клеточное содержание больного.

Индекс созревания эритрокариоцитов (ИСЭ). Показывает соотношение гемоглобинизированных эритрокариоцитов (полихроматофильных и оксифильных) ко всем клеткам эритроидного ряда:

$$ИСЭ = \frac{\text{Полихромат. нормобласты} + \text{оксифильные нормобласты}}{\text{Общее количество эритрокариоцитов}}.$$

Нормальные значения: **0,8–0,9**.

Снижение ИСЭ отражает задержку гемоглобинизации (гипохромные анемии) или увеличение количества молодых форм эритрокариоцитов (дизэритропоэтические анемии).

После дифференцированного подсчета оцениваются морфологические особенности клеток, кинетика созревания и составляется заключение по миелограмме в целом, при обязательном сопоставлении с показателями гемограммы.

Рекомендуемый бланк по клеточному составу костного мозга представлен в табл. 3.9.

Под цифровой частью бланка следует описательная часть с выводами. Прежде чем сделать окончательное заключение о состоянии костного мозга, необходимо соотнести полученные данные с нормой и с результатами исследования периферической крови. В ряде случаев необходимо решить, не разведен ли костный мозг кровью, так как по препарату, сильно разведенному периферической кровью, невозможно достоверно оценить костно-мозговое кроветворение. В таких случаях рекомендуется повторная пункция.

В описательной части обращают внимание на следующие моменты:

- *клеточность* костно-мозгового пунктата;
- *клеточный состав* – мономорфный или полиморфный; если мономорфный, то какими клетками представлен в основном (бластными, лимфоидными, плазматическими и пр.) или отмечается тотальная метаплазия;
- *тип кроветворения* (нормобластический, мегалобластический, смешанный), если имеются мегалобластические элементы, указать в процентах;
- *значение лейко-эритробластического индекса*, в случае отклонения от нормы – пояснить, за счет каких элементов.

Таблица 3.9

Клеточный состав костного мозга
(по В. В. Соколову, и И. А. Грибовой, 1972)

Клеточные элементы	Содержание, %		
	Средние значения	Пределы колебаний	
Бласты	0,6	0,1-1,1	
Миелобласты	1,0	0,2-1,7	
Нейтрофильные	промиелоциты	2,5	1,0-4,1
	миелоциты	9,6	6,9-12,2
	метамиелоциты	11,5	8,0-14,9
	палочкоядерные	18,2	12,8-23,7
	сегментоядерные	18,6	13,1-24,1
Все нейтрофильные элементы	60,8	52,7-68,9	
Эозинофилы всех генераций	3,2	0,5-5,8	

Базофилы всех генераций	0,2	0,0-0,5	
Эритробласты	0,6	0,2-1,1	
Пронормобласты	0,6	0,1-1,2	
Нормобласты:	базофильные	3,0	1,4-4,6
	полихроматофильные	12,9	8,9-16,9
	оксифильные	3,2	0,8-5,6
Все эритроидные элементы	20,5	14,5-26,5	
Моноциты	1,9	0,7-3,1	
Лимфоциты	9,0	4,3-13,7	
Плазматические клетки	0,9	0,1-1,8	
Количество миелокариоцитов (в тыс. в 1 мкл)	118,4	41,6-195,2	
Лейко-эритробластическое отношение	3,3	2,1-4,5	
Индекс созревания нейтрофилов	0,7	0,5-0,9	
Индекс созревания эритрокариоцитов	0,8	0,7-0,9	

Заключение регистрируется на бумажных и электронных носителях, которые хранятся в лаборатории в течение 20 лет. Бланки с результатами цитологического исследования вклеиваются в историю болезни, при использовании информационно-вычислительных систем заключения вводятся в «электронную» историю болезни. Окрашенные мазки костного мозга архивируются и хранятся в течение 20 лет. Выдают препараты из архива только по письменному запросу лечащего врача или другого ответственного сотрудника лечебно-профилактического учреждения.

Клинико-диагностическое значение исследования миелограммы.

Цитологическое изучение пунктата костного мозга позволяет судить о клеточности костного мозга, пролиферативной активности, дифференцировке и лейкоэритробластическом соотношении, а также о морфологии гемопоэтических клеток. Правильная оценка состояния костномозгового кроветворения возможна только при сопоставлении данных миелограммы и гемограммы, так как зачастую активная пролиферация кроветворных клеток в костном мозге может сопровождаться цитопенией из-за повышенной деструкции клеток или задержки их созревания и элиминации из костного мозга.

Опухоли кроветворных органов сопровождаются пролиферацией в костном мозге лейкозных клеток при одновременной редукции других

ростков кроветворения. При *острых лейкозах* в миелограмме отмечается сдвиг до бластных клеток, процент которых определяет наличие острого лейкоза (>20%) или одного из вариантов миелодиспластического синдрома (МДС) (<20%). В процессе лечения анализ миелограммы является одним из необходимых исследований, который позволяет судить о достижении полной ремиссии (<5% бластных клеток) или о развитии костномозгового рецидива (>5% бластов).

При опухолевых заболеваниях гранулоцитарного роста клетки могут иметь морфологические особенности: пельгеризацию или гиперсегментацию ядер, кольцевидность ядер, снижение или отсутствие гранул, гипергранулярность и базофилию цитоплазмы. Одновременное сопоставление данных миелограммы и гемограммы позволяет судить о характере патологического процесса. Наличие активного гранулоцитарного роста в костном мозге и лейкопении свидетельствует о быстрой элиминации гранулоцитов из сосудистого русла в ткани, что может наблюдаться при абсцессах, тяжелых воспалительных заболеваниях. Расширенный гранулоцитарный росток на фоне лейкоцитоза с нейтрофилезом или сдвигом влево до метамиелоцитов или миелоцитов – свидетельство сохранного костномозгового гранулоцитарного резерва, за счет которого и наблюдаются изменения в гемограмме. В то же время такая картина крови может иметь место и при миелопролиферативных заболеваниях (хронический миелолейкоз, сублейкемический миелоз), для подтверждения которых необходимо привлечение цитохимических исследований (активности щелочной фосфатазы, миелопероксидазы). Возможно уменьшение гранулоцитарных клеточных элементов в костном мозге с задержкой их созревания на стадии промиелоцита, миелоцита или метамиелоцита при агранулоцитозе.

Увеличение клеток лимфоцитарного роста может наблюдаться при лимфопролиферативных заболеваниях, вирусных и аутоиммунных процессах. Морфологическими особенностями этих клеток являются:

анизоцитоз клеток и их ядер, расщепленные ядра, неправильный контур ядерной мембраны, высокое ядерно-цитоплазматическое соотношение, извилистость, мозговидность ядер. С целью дифференциальной диагностики опухолевых и реактивных лимфоцитозов необходимо использовать методы иммунофенотипирования.

Гиперплазия клеток эритроидного ростка со сниженным лейкоэритробластическим соотношением может быть парциальной или тотальной и сопровождаться различными изменениями в гемограмме. *Мегалобластический тип кроветворения* характерен для В₁₂-дефицитной и фолиеводефицитной анемии, но может быть в период криза гемолитической анемии, а в сочетании с увеличением числа лимфоцитов, плазмоцитов и мегакариоцитозом возможен при циррозе печени. Замедление синтеза ДНК ведет к остановке митозов на более ранних фазах клеточного цикла, нарушению синхронности созревания ядра и цитоплазмы клетки и гемоглобинизации. При мегалобластическом кроветворении в костном мозге отмечается высокий неэффективный гемопоэз. Основная масса мегалобластов разрушается в костном мозге и лишь небольшая их часть дозревает до мегалоцитов, поступающих в кровь. Степень неэффективного костномозгового эритропоэза можно оценить при цитохимическом исследовании по накоплению PAS-положительного вещества в эритрокариоцитах или по повышению количества сидеробластов.

Резкое увеличение количества эритрокариоцитов в костном мозге может наблюдаться при гемолитических анемиях, особенно в период криза, железодефицитной анемии, остром эритромиелозе, некоторых вариантах миелодиспластического синдрома (МДС). Морфологические особенности эритрокариоцитов (многоядерные эритробласты, кариорексис, асинхронное созревание ядра и цитоплазмы, межъядерные мостики, уродливость ядер и др.) позволяют судить о степени выраженности дисэритропоэза, что имеет значение в дифференциальной диагностике МДС с другими заболеваниями.

Наличие макрофагов с гранулами гемосидерина свидетельствует о

наличии запасов железа в костном мозге. Исследование сидеробластов в костном мозге дает полезную информацию для оценки адекватности накопления железа в организме. Истощение запасов железа происходит при железодефицитной анемии и сопровождается снижением количества сидеробластов. Избыточное накопление железа наблюдается при идиопатическом и приобретенном гемохроматозе, хронической гемолитической анемии, талассемии и МДС, что приводит к увеличению числа сидеробластов. Снижение эритрокарицитов наблюдается при острых и хронических лейкозах, гипопролиферативной стадии ЖДА, апластической анемии, парциальной красноклеточной апластической анемии.

Гиперплазия мегакарицитов возможна при миелопролиферативных процессах, в том числе при идиопатической тромбоцитемии, МДС или трансформации его в острый лейкоз, метастазах злокачественных новообразований в костный мозг, идиопатической или иммунной и аутоиммунной тромбоцитопении. Уменьшение количества мегакариоцитарных элементов часто сопутствует апластическим, иммунным и аутоиммунным процессам, лучевой болезни, острым лейкозам, миеломной болезни, В₁₂-дефицитной анемии, а также может наблюдаться при метастазах рака в костный мозг с остеосклерозом костной ткани.

Гипо- или апластический костный мозг с низким лейкоэритробластическим индексом может иметь место при воздействии лекарственных препаратов, химических веществ, ионизирующего излучения, цитостатической терапии, эндокринных заболеваниях (акромегалия, гипотиреоз), тяжелых авитаминозах, общем истощении.

3.3.5. Цитохимические исследования гемопоэтических клеток

Миелопероксидаза. Миелопероксидаза (МПО) является ферментом – лизосомальной каталазой, катализирующей в присутствии перекиси водорода (H₂O₂) окисление различных субстратов. МПО локализуется преимущественно в специфических азурофильных гранулах в цитоплазме

гранулоцитов и является маркером клеток миелоидного ряда. В клетках МПО участвует в реакции разрушения токсичной перекиси водорода. МПО выявляется в клетках гранулоцитарного ряда, начиная с миелобласта. Активность фермента нарастает по мере созревания клеток. В сегментоядерных нейтрофилах здоровых людей выявляется высокая активность МПО в виде гранул, заполняющих цитоплазму.

Самая высокая активность фермента наблюдается в зрелых эозинофилах. В базофильных промиелоцитах и миелоцитах активность МПО, как правило, высокая, однако, по мере дифференцировки их в зрелые клетки активность фермента снижается. Зрелые базофилы могут быть почти отрицательные по данному признаку. Слабоположительная реакция на МПО наблюдается в различном проценте моноцитов в виде немногочисленных рассеянных гранул. В эритрокариоцитах, лимфоцитах, базофилах и мегакариоцитах МПО не определяется.

Референтные величины. В крови здоровых людей 3-16% нейтрофилов окрашены в реакции на МПО резко положительно, 60-90% – положительно, остальные – слабо положительно.

Клиническое значение. Цитохимическое определение МПО используется главным образом с целью диагностики острых лейкозов. При острых миелобластных лейкозах активность фермента в опухолевых клетках варьирует от умеренной до выраженной в зависимости от степени дифференцировки бластов. Так, при острых миелобластных лейкозах с низкой степенью дифференцировки (M1 по ФАБ классификации) количество МПО-положительных бластов невелико (не превышает 10%), активность фермента в них невысокая. В то же время при остром промиелоцитарном лейкозе (M3 по ФАБ классификации) МПО выявляется практически в 100% бластных клеток и активность ее равноценна таковой в зрелых нейтрофилах. При острых монобластных лейкозах реакция на МПО в опухолевых клетках слабая, при острых лимфобластных лейкозах – отрицательная.

Липиды. В гемопоэтических клетках липиды рассеяны в виде тонкодисперсных образований, которые неразличимы в световом микроскопе без специальной окраски. Стабильные и хорошо воспроизводимые результаты для исследования гемопоэтических клеток получаются при применении метода с суданом черным Б. Липиды обнаруживаются практически во всех лейкоцитах за исключением лимфоцитов. Однако основная масса липидов связана с клетками гранулоцитарного ряда. Они входят в состав специфической зернистости нейтрофильных гранулоцитов, эозинофилов и накапливаются по мере созревания клеток. В миелобластах обычно имеется скудное количество гранул, локализующихся в перинуклеарной зоне, в промиелоцитах их становится несколько больше, в миелоцитах и метамиелоцитах содержание суданофильных гранул высокое. В зрелых нейтрофилах липиды заполняют всю цитоплазму.

На всех стадиях созревания эозинофилов обнаруживаются липиды по периферии специфических гранул с неокрашенной или слабо окрашенной центральной зоной. Большинство незрелых базофилов дают положительную реакцию, по мере созревания клеток содержание липидов в них снижается. Реакция в зрелых базофилах переменна – от слабо положительной до отрицательной. В моноцитах и их предшественниках часто содержится разное число мелких или умеренно крупных гранул, распределенных по всей клетке, с некоторой тенденцией к концентрированию в перинуклеарной зоне или ободке цитоплазмы. В тромбоцитах, как и мегакариоцитах, липиды, как правило, не выявляются. Эритрокарициты, ретикулоциты и зрелые эритроциты не содержат суданофильных гранул.

Референтные величины: большинство нейтрофилов (69-80%) у здоровых людей окрашиваются красителями на липиды интенсивно, 18-36% – средней интенсивности и 10% слабо окрашены. СЦК в нейтрофилах $2,65 \pm 0,33$.

Средний цитохимический коэффициент (СЦК) вычисляют по формуле:

$$СЦК = \frac{1a + 2б + 3в + 4г}{100},$$

где цифры (1, 2, 3, 4) обозначают интенсивность окраски; буквы (а, б, в, г) – число подсчитанных клеток с определенной интенсивностью окраски (цитохимической реакции). Метод полуколичественной оценки является ориентировочным, но позволяет сравнить распределение исследуемых веществ в различных клеточных элементах или в одних и тех же клетках при тех или иных патологических состояниях.

Клиническое значение. Особое значение реакция с суданом черным Б имеет при дифференциальной диагностике острых лейкозов. Обычно липиды выявляются параллельно с миелопероксидазой, но могут обнаруживаться и в менее зрелых миелобластах в отсутствии МПО, т.е. являются более чувствительным маркером миелоидной дифференцировки. В соответствии с ФАБ-классификацией при диагностике острых лейкозов для подтверждения миелоидной природы бластов необходимо выявление 3% и более бластных клеток положительных по МПО и/или липидам.

Уменьшение суданофилии с появлением отдельных сегментоядерных нейтрофилов, не содержащих липиды, отмечается при хроническом миелолейкозе (ХМЛ).

PAS-реакция. Механизм PAS-реакции основан на окислении йодной кислотой гликолевых групп до альдегидов. Альдегидные группировки при взаимодействии с реактивом Шиффа образуют продукт красного цвета.

Мукополисахариды (гликозамингликаны) определяются во всех морфологически идентифицируемых клетках гранулоцитарного ряда в виде PAS-положительного материала, концентрация которого нарастает по мере созревания клеток. Диффузное окрашивание цитоплазмы обычно свойственно наиболее молодым клеткам – миелобластам, промиелоцитам, миелоцитам. В зрелых нейтрофилах содержится много PAS-положительного вещества в виде мелких гранул. В зрелых эозинофилах и базофилах специфические гранулы остаются неокрашенными и резко выделяются на

фоне диффузного окрашивания PAS-положительного материала цитоплазмы.

В моноцитах PAS-положительный материал чаще выявляется в виде мелкой пылевидной зернистости на фоне слабо розового диффузного окрашивания. На всех стадиях дифференцировки клеток эритроидного ряда мукополисахариды не выявляются. В лимфоцитах концентрация мукополисахаридов меньше, чем в гранулоцитах. В норме 10–40% лимфоцитов периферической крови содержат PAS-положительный материал, располагающийся в виде гранул вокруг ядра.

Референтные величины: в 95-100% нейтрофилов PAS-реакция выявляется в диффузной форме. СЦК – 2,09-2,99. От 2 до 33% лимфоцитов содержат PAS-положительное вещество в гранулярной форме. В 3-8% эритрокариоцитов костного мозга определяется PAS-реакция.

Клиническое значение. При диагностике острых миелобластных лейкозов бластные клетки могут быть либо PAS-отрицательные, либо обнаруживать слабодиффузное окрашивание цитоплазмы. Яркое диффузное окрашивание цитоплазмы наблюдается только при остром промиелоцитарном лейкозе. При остром лимфобластном лейкозе (ОЛЛ) бласты содержат гликоген в цитоплазме в виде средних и крупных гранул, располагающихся венчиком вокруг ядра, иногда сливающихся в блоки. Количество клеток с таким характером PAS-реакции сильно варьирует при различных случаях ОЛЛ.

Неспецифические эстеразы. Термином «эстераза» или «неспецифическая эстераза» обозначают ферменты, способные гидролизовать простые эфиры N-свободных спиртов и органических кислот. Все неспецифические эстеразы являются лизосомальными ферментами. Известно несколько видов эстераз или изоферментов эстераз в клетках крови человека.

□-*Нафтилацетатэстераза* обнаруживается во всех клетках миелоидного ряда, начиная с миелобласта. Активность ее выявляется в эозинофилах вне всякой связи с их специфической зернистостью, в

небольшом числе лимфоцитов, эритрокариоцитах, мегакариоцитах и тромбоцитах. Самую интенсивную реакцию дают моноциты и макрофаги. Использование в качестве субстрата нафтил-AS или AS-D-ацетата дает положительный результат в большинстве клеток, но особенно высокая активность выявляется в моноцитах. Активность неспецифической эстеразы в клетках моноцитарного ряда легко ингибируется фторидом натрия, но не подавляется в гранулоцитах. Этот феномен позволяет отличить клетки системы мононуклеарных фагоцитов от клеток других ростков кроветворения, обладающих активностью неспецифической эстеразы. *Нафтил-AS-D-хлорацетат-эстераза* выражена в клетках гранулоцитарного и отсутствует в клеточных элементах моноцитарного и лимфоцитарного ряда. Кислая \square -нафтилацетатэстераза рано выявляется в процессе дифференцировки Т-лимфоцитов и локализуется в виде фокального пятна в цитоплазме этих клеток.

Неспецифическая эстераза (НЭ) – использование в качестве субстрата \square -нафтилацетата позволяет выявить резко положительную реакцию преимущественно в моноцитах; активность неспецифической эстеразы в моноцитах ингибируется фторидом (NaF), а в гранулоцитах не ингибируется.

Клиническое значение. Определение активности неспецифической эстеразы используется для идентификации лейкозных моноцитарных предшественников. Эти клетки проявляют высокую активность неспецифической эстеразы с субстратами бутират, ацетат и AS-D-ацетат, которая в значительной степени ингибируется фторидом натрия. Реакции на нафтол-AS-D-хлорацетатэстеразу по надежности выявления гранулоцитарной направленности дифференцировки сравнимы с пероксидазной реакцией. Реакция на \square -нафтилацетатэстеразу является наиболее достоверной для идентификации монобластного и моноцитарного типов лейкозов.

Кислая фосфатаза. Кислая фосфатаза (КФ) образуется в эндоплазматической сети метаболически активных клеток. Наиболее высокая

активность наблюдается в плазматических клетках, мегакариоцитах, тромбоцитах, моноцитах и макрофагах, гранулоцитарных предшественниках. По мере созревания клеток нейтрофильного и эозинофильного рядов активность КФ снижается. КФ в основном локализуется в первичных гранулах и отсутствует во вторичных. Зрелые нейтрофилы и эозинофилы обладают низкой ферментативной активностью, либо они лишены ее. В лимфоцитах активность КФ весьма переменчива. Положительная окраска проявляется в плазматических клетках, Т-лимфоцитах и особенно бластных клетках при Т-клеточном остром лимфобластном лейкозе, плазмоцитоме, волосатоклеточном лейкозе (ВКЛ). Снижение активности КФ в лимфоцитах отмечается при ХЛЛ и неходжкинских злокачественных лимфомах, увеличение – при инфекционном мононуклеозе.

Клиническое значение. Определение активности КФ имеет значение в диагностике волосатоклеточного лейкоза (ВКЛ). Часто при ВКЛ в клетках выявляется тартратрезистентная кислая фосфатаза (изофермент 5). Активность КФ в лимфоцитах при лимфоме маргинальной зоны селезенки низкая или отсутствует.

Щелочная фосфатаза. Активность *щелочной фосфатазы* (ЩФ) присуща только зрелым клеткам гранулоцитарного ряда, преимущественно нейтрофилам. Изредка в эозинофилах имеет место фоновая окраска цитоплазмы, но не гранул. Базофилы не содержат ЩФ как в норме, так и при патологических состояниях. В лимфоцитах, моноцитах, эритроцитах и тромбоцитах реакция на ЩФ отрицательная.

Клиническое значение. Определение активности щелочной фосфатазы (ЩФ) применяется для дифференциации хронического миелолейкоза (ХМЛ) от других миелопролиферативных заболеваний и реактивных изменений в гемограмме. Активность ЩФ увеличивается при истинной полицитемии, идиопатическом миелофиброзе, бактериальных инфекциях и резко снижаются при ХМЛ. Низкие показатели ЩФ почти всегда обнаруживаются при Ph-положительном ХМЛ, а также при Ph-отрицательном ювенильном

ХМЛ. Лишь гемолитическая и железодефицитная анемии или некоторые вирусные заболевания показывают сравнительно низкий СЦК. У больных с ХМЛ в период ремиссии может отмечаться нормальная или даже повышенная активность ЩФ.

Окраска на сидеробласты. Сидеробласты и сидероциты – это нормобласты (эритробласты) и эритроциты, содержащие в цитоплазме негемоглобиновое железо в виде гранул. Если гранулы свободного железа многочисленные, грубые и располагаются вокруг ядра, образуя кольцо, то такие клетки называются «кольцевидными сидеробластами».

Соединения железа обычно не обнаруживаются в лейкоцитах, тогда как выявление их в эритрокариоцитах информативно для изучения неэффективного эритропоеза и диагностики некоторых вариантов МДС. При этих заболеваниях железо, поступающее в эритробласты, не используется для синтеза гемоглобина и откладывается в эритрокариоцитах, в костномозговых макрофагах в виде гемосидерина или ферритина. Исследование сидеробластов в костном мозге дает полезную информацию для оценки адекватности накопления железа в организме.

Клиническое значение. Истощение запасов железа происходит при железодефицитной анемии и сопровождается снижением количества сидеробластов. Избыточное накопление наблюдается при идиопатическом и приобретенном гемохроматозе, хронической гемолитической анемии, талассемии и МДС, что приводит к увеличению числа сидеробластов. При диагностике МДС отличительным признаком РАКС (рефрактерной анемии с кольцевидными сидеробластами) является присутствие в костном мозге более 15% кольцевидных сидеробластов.

Оценка результатов цитохимических реакций. Значение цитохимических реакций в онкогематологии. Основное применение цитохимические методы находят в диагностике гемобластозов. Использование стандартной панели цитохимических методов – МПО, липидов, PAS-реакции, реакции на неспецифическую эстеразу – в

большинстве случаев бывает достаточной для выявления линейной принадлежности опухолевых клеток, и таким образом для определения варианта острых лейкозов и бластного криза при хроническом миелолейкозе (ХМЛ). В некоторых случаях цитохимические реакции позволяют определить принадлежность клеток к опухолевому клону (определение тартрат-резистентной фракции кислой фосфатазы при волосатоклеточном лейкозе).

Цитохимические реакции в онкогематологии используются для:

- установления варианта острого лейкоза и бластного криза ХМЛ;
- дифференциальной диагностики идиопатического миелофиброза (сублейкемического миелоза) и ХМЛ;
- диагностики волосатоклеточного лейкоза и лимфомы селезенки с отростчатыми лимфоцитами;
- выявления особенностей метаболизма лейкозных клеток.

Цитохимическими маркерами бластов гранулоцитарного ряда являются МПО, липиды и AS-D-хлорацетатэстераза. Содержание этих ферментов в миелобластах сильно варьирует. В некоторых случаях может выявляться 1 или 2 из перечисленных маркеров (чаще липиды). Поэтому, для избегания ошибочного заключения при получении сомнительного результата реакции необходимо проведение двух реакций. Активность AS-D-хлорацетатэстеразы существенно ниже, чем активность МПО, поэтому определение этого фермента представляет меньшую диагностическую ценность. Следует учитывать, что активность МПО у детей до 15 лет и пациентов старше 60 лет ниже, чем у лиц среднего возраста.

Для идентификации монобластов главную роль играет определение неспецифической эстеразы, подавляемой фторидом натрия. Для лимфобластов характерно наличие отрицательной реакции на МПО и положительной PAS-реакции в гранулярной форме.

Оценка активности ферментов в клетке возможна с использованием компьютерного анализа изображения. Применение компьютерного метода в

цитохимии позволяет объективизировать исследование, перейти от описательного метода оценки ферментов в клетках к полуколичественным измерениям.

3.3.6. Проточная цитофлуориметрия, ее диагностическое значение

Проточная цитометрия – современная технология быстрой оценки частиц или клеток в процессе их продвижения в потоке жидкости. Использование нескольких флюоресцентных меток позволяет проводить одновременно многоцветный анализ, когда каждый флюорохром при прохождении через луч лазера испускает свет одной длины волны. Основными задачами проточной цитометрии являются количественная и функциональная характеристика клеток с характеристикой:

- поверхностные антигены;
- внутриклеточные цитоплазматические молекулы — цитокины, бактерицидные белки, сигнальные молекулы, белки цитоскелета);
- внутриклеточные ядерные молекулы (транскрипционные факторы, ядерные белки, ДНК и ее фрагменты, РНК, хромосомы, мембранный потенциал митохондрий, концентрация ионов кальция, активность ферментов и т.д.);
- продукция цитокинов;
- оценка абсолютного числа CD4+ Т-лимфоцитов в стадировании течения ВИЧ-инфекции.

Проточная цитофлуориметрия играет ключевую роль в онкогематологии. Она используется с целью диагностики и мониторинга опухолевой популяции при острых лейкозах и лимфопролиферативных заболеваниях (ЛПЗ), прогноза, подсчета абсолютного количества стволовых гемопоэтических клеток, используемых для последующей аутотрансплантации, диагностики пароксизмальной ночной гемоглобинурии.

Основные диагностические возможности иммунофенотипирования в онкогематологии представлены в табл. 3.10.

Возможности проточной цитофлюориметрии

Клиническое значение	Потенциальные возможности
Диагностика ОЛЛ и ОМЛ (M0, M6, M7); бифенотипического острого лейкоза	Идентификация вариантов острых лейкозов с неблагоприятным прогнозом
Диагностика и дифференциальная диагностика В-клеточных лимфопролиферативных заболеваний (ЛПЗ)	Выявление минимальной остаточной болезни при острых лейкозах и ЛПЗ
Диагностика Т-клеточных ЛПЗ	Подсчет гемопоэтических стволовых клеток пуповинной и периферической крови, костного мозга

На основе концепции соответствия фенотипа злокачественной клетки фенотипу нормального клеточного аналога на каждом уровне дифференцировки представилось возможным выделить ряд иммунологических вариантов (фенотипов), определяющих клеточную природу лейкозов, уровень блока дифференцировки клетки в лейкоемической популяции. В большинстве случаев острых лейкозов бласты имеют иммунофенотип, сравнимый с нормальными гемопоэтическими клетками аналогичных стадий дифференцировки. При ОЛЛ и ОМЛ бластные клетки рассматриваются как злокачественные аналоги нормальных клеток на ранних стадиях лимфо- и миелопоэза. По набору мембранных и цитоплазматических антигенов можно установить линейную принадлежность, стадию дифференцировки и функциональное состояние клетки. Выделяют:

- линейно не ограниченные (не рестриктированные) антигены – их экспрессия не ограничена одной клеточной линией. Это CD34, CD38, HLA-DR, TdT;
- линейно-ассоциированные (линейно-специфические) антигены – специфически экспрессируются на некоторых линиях миелоидной (CD13, CD33, CD117, CD65, МПО, CD14, CD15, CD41, CD42, CD61 и т.д.) или лимфоидной дифференцировки (CD19, CD22, cIg, sIg, CD5, CD3 и т.д.);
- дифференцировочные антигены – отражают стадии дифференцировки клеток (цитоплазматический IgM, κ , λ -легкие цепи Ig, CD34, CD10, CD1a);

- активационные антигены – отражают активацию клеток (CD25, CD38, HLA-DR).

Дифференцировочные антигены могут обнаруживаться на злокачественных клетках в комбинациях, которые очень редко встречаются или не выявляются в нормальном костном мозге.

Лейкемические клетки можно отличить от их нормальных аналогов по ряду критериев. К основным типам фенотипа лейкозных клеток относятся:

- коэкспрессия антигенов нескольких линий, т.е. лимфоидных маркеров при ОМЛ или миелоидных маркеров при ОЛЛ;

- асинхронная экспрессия антигена – одновременная экспрессия «раннего» и «позднего» антигенов, которые в норме находятся на разных этапах дифференцировки клеток, например, CD34 и CD15; CD15 и CD117;

- сверхэкспрессия антигена – плотность распределения антигенов на лейкозной клетке больше, чем на нормальной клетке костного мозга (например, гиперэкспрессия CD10 при ВП ОЛЛ);

- отсутствие или низкий уровень экспрессии антигена, характерного для данной стадии дифференцировки — потеря клеткой ряда поверхностных антигенов, например, утрата CD33 наблюдается в 21% случаев ОМЛ;

- фенотипический профиль, практически не встречающийся в норме.

Измененная экспрессия антигенов отражает генетические нарушения, лежащие в основе опухолевого перерождения клетки, позволяя выявлять атипичные клетки даже при относительно небольшом их содержании в образце. Подобный иммунофенотип лейкозной клетки позволяет проводить мониторинг за остаточной опухолевой популяцией в процессе химиотерапии.

Проточная цитофлюориметрия позволяет исследовать антигены, имеющие прогностическое значение, например, CD38, ZAP-70, CD31 при В-клеточном хроническом лимфолейкозе. Широкое использование в клинической практике моноклональных антител (мабтера, кэмпас, люмиксимаб и др.) значительно улучшило результаты лечения больных

лимфомами. Для успешного их применения необходимо до начала терапии исследовать степень экспрессии антигенов на соответствующих клетках-мишенях (например, CD20 или CD52 при использовании соответственно мабтеры и кэмпаса). В динамике лечения, используя метод проточной цитофлюориметрии, можно проводить мониторинг остаточной популяции опухолевых клеток. Подсчет гемопоэтических стволовых клеток на основании идентификации антигена CD34 широко используется в клинической гематологии, так как они обеспечивают постепенное восстановление костного мозга после интенсивной химиотерапии.

Широкое использование проточной цитофлюориметрии в онкогематологии привело к качественно новой диагностике лейкозов и лимфом, а также к разработке новых подходов в оценке эффективности лечения и мониторинга минимальной остаточной болезни, определяющей дальнейшую тактику ведения больных.

3.3.7. Цитогенетические и молекулярные исследования, диагностическое значение

Материалом для исследования обычно служат метафазные или прометафазные клетки, накопленные *in vitro*. Цитогенетики, изучая кариотипы этих клеток, стремятся определить связь их изменений с фенотипическими проявлениями заболевания и установить вклад перестроек хромосом в обоснование диагноза заболевания и прогноза его течения. Стандартное цитогенетическое исследование дифференциально окрашенных метафазных хромосом имеет ряд объективных ограничений: неоднородность клеточной популяции в отношении митотической активности, индекса спирализации и плохого расхождения хромосом; недоступность для анализа клеток, находящихся в интерфазе. В процессе предварительного культивирования возможен избирательный выход в митоз клеточных клонов, имеющих селективные преимущества роста, что также искажает получаемые результаты. Кроме того, репрезентативность классической цитогенетики из-

за трудоёмкости её методов невысока: обычно исследуют не более 15-20 метафазных пластинок. Цитогенетики все шире используют молекулярные методы кариотипирования, к которым относят:

- гибридизация *in situ* с использованием специфических проб к центромерам;
- метод флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH) с помощью специфических ДНК-зондов;
- метод мягкой гипотонической обработки, оставляющей сохранными клеточную мембрану и цитоплазму клетки и фиксация кислотой или формальдегидом перед иммунохимией (MAC-морфология, антитела, хромосомы);
- метод многоцветного спектрального кариотипирования (SKY).

Метод MAC может быть комбинирован с гибридизацией *in situ* (MACISH), и тогда интерфазные клетки становятся легко обрабатываемым материалом, особенно при заболеваниях, где получить метафазные пластинки трудно. FISH-метод позволяет относительно быстро исследовать сотни интерфазных ядер или метафазных пластинок низкого морфологического качества для выявления перестроек того или иного гена. С помощью SKY-метода проводят анализ всего хромосомного набора в одном эксперименте.

В гематологии применение метода FISH особенно перспективно при лимфопролиферативных заболеваниях с низким митотическим индексом или при Ph-негативных вариантах хронического миелолейкоза, когда этот метод становится единственно возможным для выявления химерного гена *bcr/abl*, а также при дифференциальной диагностике с другими миелолипролиферативными заболеваниями или оценке эффективности терапии. Детальная цитогенетическая характеристика для прогнозирования течения заболевания часто невозможна из-за сложности и множественности хромосомных перестроек. Тогда полезно использовать многоцветное

спектральное кариотипирование (SKY) с ДНК-зондами на весь хромосомный набор клетки.

С помощью ДНК-зондов и гибридизации *in situ* не только определяют хромосомные перестройки, но и проводят генное картирование. Получили распространение пренатальная диагностика и мониторинг беременности. В настоящее время цитогенетическую «прописку» на хромосомах человека получили около 1500 клинических состояний, среди которых предрасположенность к заболеваниям, болезни с конституциональными хромосомными перестройками (идентифицированными или предполагаемыми), злокачественные новообразования (солидные опухоли и гемобластозы), заболевания, ассоциированные с мутациями митохондриальной ДНК. Нет сомнения в том, что хромосомные aberrации маркируют аномалии полового созревания и некоторые наследуемые патологические состояния. Предприняты попытки создания регистра генных компонентов и полигенной специфики таких заболеваний, как диабет и психозы.

Накоплена обширная информация о значительном числе хромосомных нарушений, специфичных для ряда гемобластозов. Выявлен клоновый характер изменений кариотипа гемопоэтических клеток, лежащий в основе развития лейкозов и лимфатических опухолей. Цитогенетический анализ в гематологии стал играть важную роль в диагностике, прогнозировании течения заболеваний и оценке эффективности применяемой терапии. Изменения хромосом при заболеваниях системы крови сложны и затрагивают как количественный состав наборов – численные aberrации, так и структуру отдельных хромосом – структурные aberrации. При типичных для острых и хронических гемобластозов хромосомных aberrациях смена локализации или повреждение структуры генов может приводить к нарушению их экспрессии или к структурно-функциональным изменениям кодируемых ими белков. По-видимому, эти изменения играют интегральную роль в патогенезе, а возможно и в прогрессии лейкоза.

При хроническом миелолейкозе, хроническом лимфолейкозе, хроническом миеломоноцитарном лейкозе, В-лимфосаркоме хромосомные aberrации типа $t(9:22)$, $t(5:12)$, $t(14; 19)$, $t(14; 18)$ приводят к перестройкам *bcr*, *abl*, *tel* или *bcl* генов, химерные белковые продукты которых, меняя характер клеточной пролиферации (при этом, не являясь трансформирующим сигналом), делают клетки бессмертными.

При острых лейкозах повреждения хромосом с локализацией 11q23 (острые лимфоидные и миелоидные лейкозы), 15q22 и 17q12 (острый промиелоцитарный лейкоз и реже – бластный криз хронического миелолейкоза), а также 21q22 (острый миелобластный лейкоз, бластный криз ХМЛ), как правило, видоизменяют генетические факторы транскрипции (*MILL*, *PML*, *RARA*, *AML*) и тем самым нарушают клеточную и тканевую дифференцировку, создавая базу для злокачественной трансформации клеток.

Кроме перечисленных хромосомных aberrаций при лейкозах часто регистрируют мутации генов. Так, мутации семейства протоонкогенов *RAS* бывают в 4% случаев ХМЛ на стадии развёрнутых проявлений заболевания, и в 26% ОМЛ (чаще при остром миеломонобластном лейкозе), сочетаясь с большей продолжительностью жизни больных. Примерно у 20% больных острыми нелимфоцитарными лейкозами отмечены мутации протоонкогенов *FMS* (локализованы на хромосоме 5q33) и повышение тирозинкиназной активности. При ХМЛ частые мутации протоонкогена *TP53* (хромосома 17p13), т.е. утрата аллеля гена *p53*, как правило, сочетаются с бластной трансформацией хронической стадии лейкоза.

3.4. Реактивные изменения крови

Реактивные изменения включают изменения количества клеток в крови, необычную морфологию клеток, а также изменения в кроветворных органах. В большинстве случаев подразумевается увеличение содержания клеток в крови (лейкоцитоз, эритроцитоз, тромбоцитоз), изменения крови

непостоянны, с исчезновением причины показатели крови нормализуются, нет признаков угнетения нормального кроветворения.

Лейкоцитоз. Лейкоцитоз – увеличение количества лейкоцитов более $9 \times 10^9/\text{л}$ крови. Увеличение общего числа лейкоцитов редко характеризуется пропорциональным изменением клеток разных видов, поэтому применяют конкретные термины: нейтрофилез, лимфоцитоз, моноцитоз, эозинофилия, базофилия. Чтобы правильно верифицировать имеющуюся патологию, нужно анализировать абсолютные показатели содержания тех или иных клеток.

Физиологический лейкоцитоз (перераспределительный) связан с приемом пищи, лекарственных препаратов, физическими и эмоциональными нагрузками, воздействиями холода, тепла, наркоза. Он характеризуется переходом лейкоцитов из пристеночного пула в циркулирующий. Этому способствуют такие факторы как повышенное давление крови в капиллярах, нарушение кровотока в мелких сосудах различных органов, подъем уровня адреналина и кортизола. Перераспределительный лейкоцитоз бывает, как правило, незначительным и кратковременным.

Реактивный лейкоцитоз – результат усиления лейкопоэза в ответ на выброс провоспалительных факторов: цитокинов, токсинов, продуктов активации комплемента. Он наблюдается при инфекциях, воспалениях, обширных повреждениях тканей, опухолях, интоксикациях, острых анемиях.

Лейкопения. Лейкопения – уменьшение количества лейкоцитов в крови менее $4,5 \times 10^9/\text{л}$. Возникает обычно как следствие нейтропении, абсолютное содержание нейтрофилов в крови составляет менее $2,0 \times 10^9/\text{л}$. Падение абсолютного числа нейтрофилов ниже $0,5 \times 10^9/\text{л}$ обозначают как агранулоцитоз. Лейкопения – показатель угнетения костномозгового кроветворения, тяжести патологического процесса и низкой реактивности организма. Нейтропения при пониженном содержании лейкоцитов, палочкоядерном сдвиге, токсигенной зернистости нейтрофилов свидетельствует о резком истощении костномозгового гранулоцитарного

резерва и является крайне неблагоприятным прогностическим признаком, так как всегда связана с повышенным риском развития инфекции. Различные вирусные инфекции могут сопровождаться развитием лейкопении с нейтропенией. Иногда лейкопения наблюдается при инфекционном мононуклеозе. Лейкопения с нейтропенией без сдвига лейкоцитарной формулы влево возможна при хронических заболеваниях желудочно-кишечного тракта (холецистит, холангит, гастрит, язвенная болезнь), тяжелых атипичных формах гнойно-септических и воспалительных процессов (хронический сепсис).

Нейтрофилез и нейтропения. *Нейтрофилез* – увеличение количества нейтрофилов в крови более $6 \times 10^9/\text{л}$, что обуславливает физиологический лейкоцитоз и бóльшую часть случаев реактивного лейкоцитоза. Степень выраженности нейтрофильного лейкоцитоза зависит от объема костномозгового и сосудистого резервов, активности костномозговой продукции клеток, интенсивности потребления гранулоцитов в тканях, вирулентности микроорганизмов, характера патологического процесса, состояния защитных систем организма. Время развития нейтрофилеза может исчисляться минутами (демаргинация), часами (выброс нейтрофилов из костного мозга) и сутками (повышение продукции клеток в костном мозге).

Истинное увеличение числа циркулирующих нейтрофилов наблюдается в том случае, если повышенная продукция и выход в циркуляцию нейтрофилов стимулируется на уровне костного мозга. При длительном воздействии факторов, индуцирующих нейтрофилез, происходит истощение костномозгового гранулоцитарного резерва и в кровь выходят молодые клетки нейтрофильного ряда: палочкоядерные, метамиелоциты, миелоциты и промиелоциты – *сдвиг лейкоцитарной формулы влево*. Дифференциальная диагностика между реактивным лейкоцитозом и хроническим миелолейкозом (ХМЛ) обычно несложна, так как в первом случае имеется яркая клиническая картина, а при выздоровлении картина крови нормализуется. В клинически неотчетливых случаях исследуют

активность щелочной фосфатазы нейтрофилов крови (высокая при реактивных состояниях и низкая при ХМЛ). Изменениям количественного состава нейтрофилов может сопутствовать и их морфологические аномалии: токсическая зернистость, вакуолизация цитоплазмы, пикноз и лизис ядер. Таблица 3.11

Клинико-диагностическое значение нейтрофилеза

Вид лейкоцитоза	Патогенетические механизмы	Клинические формы
Реактивный (перераспределительный)	Перераспределение пристеночного и циркулирующего пулов, мобилизация костномозгового пула нейтрофилов Гипоксия	Физическая нагрузка, физиотерапевтические процедуры, боль, стресс, послеоперационные состояния, прием глюкокортикоидов
Стимуляция лейкопоза	Инфекционные агенты, токсины	Острые и хронические анемии (постгеморрагическая, гемолитическая, аутоиммунная) Абсцесс, ангина, скарлатина, отит, пневмония, аппендицит, пиелонефрит, менингит, сепсис, перитонит
	Воспаление и некроз тканей (факторы воспаления и тканевого распада)	Эмпиема плевры, инфаркт органов, атака ревматизма, обширные ожоги и травмы, злокачественные новообразования
Опухолевый	Эндогенные интоксикации Лейкозная пролиферация клеток	Ацидоз, эклампсия, уремия, подагра Лейкозы

Нейтропения при снижении продукции нейтрофилов в костном мозге возникает при апластических состояниях, для которых ведущими в патогенезе является поражение стволовых клеток, повышение супрессорной активности Т-лимфоцитов в отношении гемопоэза и повышенная способность клеток к апоптозу. Характерными изменениями в лейкоцитарной формуле при апластических состояниях являются абсолютная нейтропения и относительный лимфоцитоз.

Снижение продукции нейтрофилов может быть обусловлено уменьшением гранулоцитопоза из-за вытеснения гемопоэтических клеток опухолевыми клетками при остром лейкозе, фиброзной тканью при миелофиброзе или метастазировании злокачественных новообразований в

костный мозг. Клинически нейтропения сочетается с резкой утомляемостью, гипотоническими состояниями, нарушениями сна, голоданием, алиментарной дистрофией. В основе ряда нейтропений может лежать усиленная внутрикостномозговая деструкция нейтрофилов – неэффективный гранулоцитопоз. Классическим примером его является нейтропения при В₁₂-фолиеводефицитной анемии, миелодиспластическом синдроме.

Одной из причин развития нейтропении и агранулоцитоза является реакция на введение лекарственных препаратов. Пенициллины, сульфаниламиды, цефалоспорины и другие препараты могут оказывать прямое токсическое действие на процессы пролиферации гранулоцитов в костном мозге или индуцировать продукцию аутоиммунных антител против клеток-предшественников нейтрофилов. Лейкопения с нейтропенией и наличием антинейтрофильных цитоплазматических антител часто встречается при гранулематозе Вегенера, язвенном колите. Ускоренное разрушение нейтрофилов происходит при спленомегалии. Лейкопения с нейтропенией сопровождает ревматоидный артрит, системную красную волчанку.

Нейтропения может появляться в результате генерализации инфекции, например, при милиарном туберкулезе. Количественные изменения лейкоцитов могут сопровождаться морфологическими аномалиями нейтрофилов в виде асинхронности созревания ядра и цитоплазмы, нарушения гранулогенеза, дефицита ферментативной активности и снижения функциональной способности нейтрофилов. Причины и механизмы развития нейтропений представлены в табл. 3.12.

Эозинофилия и эозинопения. *Эозинофилия* – увеличение количества эозинофилов в крови более $0,4 \times 10^9/\text{л}$ – характерный признак аллергизации организма (бронхиальная астма, атопические экземы, сенная лихорадка, пищевая аллергия). Стойкая значительная эозинофилия может быть вызвана глистными и паразитарными инвазиями, опухолями, коллагенозами, иммунодефицитами (гипер-IgE-синдром). Эозинофилия наблюдается при

воспалительных заболеваниях, аутоиммунных процессах, хронических инфекциях (туберкулез), кожных заболеваниях (экзема, псориаз, пузырчатка, герпес, микозы), при которых присоединяется аллергический компонент (табл. 3.13).

Таблица 3.12

Клинико-диагностическое значение нейтропении

Лейкопении	Патогенетические механизмы	Заболевания и состояния
Функциональные	Угнетающее воздействие бактериальных токсинов на нейтропоз, результат активации макрофагов при вирусных и риккетсиозных инфекциях Ареактивное состояние Перераспределение нейтрофилов в органах Повышенное разрушение нейтрофилов иммунного генеза: гетероиммунные (гаптеновые) Аутоиммунные	Подострый септический миокардит, хронический сепсис, милиарный туберкулез, тяжелое течение инфекционных заболеваний, ОРВИ, грипп, вирусный гепатит Гипотоническое состояние, голодание, длительное недосыпание и стресс, алиментарная дистрофия Анафилактический шок, синдром Фелти Гиперчувствительность к лекарственным препаратам Системная красная волчанка, ревматоидный артрит, лимфопролиферативные заболевания Апластическая анемия
Органические	Недостаточность костномозгового кроветворения Недостаточность нейтропоза при лейкозах Дефицит витамина В ₁₂ и фолиевой кислоты Наследственные формы Экзогенные факторы: цитостатики, ионизирующая радиация, химические агенты	Острые лейкозы и хронические лимфолейкозы, МДС Мегалобластные анемии Наследственная доброкачественная нейтропения, циклическая нейтропения, синдром Чедиака-Хигаси Лучевая болезнь, агранулоцитоз, гипо- и апластические состояния

Таблица 3.13

Клинико-дагностическое значение эозинофилии

Патогенетические механизмы	Заболевания
Инвазия паразитами	Аскаридоз, трихинеллез, токсокароз, эхинококкоз, шистосоматоз, филяриатоз, стронгилоидоз, описторхоз,

Опухолевая пролиферация (повышенная продукция ИЛ-5)	анкилостомидоз, лямблиоз Гиперэозинофильный синдром, лимфогранулематоз, острые и хронические лейкозы, лимфомы, злокачественные новообразования других локализаций, сопровождающиеся метастазами или некрозом
Сенсибилизация организма	Лекарственная аллергия, бронхиальная астма, аллергические дерматиты, ринит, инфекционный эозинофилез.
Патология соединительной ткани	Узелковый периартериит, ревматоидный артрит, системная склеродермия, эозинофильный фасциит
Инфекции	Туберкулез, хламидийная пневмония
Интерстициальные и другие заболевания легких	Саркоидоз, гистиоцитоз из клеток Лангерганса, эозинофильный плеврит, хроническая эозинофильная пневмония

Эозинопения – уменьшение количества эозинофилов в крови менее $0,2 \times 10^9/\text{л}$. Эозинопения встречается на первом этапе воспалительного процесса, при тяжелых гнойных инфекциях, шоке, стрессе, эклампсии, родах, интоксикациях химическими соединениями, тяжелыми металлами, в послеоперационном периоде.

Оценка динамики изменения количества эозинофилов в течение воспалительного процесса имеет прогностическое значение. Эозинопения соответствует началу воспаления, восстановление количества эозинофилов или эозинофилия – началу выздоровления. Однако ряд инфекционных и других заболеваний с высоким уровнем IgE характеризуются эозинофилией после окончания воспалительного процесса, что указывает на незаконченность иммунной реакции с ее аллергическим компонентом. В то же время снижение числа эозинофилов в активной фазе заболевания часто свидетельствует о тяжести процесса и является неблагоприятным признаком. В целом изменение количества эозинофилов в периферической крови является результатом дисбаланса процессов продукции клеток в костном мозге, их миграции и распада в тканях.

Базофилия. Базофилия – увеличение количества базофилов в крови более $0,2 \times 10^9/\text{л}$. Базофилы и тучные клетки участвуют в клеточных воспалительных реакциях замедленного типа в коже и других тканях, вызывая гиперемию, формирование экссудата, повышенную проницаемость капилляров. Эти клетки служат основным источником медиаторов,

запускающих анафилактическую реакцию гиперчувствительности немедленного типа. Дегрануляция базофилов и выделение ими в кровь биологически активных веществ, в том числе фактора хемотаксиса эозинофилов, сопровождается повышением эозинофилов, которое встречается везде, где имеется увеличение числа тучных клеток или повышение их активности. Увеличение содержания базофилов может происходить в секретах дыхательных путей при аллергии, в почках при хроническом интерстициальном нефрите и отторжении трансплантата, при контактном дерматите, хроническом язвенном колите. Базофилия может наблюдаться при аллергических заболеваниях, в ранней фазе ревматизма, при хроническом миелоидном лейкозе, миелофиброзе, эритремии.

Моноцитоз и моноцитопения. *Моноцитоз* – увеличение количества моноцитов в крови более $0,8 \times 10^9/\text{л}$. Реактивный моноцитоз может развиваться при состояниях, характеризующихся персистенцией антигена в организме (табл. 3.14.): при хронических длительных инфекциях, аутоиммунных заболеваниях, реактивных гистиоцитозах, опухолях. Дифференциальную диагностику проводят с острыми лейкозами, имеющими характерные изменения в костном мозге, и хроническими моноцитарными и миеломоноцитарными лейкозами.

Моноцитопения — уменьшение количества моноцитов в крови менее $0,09 \times 10^9/\text{л}$. Моноцитопения встречается при гипоплазии кроветворения.

Таблица 3.14

Клинико-диагностическое значение моноцитоза

Патогенез	Заболевания
Реактивный моноцитоз (усиление пролиферации в костном мозге клеточных элементов моноцитопоза)	Инфекции (подострый септический эндокардит, вирусные, грибковые, риккетсиозные, протозойные инфекции), период реконвалесценции после острых инфекций Хронические инфекции, сопровождающиеся образованием гранулем (туберкулез, сифилис, бруцеллез, саркоидоз) Хронические заболевания кишечника (язвенный колит) Системная красная волчанка, ревматоидный артрит, узелковый периартериит
Опухолевый моноцитоз	Острые и хронические моноцитарный и миеломоноцитарный лейкозы

Лимфоцитоз и лимфоцитопения. *Лимфоцитоз* – увеличение количества лимфоцитов в крови более $4 \times 10^9/\text{л}$). Основными причинами реактивного лимфоцитоза являются вирусные инфекции, хронические бактериальные инфекции, токсоплазмоз. При инфекциях большинство лимфоцитов представлено широкоцитоплазмными клетками, встречаются иммунобласты, лимфоциты с базофильной цитоплазмой (активированные лимфоциты), плазмоциты. Относительный лимфоцитоз с нейтропенией характерен для кори, при этом может сохраняться нормальное количество лейкоцитов. Заболевания соединительной ткани (ревматизм, ревматоидный артрит, системная красная волчанка, склеродермия и др.) сопровождаются лимфоцитозом, среди лимфоцитов встречаются широкоцитоплазмные и плазматизированные клетки, увеличено количество плазмоцитов. Характерная клиническая картина и детский возраст пациентов исключают хронический лимфолейкоз. В неясных случаях иммунофенотипирование выявляет поликлональный характер лимфоцитоза при реактивных состояниях и моноклональный – при ХЛЛ (CD19+CD20+CD23+CD5+) или лейкомизации лимфом.

Инфекционный мононуклеоз – острое вирусное заболевание с выраженной бласттрансформацией лимфоцитов, появлением этих клеток в крови, реактивным лимфаденитом. Инфекционный мононуклеоз вызывается вирусом Эпштейна–Барр. Это В-лимфотропный вирус инфицирует В-лимфоциты через поверхностные антигены CD21, вызывая их пролиферацию, пожизненно персистирует в В-лимфоцитах, обуславливая развитие прочного нестерильного иммунитета. К 25 годам 85% людей инфицированы вирусом. При заболевании происходит пролиферация реактивных Т-лимфоцитов, а также пораженных и реактивных В-лимфоцитов в лимфатической ткани, что приводит к выходу активированных клеток в кровь. Процент атипичных мононуклеаров может варьировать и достигать 60-80% в разгар заболевания с постепенным снижением по мере выздоровления. Для инфекционного мононуклеоза в период

реконвалесценции характерны эозинофилия и моноцитоз, увеличение СОЭ. Заболевание длится 3-4 нед с длительным астеническим синдромом после выздоровления. Атипичные мононуклеары (реактивные или активированные лимфоциты) – это бласттрансформированные лимфоциты, в большинстве своем – реактивные Т-лимфоциты, обеспечивающие противовирусную защиту, а также пролиферирующие В-лимфоциты. Им присущи выраженные анизоцитоз и полиморфизм – различное ядерно-цитоплазматическое соотношение; разнообразная форма ядра, часто моноцитоподобная; сглаженное, гомогенное строение хроматина; различная по объему и окраске цитоплазма, обычно с выраженной краевой базофилией.

Атипичные мононуклеары характерны не только для инфекционного мононуклеоза, количество их возрастает при любых вирусных инфекциях. Во всех случаях инфекционного мононуклеоза рекомендовано обязательное обследование на ВИЧ-инфекцию, так как при ВИЧ-инфекции нередки случаи мононуклеозоподобного синдрома: увеличение лимфатических узлов и количества мононуклеаров в крови.

Лимфоцитопения – снижение лимфоцитов в крови ниже $1,0 \times 10^9/\text{л}$. Причиной лимфоцитопении могут быть острые инфекционные болезни (ВИЧ, туберкулез, гнойные и септические заболевания), иммунодефицитная наследственная патология (болезнь Вискотта-Олдрича, комбинированный иммунодефицит), апластическая анемия, возникающая под влиянием ионизирующего воздействия или химических агентов. Уменьшение лимфоцитов в крови наблюдается при состояниях организма, в которых увеличивается концентрация глюкокортикостероидов (длительная гормонотерапия, заболевание Иценко-Кушинга), при почечной недостаточности, спленомегалии, серьезной патологии печени. У детей и подростков лимфоцитопения возможна в результате алергизации организма и при наследственном иммунодефиците.

Эритроцитоз. Эритроцитоз – увеличение количества эритроцитов крови более $6 \times 10^{12}/\text{л}$ у мужчин и более $5 \times 10^{12}/\text{л}$ у женщин. Эритроцитоз

может быть реактивный (вторичный или симптоматический) и опухолевый (первичный). Различают абсолютные (первичные и вторичные или симптоматические) эритроцитозы, вызванные усилением эритропоэза, и относительные эритроцитозы, характеризующиеся уменьшением объема плазмы. Реактивный эритроцитоз развивается вследствие гиперпродукции эритропоэтина (ЭПО) в ответ на тканевую гипоксию, опухоли, поликистоз почек, стеноз почечной артерии, гидронефроз. Повышение выработки ЭПО является важным критерием дифференциальной диагностики реактивного эритроцитоза от эритремии, при которой уровень ЭПО не увеличен, а усиленный эритропоэз – результат неконтролируемого опухолевого роста. В пользу эритремии свидетельствуют спленомегалия, обнаружение клональных генетических аномалий, лейкоцитоз выше $12 \times 10^9/\text{л}$ при отсутствии инфекций, тромбоцитоз выше $400 \times 10^9/\text{л}$.

Ретикулоцитоз (увеличение количества ретикулоцитов в крови более $80\text{-}90 \times 10^9/\text{л}$ или более 1,2%) наблюдается при постгеморрагической анемии, гемолизе, терапии ЭПО, витамином В₁₂, фолиевой кислотой и других состояниях. Для проведения допингового контроля у спортсменов предлагается использовать показатели гематокрита и ретикулоцитов. Подозрением на прием рЭПО является ретикулоцитоз более 2,4% и гематокрит более 47%.

Эритроцитопения. Эритроцитопения – уменьшение количества эритроцитов в крови менее $4,0 \times 10^{12}/\text{л}$. Эритроцитопения может развиваться вследствие различных причин: кровопотери, апластические анемии, повышенный гемолиз эритроцитов; радиационное облучение; заболевания печени, почек; дефицита гемопоэтических факторов (железо, витамин В₁₂, фолиевая кислота); инфекции, в частности, при туберкулезе. Эритроцитопения часто сопровождается неэффективным эритропоэзом, который проявляется повышенным содержанием и дисплазией эритрокариоцитов в костном мозге, накоплением в них ШИК-положительного материала и гранул железа, повышенным апоптозом.

Ретикулоцитопения имеет место при апластической анемии, парциальной красноклеточной аплазии, метастазах рака в костный мозг, лейкозах, снижении уровня ЭПО, неэффективном эритропоэзе, миелодиспластическом синдроме.

Тромбоцитоз. Тромбоцитоз – увеличение количества тромбоцитов в крови более $400 \times 10^9/\text{л}$. Тромбоцитоз может быть первичным, в результате опухолевой пролиферации мегакариоцитов при хронических миелопролиферативных заболеваниях (ХМПЗ) и вторичным реактивным (табл. 3.15). Реактивный тромбоцитоз возможен при злокачественных новообразованиях, воспалительных заболеваниях, после кровотечений, гемолитических кризов, оперативных вмешательств и спленэктомии. О первичном тромбоцитозе вследствие при остром и хроническом мегакариоцитарных лейкозах увеличение числа тромбоцитов может быть до нескольких миллионов (гипертромбоцитоз). Большая масса клеток приводит к микроциркуляторным нарушениям в результате свертывания крови с последующим развитием геморрагического синдрома.

Тромбоцитопения. Тромбоцитопения — уменьшение количества тромбоцитов в крови ниже $150 \times 10^9/\text{л}$. Тромбоцитопении являются результатом недостаточного образования, повышенного разрушения или потребления тромбоцитов (табл. 316). Различают наследственные и приобретенные тромбоцитопении.

Таблица 3.15

Тромбоцитозы

Тромбоцитоз	Заболевания и синдромы
Реактивный	Спленэктомия, острая кровопотеря и острый гемолиз, после операции, злокачественные новообразования, туберкулез, язвенный колит.
Опухолевый	Миелопролиферативные заболевания (хронический миелолейкоз, миелофиброз, эритремия, мегакариоцитарный лейкоз, идиопатическая геморрагическая тромбоцитемия)

Таблица 3.16

Клинико-диагностическое значение тромбоцитопении

Патогенетические механизмы	Клинические ситуации и патологические состояния
Недостаточное образование тромбоцитов	Гипо- и апластические состояния, лейкозы, метастазы рака в костный мозг, ионизирующее облучение, химиотерапия, дефицит витамина В ₁₂ или фолиевой кислоты.
Повышенное потребление тромбоцитов	Кровопотеря, ДВС, гигантская гемангиома, тромбоз, геморрагическая тромбоцитопения
Повышенная деструкция тромбоцитов	Ауто- и иммунные гемолитические анемии, изоиммунные, гетероиммунные (гаптенные), лекарственные, вирусные, системная красная волчанка, лимфопролиферативные заболевания.
Механические повреждения тромбоцитов	Протезирование клапанов сердца, экстракорпоральное кровообращение
Экзогенная интоксикация	Химические вещества, лекарственные препараты, алкоголь, сепсис
Эндогенная интоксикация	Уремия, тяжелые заболевания печени
Повышенная секвестрация в селезенке (гиперспленизм)	Спленомегалия при циррозе печени, синдроме портальной гипертензии, гистиоцитозах, болезнях накопления, синдроме Фелти, миелопролиферативных заболеваниях, талассемии

Приобретенные тромбоцитопении могут наблюдаться при гиперспленизме, инфекционных заболеваниях, хронической интоксикации любого генеза, гипер- и метапластических поражениях костного мозга, лучевой и цитостатической терапии и сопровождаются геморрагическим синдромом. Среди приобретенных тромбоцитопений наиболее часто встречаются иммунные и аутоиммунные.

Иммунные тромбоцитопении – это группа заболеваний, при которых снижение в крови числа тромбоцитов обусловлено продукцией антитромбоцитарных ауто- или аллоантител и ускоренным разрушением сенсibilизированных тромбоцитов в ретикулоэндотелиальной системе.

Идиопатические тромбоцитопении – этиологический фактор остается неизвестным. Характерно увеличение количества мегакариоцитов, нормальная скорость продукции тромбоцитов и резко укороченная продолжительность их жизни. Изменение морфологии тромбоцитов и показателей гемостаза при тромбоцитопениях независимо от генеза,

довольно однотипны. Отмечается анизоцитоз тромбоцитов, атипичные и гигантские формы, небольшая азурофильная зернистость или полное отсутствие грануломера, базофилия цитоплазмы, так называемые голубые пластинки.

3.5. Заболевания системы кроветворения

3.5.1. Анемии, классификации анемий

Анемия – состояние, характеризующееся снижением концентрации гемоглобина и, в большинстве случаев, количества эритроцитов и гематокрита в единице объема крови.

Критериями для диагностики анемии считаются:

- у мужчин число эритроцитов < 4,0 млн/мкл, Hb < 130 г/л, Ht < 39%;
- у женщин число эритроцитов < 3,8 млн/мкл, Hb < 120 г/л, Ht < 36%;
- у беременных Hb < 110 г/л, Ht < 33%.

Анемия может быть *относительная*, вызванная увеличением объема плазмы (гемодилуция, гиперволемиа), и *абсолютная* – обусловленная изменением количества циркулирующих эритроцитов. Относительная анемия наблюдается при беременности, сердечной недостаточности, трансфузии кровезаменителей, острой кровопотери. Анемии разнообразны по генезу и часто имеют смешанный патогенез. В большинстве случаев анемия – не самостоятельная нозологическая форма, а проявление основного заболевания. Большое разнообразие факторов, лежащих в основе развития анемий, затрудняет их дифференциальную диагностику. На первом этапе диагностического поиска основной целью является определение основного механизма, обуславливающего снижение эритроцитов и гемоглобина. На следующем этапе диагностика направлена на выявление причины анемии. Эти этапы диагностики анемий базируются на данных лабораторного

исследования и зависят во многом как от уровня и качества проведенных исследований, так и от правильной интерпретации полученных результатов. Существует несколько классификаций анемий, основанных на этиологических, патогенетических, гематологических признаках. Для практических целей наиболее удобной является классификация анемий, построенная по патогенетическому принципу.

Патогенетическая классификация анемий:

I. Анемии вследствие кровопотери:

- Острая постгеморрагическая анемия;
- Хроническая постгеморрагическая анемия.

II. Анемии, обусловленные недостаточностью эритропоэза:

- Гипохромные анемии:
 - Железодефицитная анемия;
 - Анемии, связанные с нарушением синтеза порфиринов.
- Нормохромные анемии:
 - Анемии хронических заболеваний;
 - Анемия при хронической почечной недостаточности;
 - Апластические анемии;
 - Анемии при опухолевых и метастатических поражениях костного

мозга.

- Мегалобластные анемии:
 - Анемии, обусловленные дефицитом витамина В12;
 - Фолиеводефицитные анемии.

III. Анемии вследствие усиленного разрушения эритроцитов (гемолитические анемии):

- Анемии, обусловленные внеэритроцитарными факторами:
 - Иммунные гемолитические анемии:
 - Изоиммунные гемолитические анемии;
 - Аутоиммунные гемолитические анемии.

○ Гемолитические анемии, обусловленные механическим повреждением эритроцитов:

• Анемии, обусловленные эритроцитарными факторами:

○ Гемолитические анемии, связанные с нарушением структуры мембраны эритроцитов (эритроцитопатии-наследственные и приобретенные):

- Микросфероцитарная гемолитическая анемия;
- Овалоцитарная гемолитическая анемия;
- Стоматоцитарная гемолитическая анемия;
- Гемолитические анемии, обусловленные нарушением структуры липидов мембраны эритроцитов (акантоцитоз).

○ Гемолитические анемии, обусловленные дефицитом ферментов эритроцитов (эритроцитарные энзимопатии):

○ Гемолитические анемии, связанные с нарушенным синтезом гемоглобина (гемоглобинопатии);

○ Талассемии;

○ Гемолитические анемии, обусловленные носительством аномальных гемоглобинов – (HbS, HbC, HbD, HbE и др.);

○ Гемолитические анемии, обусловленные носительством аномальных нестабильных гемоглобинов.

• Гемолитическая анемия, обусловленная соматической мутацией клеток-предшественников миелопоэза.

• Пароксизмальная ночная гемоглобинурия.

Высокая точность и воспроизводимость результатов, возможность подсчета большого количества клеток и расчетных параметров на гематологических анализаторах, позволили использовать дифференциально-диагностический алгоритм разделения анемий на основании эритроцитарных индексов (рис. 3.4).

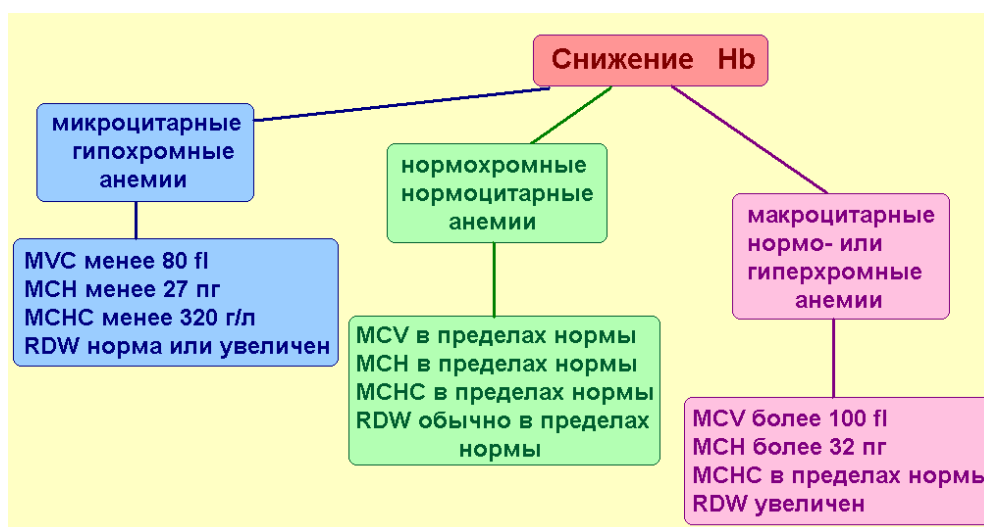


Рис. 3.4. Классификация анемий с использованием эритроцитарных индексов

Постгеморрагическая анемия. Острая постгеморрагическая анемия. Ведущие симптомы обширного кровотечения – остро возникающий дефицит объема циркулирующей крови (ОЦК). В ответ на развитие дефицита ОЦК включаются адаптационные механизмы, направленные на его компенсацию.

Рефлекторная фаза сопровождается спазмом периферических сосудов, который приводит к уменьшению объема сосудистого русла. Происходит перераспределение крови по органам и системам – осуществляется централизация кровообращения, что способствует компенсации дефицита ОЦК. Благодаря выключению периферических сосудов из кровообращения сохраняется кровоток в жизненно важных органах – головной и спинной мозг, миокард, надпочечники.

Уменьшение общего объема сосудистого русла приводит к тому, что, несмотря на абсолютное уменьшение количества эритроцитарной массы, показатели гемоглобина и эритроцитов в единице объема крови приближаются к исходным цифрам и не отражают степень анемизации, не изменяется величина гематокрита, в то время как ОЦК резко снижен. Непосредственно после кровопотери имеет место скрытая анемия. В период

кровотечения в связи с большим потреблением тромбоцитов, которые мобилизуются для его остановки, возможно снижение их содержания.

Фаза компенсации (гидремическая) развивается через 2-3 ч после кровопотери, характеризуется мобилизацией межтканевой жидкости и поступлением ее в кровяное русло. Постгеморрагический период сопровождается выходом эритроцитов из депо и увеличением ОЦК с последующим снижением вязкости крови и улучшением ее реологии. Тем самым создаются условия для восстановления центральной и периферической гемодинамики и микроциркуляции.

Фаза гемодилуции в зависимости от величины и длительности кровопотери может продолжаться от нескольких часов до нескольких дней. Она характеризуется увеличением проницаемости стенок сосудов, что приводит к поступлению в кровяное русло тканевой жидкости. Приток тканевой жидкости восстанавливает ОЦК, снимает спазм периферических сосудов и способствует одновременному, равномерному снижению количества гемоглобина и эритроцитов в единице объема крови.

Развивающаяся спустя 1-2 дня после кровопотери анемия носит нормохромный нормоцитарный характер. Насыщение эритроцитов гемоглобином и его концентрация в одном эритроците зависят от наличия запасов железа в организме. Наибольшие изменения гематологических показателей периферической крови наблюдаются обычно через 4-5 дней после кровопотери. Эти изменения обусловлены активной пролиферацией костномозговых элементов. Через 3-5 дней после кровотечения развивается ретикулоцитоз с резким увеличением фракции незрелых ретикулоцитов (IRF), что на фоне активного эритропоэза отражает регенераторную способность костного мозга, которая становится максимальной к 7-10 дню. Размер эритроцитов после кровотечения несколько возрастает (макроцитоз). Появление полихроматофильных макроцитов приводит к увеличению MCV, и анемия может стать *макроцитарной нормохромной*. Могут появиться эритробласты. После остановки кровотечения нормализация количества

ретикулоцитов отмечается через 2-3 недели. Если количество ретикулоцитов к началу второй недели не снижается, это может свидетельствовать о продолжающемся кровотечении.

Хроническая постгеморрагическая анемия формируется как гипохромная нормоцитарная анемия при длительной умеренной кровопотере, например, при хронических желудочно-кишечных кровотечениях или при гинекологических и урологических заболеваниях.

Гипохромные анемии. Железодефицитная анемия (ЖДА). Распространенность железодефицитных состояний у женщин детородного возраста и детей в некоторых регионах России достигает 30-60%. Хроническая кровопотеря является наиболее частой причиной развития ЖДА. В 500 мл крови содержится 250 мг железа (в 1 мл-0,5 мг), поэтому при продолжающемся кровотечении, происходит значительная потеря железа, несмотря на увеличение всасывания его в кишечнике. При ежедневной потере 6-12 мл крови развивается отрицательный баланс железа. Наиболее частыми источниками кровопотерь являются желудочно-кишечный тракт и мочеполовые органы (миома матки, эндометриоз, функциональные меноррагии). Выделяют латентный дефицит железа и собственно железодефицитную анемию. В первую очередь снижается содержание депонированного железа в органах и тканях, затем транспортного железа, несколько позже – железа гемсодержащих ферментов и затем железа, необходимого для синтеза гемоглобина.

Латентный (скрытый) дефицит железа сопровождается сидеропеническим синдромом, обусловленным тканевым дефицитом железа. Он включает сухость кожи, изменения ногтей, извращение вкуса и обоняния, выпадение волос, кариес, мышечную слабость, отставание в физическом и психомоторном развитии детей. Лабораторные показатели метаболизма железа на этой стадии характеризуются гипоферритинемией, снижением концентрации сывороточного железа, увеличением содержания трансферрина и растворимых рецепторов для трансферрина, а также общей

железосвязывающей способности (ОЖСС). Синтез гемоглобина на этой стадии не нарушен и эритроцитарные показатели (Hb, RBC, MCV, MCH, MCHC) сохраняются в пределах нормы. В случае незначительного снижения MCV, MCH и повышения RDW при нормальной концентрации гемоглобина, можно предположить наличие латентного дефицита железа и исследовать содержание ферритина в сыворотке крови. При трансформации латентного дефицита железа в железодефицитную анемию повышение RDW (показатель анизоцитоза эритроцитов) может предшествовать изменениям других эритроцитарных параметров.

Железодефицитная анемия (ЖДА) проявляется гипоксическим и сидеропеническим синдромами. Дефицит железа в организме приводит к нарушению функции иммунокомпетентных клеток и к нарушению клеточных механизмов иммунорезистентности, что является причиной частых острых респираторных и вирусных заболеваний, особенно у детей. В зависимости от состояния эритропоэтической активности костного мозга различают регенераторную и гипорегенераторную стадии ЖДА.

Регенераторная стадия (гиперпролиферативная) ЖДА характеризуется нормальной клеточностью костного мозга, умеренной гиперплазией клеток красного ряда (количество их достигает 40-60% от общего количества миелокариоцитов), преобладанием базофильных и полихроматофильных эритробластов. Гиперплазия эритроидного ростка обусловлена компенсаторным усилением синтеза эритропоэтина в ответ на тканевую гипоксию. При недостатке железа клетки эритрона синтезируют гемоглобин в меньшей концентрации, что приводит к уменьшению гемоглобинизации цитоплазмы созревающих эритрокариоцитов. Поскольку деление клеток зависит от концентрации гемоглобина, число митозов во время их созревания может быть повышенным и это приводит к образованию не только гипохромных, но и мелких по размеру эритрокариоцитов и, соответственно, ретикулоцитов и эритроцитов (микроцитов). По мере нарушения процессов гемоглобинообразования происходит снижение MCV,

МСН и МСНС. У таких больных эритроцитарная гистограмма имеет вид одиночного пика, значительно сдвинутого в левую сторону, RDW (показатель анизоцитоза эритроцитов) в пределах нормы, либо немного увеличено.

Гипорегенераторная стадия ЖДА характеризуется истощением пролиферативной активности костного мозга, снижением количества сидеробластов, повышением неэффективного эритропоэза, что приводит к снижению количества эритроцитов, появлению популяции красных клеток с увеличенным объемом. Эритроцитарная гистограмма уплощается и значительно растягивается вдоль оси X, указывая на наличие двух популяций эритроцитов - микро- и макроцитов. MCV может увеличиваться, так как является усредненным показателем объема эритроцитов. Присутствие микро- и макроцитов приводит к повышению RDW, что коррелирует с наличием смешанного анизоцитоза в мазках периферической крови. Может наблюдаться анизохромия эритроцитов, а также незначительный пойкилоцитоз. Количество ретикулоцитов снижено, что отражает снижение пролиферативной активности эритроидных клеток.

На фоне приема препаратов железа отмечается незначительное повышение количества эритроцитов, увеличение концентрации гемоглобина, МСН, МСНС, MCV. Показатель анизоцитоза (RDW) значительно повышается, что свидетельствует о гетерогенности популяции эритроцитов. Эритроцитарная гистограмма становится бимодальной, первый пик ее характеризует популяцию с низким объемом (микроциты), второй – появление эритроцитов с нормальным объемом (нормоциты). Максимальный подъем ретикулоцитов приходится на 16-18 день лечения.

ЖДА характеризуется снижением содержания железа, ферритина в сыворотке крови, % насыщения трансферрина железом, повышением концентрации растворимых рецепторов к трансферрину (sTfR), ОЖСС, трансферрина. Информативным показателем оценки метаболизма железа

является коэффициент насыщения трансферрина железом (НТЖ), который рассчитывается по формуле:

$$\text{Насыщение трансферрина железом (\%)} = \frac{\text{железо (мкг / дл)}}{\text{трансферрин (мг / дл)} \times 1,41} \times 100$$

При ЖДА показатель НТЖ снижается менее 15%. Концентрация ферритина в сыворотке крови отражает величину запасов железа в организме. Снижение уровня ферритина (менее 15 мкг/л) наблюдается как при латентном дефиците железа, так и при ЖДА. Все выше перечисленные показатели должны использоваться только в комплексе с гематологическими параметрами, т.к. их изменения наблюдаются при разнообразных заболеваниях. Содержание ферритина в сыворотке крови не всегда отражает истинные запасы железа в организме и часто повышается, независимо от количества депонированного железа, при воспалении, инфекциях, онкологических заболеваниях, заболеваниях печени и других состояниях. В этих случаях определение высокой концентрации sTfR позволяет диагностировать ЖДА. Концентрация растворимых рецепторов к трансферрину отражает потребности преимущественно эритроидных клеток в железе, поэтому в случаях повышения эритропоэтической активности костного мозга и выраженного дефицита железа отмечается повышение их содержания в сыворотке крови. Количество sTfR остается стабильным при воспалительных процессах и беременности.

Анемии, связанные с нарушением синтеза порфиринов (сидеробластные анемии). Развитие анемии обусловлено недостаточной или аномальной утилизацией внутриклеточного железа при синтезе гемоглобина, несмотря на нормальное или даже повышенное содержание железа в митохондриях эритроидных предшественников. Лабораторные исследования выявляют высокую концентрацию железа и ферритина в сыворотке крови и повышенное насыщение трансферрина железом. В костном мозге отмечается гиперплазия эритроидных клеток. Окраска на железо выявляет патогномоничные изменения, обусловленные накоплением

неутилизированного железа в митохондриях эритрокариоцитов – кольцевидные сидеробласты. Наследственные и приобретенные анемии, связанные с нарушением синтеза порфиринов, характеризуются гипохромией, высоким содержанием железа сыворотки и гемосидерозом органов.

Наследственные анемии этого типа встречаются сравнительно редко, преимущественно у мужчин, так как наследование сцеплено с X-хромосомой. Относительно чаще наблюдается форма болезни, вызванная дефектами синтеза δ -аминолевулиновой кислоты. Нарушение образования протопорфирина обуславливает невозможность связывания железа и вследствие этого происходит накопление его в организме. Преимущественное поступление железа в печень приводит к развитию цирроза, в поджелудочной железе – к сахарному диабету, накопление железа в яичках – к евнухоидизму, в надпочечниках – надпочечниковой недостаточности. Содержание ретикулоцитов нормальное или несколько сниженное. Эритроциты гипохромные, отмечается анизоцитоз, пойкилоцитоз, отдельные мишеневидные эритроциты. Для этой анемии характерны признаки неэффективного эритропоеза, который определяется как анемия с относительной или абсолютной ретикулоцитопенией. Содержание железа в сыворотке значительно повышено (до 100 мкмоль/л), трансферрин насыщен железом почти на 100%.

Приобретенные анемии обусловлены нарушением синтеза порфиринов, возникающие чаще при отравлении свинцом или дефиците витамина В6. Свинец блокирует активные центры двух ферментов, участвующих в синтезе гема – синтетазы δ -аминолевулиновой кислоты и феррохелатазы, снижает скорость синтеза α -цепи глобина. Нарушается включение железа в молекулу протопорфирина, увеличивается содержание железа в сыворотке и отложение его в тканях. В периферической крови постепенно снижается содержание гемоглобина до 50-60 г/л, эритроциты с выраженной гипохромией (низкие MCH, MCHC), выявляется анизо-

пойкилоцитоз, появляется базофильная пунктация эритроцитов. Содержание железа в сыворотке крови повышается до 350–550 мкг/дл, насыщение трансферрина железом достигает 100%. В сыворотке крови отмечается высокая концентрация ферритина. Самым характерным биохимическим признаком свинцового отравления является увеличение концентрации в моче δ-аминолевулиновой кислоты и копропорфирина, в эритроцитах повышено содержание протопорфирина.

Нормохромные анемии. *Анемия хронических заболеваний (АХЗ).*

Анемия часто сопровождает хронические инфекционные, ревматические заболевания и неинфекционные заболевания – кишечника, соединительной ткани, множественную миелому и другие злокачественные новообразования. АХЗ занимает по распространенности второе место после железодефицитной анемии. Анемия обычно носит нормохромный нормоцитарный характер, однако гипохромия встречается также часто и иногда анемия становится микроцитарной гипохромной. АХЗ постоянно сопровождается нарушением метаболизма железа: гипоферремией, некоторым снижением концентрации трансферрина в крови и повышением ферритина как в крови, так и в органах и тканях.

Активация иммунной системы при воспалительных, инфекционных и некоторых онкологических заболеваниях антигенными факторами индуцирует синтез провоспалительных цитокинов (ИЛ-1, ФНО-α, ИЛ-6), интерферонов. ИЛ-6 является основным индуктором синтеза гепсидина в печени, который повышается независимо от состояния эритропоэтической активности и изменений в обмене железа. Гепсидин является негативным регулятором как выведения железа из макрофагов, так и всасывания железа в тонком кишечнике. Результатом действия гепсидина является блокада железа в макрофагах, гепатоцитах и энтероцитах, нарушение передачи железа трансферрину и быстрое развитие гипоферремии. Так как всасывание железа и мобилизация его из депо нарушены, а клетки в костном мозге продолжают расходовать железо на свои нужды, то плазменный пул железа быстро

истощается, вызывая гипоферремию. При продолжительной гипоферремии развивается железодефицитный эритропоэз.

Ряд цитокинов (ИЛ-1, ФНО- α , ТФР- β) подавляют экспрессию гена эритропоэтина (ЭПО) в клетках почек и печени, у больных АХЗ отмечается неадекватно низкая продукция ЭПО. При АХЗ пролиферативная активность костномозговых эритроидных клеток нарушена. Повышенный гемолиз эритроцитов при АХЗ связывают с действием ИЛ-1 и ФНО- α .

Анемия при АХЗ чаще нормохромная нормоцитарная, реже умеренно гипохромная или гипохромно-микроцитарная. Число ретикулоцитов нормальное или снижено, ретикулоцитарный индекс продукции снижен, что отражает сниженную пролиферативную активность костного мозга. Повышен уровень протопорфирина в эритроцитах. Изменения метаболизма железа характеризуются **перераспределительным дефицитом железа** (снижение сывороточного железа, ОЖСС, трансферрина, НТЖ и повышение содержания сывороточного ферритина). Ферритин относится к острофазным белкам, поэтому повышенный уровень сывороточного ферритина при АХЗ может отражать не только запас железа в организме, но и явиться проявлением острофазного ответа, что ограничивает его использование в качестве показателя определения запасов железа. В большинстве случаев АХЗ повышены и другие белки острой фазы. Количество sTfR остается стабильным при воспалительных процессах.

Анемия при хронической почечной недостаточности. Анемия – один из наиболее характерных синдромов, сопровождающих течение хронической почечной недостаточности (ХПН). Степень выраженности анемии не всегда коррелирует с уремией, тем не менее, при снижении клиренса креатинина ниже 30 мл/мин величина гематокрита всегда ниже 30%.

Основное значение в развитии нефрогенной анемии принадлежит абсолютному или относительному дефициту эндогенного эритропоэтина (эЭПО). ЭПО относится к гемопоэтическим факторам роста, который

регулирует продукцию эритроцитов в зависимости от потребности организма в кислороде. Другой важной функцией ЭПО является предотвращение апоптоза клеток-предшественников эритропоэза на поздних стадиях развития, поэтому недостаточный уровень ЭПО приводит к увеличению объема неэффективного эритропоэза, что подтверждается повышением количества PAS-положительных эритроидных клеток в костном мозге. Недостаточная продукция ЭПО в почках является главным фактором развития нефрогенной анемии. Вместе с тем, хотя и не решающую роль, в патогенезе анемии при ХПН играют уремические токсины, которые неспецифически ингибируют пролиферацию и дифференцировку эритрокариоцитов. В качестве предполагаемых ингибиторов эритропоэза выступают паратиреоидный гормон, спермин и другие факторы.

В периферической крови наблюдается анемия, которая имеет характер нормоцитарной нормохромной. Количество ретикулоцитов при нефрогенной анемии обычно нормальное или незначительно повышено и зависит о степени активности костномозгового эритропоэза. На фоне длительного гемодиализа, вследствие кровопотерь, анемия может стать гипохромной микроцитарной. В мазках крови наблюдается пойкилоцитоз различной степени выраженности с преобладанием эхиноцитов (шиповидные эритроциты). Лечение больных ХПН препаратами рекомбинантного эритропоэтина приводит к частичной коррекции анемии, однако вследствие стимуляции эритропоэза может развиваться ЖДА, что диктует необходимость исследовать метаболизм железа в динамике проведения терапии рЭПО.

Апластические анемии. Апластическая анемия (АА) – заболевание, характеризующееся резким угнетением костномозгового кроветворения, торможением процессов пролиферации и дифференцировки клеточных элементов с развитием глубокой панцитопении в периферической крови. Апластические анемии могут быть врожденными и приобретенными. Врожденная форма АА (анемия Фанкони) сочетается с другими наследственными аномалиями. Приобретенные формы АА связаны с

действием ионизирующей радиации, лекарственных препаратов (антибиотики, сульфаниламидные, антитиреоидные, противосудорожные, противотуберкулезные), препараты золота, химические соединения (бензол и его производные, этилированный бензин, пестициды), вирусы гепатитов А, В, С, вирус Эпштейна-Барр, цитомегаловирус, ВИЧ. Доказана способность вирусов гепатита А, В, С ингибировать рост колоний и дифференцировку клеток-предшественников. Гепатитассоциированная АА является следствием иммунной агрессии в отношении гемопоэза. Изменение функции тимуса нередко сопровождается возникновением парциальной красноклеточной аплазии. В большинстве случаев АА этиологический фактор остается неизвестным (*идиопатические АА*).

Критериями диагноза АА являются:

- трехростковая цитопения: анемия (Hb <110 г/л), гранулоцитопения (гранулоциты < 2,0x10⁹/л), тромбоцитопения (тромбоциты <100x10⁹/л);
- снижение клеточности костного мозга и отсутствие мегакариоцитов в пунктате костного мозга;
- преобладание жирового костного мозга по данным исследования трепанобиоптата.

Эритропоэз характеризуется абсолютным уменьшением количества эритрокариоцитов и нарушением их дифференцировки. Количество сидеробластов и сидероцитов в костном мозге значительно возрастает. Резко снижено количество мегакариоцитов, а в тяжелых случаях они могут отсутствовать. Поражение костного мозга имеет очаговый характер. В местах опустошения активный костный мозг замещается жировой и/или фиброзной тканью. Однако, даже при крайне тяжелом угнетении гемопоэза возможны активные очаги кроветворения.

Периферическая кровь характеризуется выраженной нормохромной анемией с резким снижением концентрации Hb (25-80 г/л), количества эритроцитов (0,7-2,5x10¹²/л), умеренным анизоцитозом с тенденцией к макроцитозу, пойкилоцитозом. Характерным для АА является выраженная

лейкопения (до $2,5-0,55 \times 10^9/\text{л}$) с абсолютной нейтропенией и относительным лимфоцитозом. В случае присоединения инфекции может наблюдаться сдвиг влево до миелоцитов. Резко выражена тромбоцитопения ($2-25 \times 10^9/\text{л}$), иногда в мазках периферической крови тромбоциты могут отсутствовать. В большинстве случаев АА ускорена СОЭ. На фоне частых гемотрансфузий при АА изменения в метаболизме железа характеризуются повышением содержания сывороточного железа и НТЖ, что ведет к развитию гемосидероза.

Мегалобластные анемии. В12 – дефицитная анемия. При дефиците витамина В12, несмотря на эритроидную гипеплазию костного мозга, продукция эритроцитов снижена, что приводит к анемии. Это обусловлено резким повышением неэффективного эритропоэза и разрушением эритроидных предшественников в костном мозге. Кроме того, продолжительность жизни мегалобластов в 2-4 раза меньше нормальной, поэтому большинство клеток, не созревая, погибают в костном мозге. Результатом мегалобластического кроветворения является развитие *макроцитарной гиперхромной анемии* (концентрация Нв может снижаться до 25-40 г/л). Количество эритроцитов резко снижено ($1,0-1,5 \times 10^{12}/\text{л}$). Отмечается высокий цветовой показатель (1,1-1,4), увеличение среднего объема эритроцитов (MCV >100 фл) и среднего содержания гемоглобина в эритроците (МСН>32 пг), при нормальных значениях средней концентрации гемоглобина в одном эритроците (МСНС).

Диагноз В₁₂-дефицитной анемии может быть установлен только при морфологическом исследовании костного мозга, которое следует проводить до введения витамина В₁₂. Инъекция витамина В₁₂ в течение 1-2 суток изменяет тип кроветворения в костном мозге. Мегалобласты уменьшаются в размерах, меняется структура ядра, клетки становятся макронормобластами. Только по присутствию гигантских форм нейтрофилов можно предположить, что имело место мегалобластическое кроветворение.

Фолиеводефицитная анемия. Фолаты, также как и витамин В₁₂, занимают ключевое положение во многих видах клеточного метаболизма, включая синтез аминокислот и нуклеиновых кислот, особенно необходимых для пролиферирующих клеток. Коэнзимы фолиевой кислоты необходимы для образования пуриновых соединений, биосинтеза метионина.

Причины развития дефицита фолиевой кислоты:

- Снижение содержания в пище;
- Алкоголизм, голодание, «чай с бутербродами»;
- Длительная кулинарная обработка пищи;
- Нарушение всасывания;
- Хронический энтероколит, резекция тонкой кишки, диабетическая энтеропатия;
- Алкоголизм, целиакия, тропический спру, амилоидоз;
- Недоношенные дети, находящиеся на искусственном вскармливании;
- Повышение потребности;
- Беременность;
- Гемолиз, лейкозы, рак, туберкулез, гипертиреоз;
- Уменьшение запасов в печени;
- Алкоголизм, цирроз, гепатоцеллюлярный рак;
- Лекарственные препараты (нарушение утилизации);
- Цитостатики;
- Контрацептивы;
- Противосудорожные;
- Противотуберкулезные препараты;
- Препараты для лечения гиперлипидемии.

Изменения в крови и костном мозге аналогичны В₁₂-дефицитной анемии. В сыворотке крови отмечается снижение уровня фолата (норма 6-20 нг/мл), концентрация его уменьшена и в эритроцитах (норма 160-640 нг/мл).

Гемолитические анемии. Наследственные гемолитические анемии, связанные с нарушением структуры мембраны эритроцитов. Микросфероцитарная гемолитическая анемия (болезнь Минковского-Шоффара) наследуется по аутосомно-доминантному типу, чаще встречается гетерозиготная форма. Распространена практически повсеместно, во всех расовых группах. Чаще всего болезнь проявляется в возрасте 3-15 лет, могут наблюдаться спорадические формы микросфероцитарной анемии. Наиболее распространена аутосомно-доминантная форма, связанная с нарушением взаимодействия спектрина с анкирином и белком 4.2, или дефицитом белка 4.2, или с комбинированным дефицитом анкирина и спектрина. Слабое взаимодействие трансмембранных белков может приводить к фрагментации мембраны, снижению площади поверхности мембраны, повышению ее проницаемости, увеличению содержания в клетке осмотически активных веществ. Повышенная проницаемость мембраны эритроцитов для ионов натрия, воды в конечном итоге изменяет объем клетки. Наследственный сфероцитоз – результат дефекта в каком-либо белке, участвующем в формировании вертикального взаимодействия между внутренним цитоскелетом, сформированном на спектрине, и трансмембранными белками.

Циркулирующие микросфероциты имеют низкую продолжительность жизни (до 12-14 дней), сниженную осмотическую и механическую резистентность. Через 2-3 пассажа через селезенку сфероцит подвергается фагоцитозу макрофагами (внутриклеточный гемолиз). Развивается вторичная спленомегалия, которая усугубляет гемолитический процесс. После спленэктомии срок пребывания сфероцитов в крови значительно возрастает.

Основной признак заболевания – гемолитический синдром, который проявляется желтухой, спленомегалией и анемией. Возникновение заболевания в детском возрасте нарушает нормальное развитие организма, в результате имеются выраженные клинические признаки: деформация скелета (особенно черепа), рано отмечается увеличение селезенки, общая отсталость развития (спленогенный инфантилизм). При гетерозиготной форме

заболевания клинические признаки слабо выражены, но имеют место характерные морфологические изменения эритроцитов (микросфероцитоз). Гемолитический криз возникает под влиянием провоцирующих факторов (инфекция, переохлаждение, переутомление, беременность и др.)

При выраженном некомпенсированном гемолизе анемия нормохромная. Эритроциты (микросфероциты) характеризуются небольшим диаметром (в среднем 5 мкм), повышенной толщиной и нормальным объемом. Содержание гемоглобина в эритроцитах в пределах нормы или несколько выше ее. Количество микросфероцитов в период ремиссии и при латентной форме болезни не бывает высоким, в то время как в период криза гемолиз может сопровождаться увеличением их до 30% и выше. Микросфероциты в мазках крови имеют небольшой размер, гиперхромные без центрального просветления. В период гемолитического криза количество ретикулоцитов достигает 50-80% и больше, в период ремиссии – не превышает 2-4%. Ретикулоциты обладают большим диаметром при нормальной толщине. Могут появляться эритрокариоциты. Одним из характерных признаков заболевания является снижение осмотической устойчивости эритроцитов. Отмечается снижение гаптоглобина. Последствия высокого гемолиза: билирубинемия с преобладанием неконъюгированного билирубина, в моче увеличено содержание уробилиногена, моча имеет коричнево-красный оттенок, каловые массы резко окрашены из-за большого количества стеркобилиногена.

Наследственные гемолитические анемии, обусловленные нарушением структуры липидов мембраны эритроцитов (акантоцитоз) – редкое заболевание, наследуется по аутосомно-рецессивному типу. Наследственный акантоцитоз выявляется при абеталипопротеинемии. Снижение содержания холестерина, триглицеридов, фосфолипидов в крови отражается на липидном составе мембраны эритроцитов – в них снижена концентрация лецитина, фосфатидилхолина, повышено содержание сфингомиелина; уровень холестерина нормальный, либо повышен, а содержание фосфолипидов

нормальное или уменьшено. Эритроциты приобретают зубчатый контур, похожий на листья аканта. Аномальные эритроциты разрушаются главным образом в селезенке внутриклеточным гемолизом.

Наблюдается нормохромная нормоцитарная анемия. Основным морфологическим признаком этой формы гемолитической анемии являются эритроциты с зубчатым контуром (акантоциты), которые могут составлять до 40-80% эритроцитов. Отмечается ретикулоцитоз.

Наследственные гемолитические анемии, обусловленные нарушением синтеза глобиновых цепей. Различают количественные и качественные гемоглобинопатии. При количественных гемоглобинопатиях происходит нарушение соотношения обычных цепей глобина. Качественные гемоглобинопатии – заболевания, при которых генетическая аномалия приводит к синтезу гемоглобина с измененной структурой глобина.

Талассемии – гетерогенная группа наследственно обусловленных заболеваний, в основе которых лежит нарушение синтеза одной из полипептидных цепей глобина, что приводит к увеличению продукции других цепей и развитию дисбаланса между ними. Талассемии относят к количественным гемоглобинопатиям, так как структура цепей гемоглобина не изменена. Цепи, синтезируемые в избыточном количестве, накапливаются и откладываются в эритрокариоцитах костного мозга и эритроцитах периферической крови, вызывая повреждение клеточной мембраны и преждевременную гибель клеток. Эритрокариоциты гибнут в селезенке, костном мозге. Анемия сопровождается небольшим повышением ретикулоцитов. Дисбаланс синтеза глобиновых цепей вызывает развитие неэффективного эритропоэза, внутриклеточный гемолиз эритроцитов периферической крови, спленомегалию и развитие гипохромной анемии различной степени тяжести.

Чаще встречаются β -талассемии, среди которых выделяют две основные формы: тяжелую средиземноморскую форму, при которой синтезируется около 10% нормальной цепи (большая талассемия, анемия

Кули) и более легкую негритянскую форму, когда сохраняется около 50% синтеза нормальной β -цепи. Для всех β -талассемий общим является внутриклеточный гемолиз эритроцитов, неэффективный эритропоэз в костном мозге и спленомегалия.

Наследственные гемолитические анемии, обусловленные носительством аномального гемоглобина. Серповидноклеточная анемия (гемоглобинопатия S) – качественная гемоглобинопатия. Аномалия структуры гемоглобина при серповидноклеточной анемии заключается в замене в β -цепи глутаминовой кислоты на валин, что приводит к усилению связи одной молекулы гемоглобина с другой. Гемоглобинопатия S чаще развивается у лиц, проживающих в странах, где распространена малярия (Средиземноморье, Африка, Индия, Средняя Азия). Замена одной аминокислоты на другую сопровождается тяжелыми физико-химическими изменениями гемоглобина и ведет к деполимеризации HbS. Дезоксигенация вызывает отложение молекул аномального гемоглобина в виде мононитей, которые агрегируют, превращаясь в кристаллы продолговатой формы, изменяя тем самым мембрану и форму эритроцитов в виде серпов. Средняя продолжительность жизни эритроцитов при анемии, гомозиготной по гемоглобину S, составляет около 17 дней. В то же время такая аномалия делает эти эритроциты непригодными для жизнедеятельности плазмодий, носители гемоглобина S не болеют малярией, что путем естественного отбора привело к распространению этой гемоглобинопатии в странах «малярийного пояса».

Болезнь характеризуется гемолитическими кризами с внутрисосудистым гемолизом, поэтому частым осложнением бывают тромбозы мелких и крупных сосудов различных органов. В крови невыраженная нормохромная анемия. При гемолитическом кризе наблюдается резкое падение гемоглобина и гематокрита, ретикулоцитоз, нормобластоз, тельца Жолли, серповидные эритроциты, базофильная пунктация, мишеневидные эритроциты, пойкилоцитоз, лейкоцитоз,

тромбоцитоз, повышение СОЭ, повышение неконъюгированного билирубина. Моча черного цвета за счет гемоглобинурии, обнаруживается гемосидерин.

Гемолитические анемии, обусловленные носительством аномальных стабильных гемоглобинов С, D, E. достаточно распространенная форма. В HbC глютаминовая кислота в положении 6 заменена лизином, что ведет к его кристаллизации. В HbE глютаминовая кислота в положении 26 заменена лизином, в HbD глютаминовая кислота в положении 121 заменена на глутамин. Гетерозиготные формы протекают без клинических проявлений. У гомозигот клиническая симптоматика обусловлена анемией: характерны легкая гемолитическая анемия, желтуха, спленомегалия. Анемия носит нормоцитарный характер, в крови много мишеневидных клеток. Характерна склонность к кристаллизации молекул гемоглобина. Сочетание всех 3 видов гемоглобинопатий с талассемией дает тяжелую клиническую картину. HbC распространен среди афроамериканцев и африканцев ЮАР, HbE чаще всего встречается в Юго-Восточной Азии и среди африканцев.

Наследственные гемолитические анемии, обусловленные дефицитом ферментов эритроцитов. Гемолитические анемии, обусловленные дефицитом ферментов эритроцитов (несфероцитарные гемолитические анемии), чаще всего связаны с дефектами глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, пируваткиназы или глутатион-редуктазы. Ферментопатии с дефектами других метаболических путей редки и не имеют практического значения в возникновении гемолитических анемий.

Глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа (Г-6-ФД) – единственный фермент пентозофосфатного пути, первичный дефицит которого ведет к гемолитической анемии. Это самая распространенная эритроцитарная ферментопатия. Она превалирует среди жителей бассейна Средиземного моря, Юго-Восточной Азии, Индии. Ген синтеза Г-6-ФД сцеплен с X-хромосомой, поэтому заболевание проявляется значительно чаще у мужчин. Провоцирующими факторами гемолитического криза могут быть

инфекционные заболевания (грипп, сальмонеллез, вирусный гепатит), употребление в пищу конских бобов (фавизм), вдыхание цветочной пыльцы. Гемолитический криз может быть спровоцирован приемом некоторых лекарственных препаратов, чаще всего противомаларийных, сульфаниламидных, противоглистных препаратов. Клинические симптомы могут возникать на 2-3 сутки от начала приема препарата. Первыми симптомами обычно бывают иктеричность склер и темная моча. Прекращение приема лекарства исключает развитие тяжелого гемолитического криза. В противном случае на 4-5 сутки возникает гемолитический криз с выделением мочи черного или бурого цвета – результат внутрисосудистого гемолиза эритроцитов.

В период криза количество гемоглобина снижается до 20-30 г/л, увеличивается количество ретикулоцитов, лейкоцитов со сдвигом лейкоцитарной формулы влево до миелоцитов. Количество тромбоцитов обычно не меняется. При тяжелом гемолитическом кризе может выявляться большое количество телец Гейнца-Эрлиха, как результат преципитации цепей глобина и белков мембраны эритроцитов. Отмечается анизоцитоз, пойкилоцитоз, полихроматофилия, базофильная пунктация, тельца Жолли. В сыворотке крови повышается содержание свободного гемоглобина (внутрисосудистый гемолиз), часто увеличивается концентрация неконъюгированного билирубина, наблюдается гипогамтоглобинемия. В моче – гемоглобинурия, гемосидеринурия. Диагностика основана на определении уровня фермента Г-6-ФД.

Пируваткиназа на заключительном этапе гликолиза катализирует образование АТФ. Дефицит пируваткиназы может привести к снижению в эритроцитах АТФ и накоплению промежуточных продуктов гликолиза, которые образуются на предшествующих этапах. Заболевание характеризуется умеренной или тяжелой гемолитической анемией с внутриклеточным гемолизом. Спленомегалия наблюдается почти постоянно, иногда и у гетерозиготных носителей, хотя анемия у них, как правило,

отсутствует. Гемолитический криз провоцируется инфекцией, тяжелой физической нагрузкой, беременностью, гемолиз усиливается во время менструаций.

В крови в большинстве случаев имеет место нормохромная несфероцитарная анемия с незначительным анизоцитозом и пойкилоцитозом. Количество гемоглобина и эритроцитов может быть нормальным, пониженным, возможна выраженная анемия (Hb 40-60 г/л), эритроцитарные индексы приближаются к норме. Нередко в мазках выявляются полихроматофилия и эритроциты с базофильной пунктацией, иногда мишеневидные эритроциты, эритрокарициты. Ретикулоцитоз в период криза может достигать 70%. В сыворотке крови при гемолитическом кризе повышен неконъюгированный (непрямой) билирубин.

Анемии, обусловленные внеэритроцитарными факторами.

Иммунные гемолитические анемии – развиваются вследствие образования антител к эритроцитарным антигенам. Выделяют две основные формы – аллоиммунные и аутоиммунные гемолитические анемии. Процесс иммунного гемолиза эритроцитов связан с взаимодействием IgM или IgG с антигенами мембраны эритроцитов, после чего эритроцит разрушается макрофагами, преимущественно в селезенке. Такой вид иммунного гемолиза характеризуется внутриклеточным разрушением эритроцитов и встречается чаще всего. В случае присоединения комплемента к Fc-фрагменту иммуноглобулина и последующей активации системы комплемента происходит преимущественно внутрисосудистый гемолиз, показателями которого являются гемоглобинемия, гемоглобинурия и гемосидеринурия.

Аутоиммунные гемолитические анемии (АИГА) обусловлены наличием антител к антигенам эритроцитов. По течению АИГА подразделяются на острые и хронические. На основании серологической характеристики антител и клинических проявлений выделяют 4 вида АИГА:

- аутоиммунные гемолитические анемии с неполными тепловыми агглютинидами (47-80% всех АИГА);

- аутоиммунные гемолитические анемии с тепловыми гемолизинами;
- аутоиммунные гемолитические анемии с полными холодowymi агглютиниными (12%);
- аутоиммунные гемолитические анемии с двухфазными гемолизинами.

Все агглютинины разделяются на полные и неполные. Неполные агглютинины отличаются тем, что не дают агглютинации, если эритроциты находятся в водно-солевой среде. Полные агглютинины дают агглютинацию в любой среде. Неполные антитела обладают меньшей, по сравнению с полными антителами, молекулярной массой. В связи с этим клиническая картина этих форм гемолитической анемии отличается от других форм.

АИГА диагностируют по наличию аутоантител, фиксированных на эритроцитах с помощью пробы Кумбса, при которой антиглобулиновые антитела вступают во взаимодействие с иммуноглобулинами эритроцитов (прямая реакция Кумбса) и вызывают агглютинацию эритроцитов. Можно выявлять циркулирующие антитела в сыворотке крови непрямой пробой Кумбса, смешивая сыворотку с эритроцитами донора. Как правило, выраженность прямой реакции Кумбса тесно коррелирует с количеством IgG, фиксированных на эритроцитах. Отрицательная проба Кумбса не исключает АИГА, она может быть отрицательно при интенсивном гемолизе, массивной гормональной терапии, низком титре антител. Эритроциты, на которых помимо Ig фиксирован комплемент, быстрее удаляются из кровотока. В этом процессе принимают участие макрофаги печени и селезенки. При отсутствии комплемента на поверхности эритроцита, решающую роль в гемолизе играют молекулы Ig. Основным местом деструкции эритроцитов является селезенка. Этим объясняется высокая эффективность спленэктомии при АИГА с неполными тепловыми агглютиниными, когда имеет место опсонизация эритроцитов Ig, и отсутствие эффекта от операции при АИГА с полными холодowymi агглютиниными, при которой эритроциты сенсibilизированы комплементом и разрушаются в макрофагах печени.

Гемолитические анемии, обусловленные соматической мутацией клеток-предшественников гемопоэза. Пароксизмальная ночная гемоглобинурия (болезнь Маркиафава-Микели). Возникает болезнь в любом возрасте, но встречается у лиц преимущественно среднего возраста. Причиной повышенного гемолиза эритроцитов является дефект мембраны эритроцитов, лейкоцитов и тромбоцитов, обусловленный соматической мутацией в стволовых кроветворных клетках гена *pig-A*, ответственного за синтез гликозилфосфатидилинозитолового якоря (GPI), через который большинство поверхностных молекул (CD55, CD59, CD14, CD16, CD58 и др.) прикрепляются к клеточной мембране. GPI-AP белки функционируют как ферменты, рецепторы, регуляторы комплемента и адгезивные молекулы. Снижение экспрессии GPI-связанных белков повышает чувствительность эритроцитов к гемолитическому эффекту комплемента. Эритроциты подвергаются внутрисосудистому гемолизу, носящему кризовый, периодический характер. Экспрессию CD14 и CD48 определяют на моноцитах, CD16 и CD66b – на гранулоцитах, CD48 и CD52 – на лимфоцитах, CD55 и CD59 – на эритроцитах, CD55, CD58 и CD59 – на тромбоцитах. Пониженная их экспрессия свидетельствует в пользу ПНГ.

Отличительные признаки заболевания – ночные гемолитические кризы, сопровождающиеся выделением мочи бурого цвета (гемоглобинурия, гемосидеринурия). Кризы возникают спонтанно, либо провоцируются интеркуррентными инфекциями, в том числе вирусными, гемотрансфузиями, стимуляторами эритропоэза (например, витамин В₁₂), лекарственными препаратами, переутомлением. Интервалы между кризами бывают различные: могут повторяться ежедневно, еженедельно, раз в год в течение нескольких лет или быстро приводят к гибели больного. Гепатомегалия и спленомегалия не характерны для болезни Маркиафава–Микели, однако они могут наблюдаться в связи с развитием посттрансфузионного гемосидероза органов, при тромбозах системы селезеночных вен, застойном полнокровии,

инфаркте селезенки. Склонность к тромбозам сосудов, наряду с тромбоцитопенией, являются частыми осложнениями болезни.

Гемолитические анемии, обусловленные механическим повреждением эритроцитов. При избыточном воздействии сил сдвига и турбулентности, в периферической крови появляются фрагменты эритроцитов необычной формы (треугольные, шлемовидные и др.), они служат основанием для установления диагноза. Из-за присутствия подобных фрагментов эритроцитов MCV снижается, а RDW увеличивается (проявление анизоцитоза). Источник травмирования может находиться вне сосудов (маршевая гемоглинурия), внутри сердца (обызвествление и стеноз аортального клапана или дефекты протезов клапанов сердца), в артериолах (злокачественная артериальная гипертензия), в конечных артериолах (ДВС-синдром). При микроангиопатической гемолитической анемии, возникающей из-за травматической фрагментации эритроцитов при прохождении через искусственные клапаны сердца или поврежденные кровеносные сосуды, анемия может быть резкой с фрагментированными эритроцитами (шизоциты, шлемовидные эритроциты).

Повышенный гемолиз сопровождается лейкоцитозом с нейтрофильным сдвигом и выраженной тромбоцитопенией. Выявляется низкий уровень фибриногена, протромбина, VII и X факторов плазмы, которые свидетельствуют о коагулопатии потребления.

Маршевая гемоглинурия. Гемолиз внутрисосудистый в результате механического повреждения эритроцитов в капиллярах стоп. Часто единственным симптомом болезни является преходящая гемоглинурия с появлением мочи черного цвета. Интенсивность гемоглинурии и интервалы между приступами зависят от тяжести поражения и нагрузки.

Химические яды. Внутрисосудистый гемолиз эритроцитов могут вызывать яды органического и неорганического происхождения (сапонин, фенилгидразин, мышьяк, свинец, отравление грибами и др.).

Ожоговая болезнь. Гемолиз эритроцитов при ожоговой болезни наблюдается в случае поражения 20% поверхности тела и имеет сложный генез. Признаки гемолиза выявляются не сразу. Они маскируются сгущением крови вследствие шокового состояния и потери плазмы непосредственно после ожога. В послешоковом периоде в фазе компенсированной гидремии отмечается снижение эритроцитов и гемоглобина. Гемолиз может сопровождаться желтухой, а в тяжелых случаях – гемоглобинемией и гемоглобинурией с развитием острой почечной недостаточности.

3.5.2. Гемобластозы

Гемобластозы – группа опухолей, возникающая из кроветворных клеток. Гемобластозы разделяют на 3 группы:

Лейкозы – злокачественные опухоли кроветворной ткани с первичной локализацией в костном мозге. Злокачественной трансформации подвергаются стволовые кроветворные клетки или коммитированные клетки-предшественницы.

Гематосаркомы – внекостномозговые, первоначально локальные опухоли преимущественно в лимфатических узлах, представленные разрастанием бластных клеток, образующих солидные опухоли с возможной генерализацией в кроветворные органы, включая костный мозг

Лимфомы – опухоли, состоящие из зрелых лимфоцитов и образованные разрастанием ткани лимфоузлов без массивного поражения костного мозга

Острые лейкозы. Классификации острых лейкозов. Острые лейкозы делятся на две группы: миелоидные и лимфоидные. Острые лимфобластные лейкозы регистрируются в 80% случаев у детей и только в 20% – у взрослых. На долю острых миелоидных лейкозов (ОМЛ) приходится 15-20% всех острых лейкозов (ОЛ) у детей в возрасте до 15 лет, и свыше 80% – у взрослых. Клинические проявления ОЛ разнообразны и определяются механизмами развития заболевания.

Диагноз ОЛ – исключительно морфологический, устанавливаемый при обнаружении в крови и/или костном мозге бластных клеток. В миелограмме отмечается увеличение числа бластов (более 20%), которое сопровождается угнетением пролиферации элементов эритропоэза и тромбоцитопоэза.

Острые миелоидные лейкозы. Острые миелоидные лейкозы (ОМЛ) встречаются наиболее часто у лиц старше 60 лет. Морфологические и цитохимические исследования определяют современную диагностику и классификацию острых лейкозов. Согласно франко-американо-британской классификации (ФАБ-классификации) выделено 8 вариантов ОМЛ (табл. 3.17).

Таблица 3.17

ФАБ-классификация острых миелоидных лейкозов

Обозначение	Название	Характеристика
M ₀	ОМЛ с минимальной дифференцировкой	Отсутствие созревания, активность миелопероксидазы менее 3%, есть иммунологические маркёры миелоидной дифференцировки
M ₁	ОМЛ без созревания	Количество бластов превышает или равно 90% незритроидных клеток, активность миелопероксидазы менее 3%
M ₂	ОМЛ с созреванием	Более 10% миелоидных клеток имеют признаки созревания до промиелоцитов, количество моноцитов менее 20%
M ₃	Острый промиелоцитарный лейкоз	Доминирующие клетки – промиелоциты с выраженной атипией
M _{3a}	Острый промиелоцитарный лейкоз	Доминирующие клетки – промиелоциты с микрогрзукуляцией и резко положительной реакцией на миелопероксидазу
M ₄	Острый миеломоноцитарный лейкоз	Количество миеломоноцитарных бластных клеток с моноцитарным компонентом более 20% и менее 80%
M _{4E0}	Острый миеломоноцитарный лейкоз	Вариант M, с атипичными эозинофилами (>5%)
M _{5a}	Острый монобластный лейкоз	Количество монобластов в костном мозге >80%
M _{5b}	Острый монобластный лейкоз	Количество монобластов и моноцитов в костном мозге >80%
M ₆	Острый эритроидный лейкоз	Доля эритробластов среди нуклеаров в

		костном мозге £50%, доля бластов среди незритроидных клеток - более 30%
M ₇	Острый мегакариоцитарный лейкоз	Морфологические черты мегакариобластов, CD4V, CD6V

Дифференциация острых миелоидных лейкозов (M1-M5 и большинства случаев M6) проводится на основании морфологии и цитохимии, которые позволяют охарактеризовать линейную направленность дифференцировки лейкозных клеток (гранулоцитарная, моноцитарная, эритроидная) и определить степень этой дифференцировки. Морфологическая находка, высокоспецифичная для острого миелобластного лейкоза, – палочки Ауэра. Если реакция на миелопероксидазу отрицательна, что характерно для варианта M0, и обнаруживают палочки Ауэра, необходимо выставить диагноз острого лейкоза варианта M1. При вариантах M1 и M2 с t(8;21) часто наблюдают длинные нежные нитеподобные палочки Ауэра; при варианте M3 в цитоплазме можно увидеть пучки этих палочек.

Иммунологические признаки миелоидной дифференцировки включают нелинейные маркёры гемопоэтических предшественников CD34 и HLA-DR, панмиелоидные маркёры CD13, CD33 и CD65; маркёры, ассоциированные с моноцитами и гранулоцитами CD14 и CD15; линейные мегакариоцитарные маркёры CD41 и CD61; внутриклеточную миелопероксидазу. Только иммунологическое фенотипирование позволяет установить мегакариоцитарную дифференцировку бластов и провести дифференциальную диагностику с ОЛЛ, M0, M6 вариантами ОМЛ, метастазами в костный мозг мелкоклеточных злокачественных опухолей (табл. 3.18). Атипичные клетки экспрессируют антигены CD41a и/или CD42b и/или CD61. В большинстве случаев на бластных клетках обнаруживается экспрессия миелоидных антигенов CD13, CD33, встречаются линейно неограниченные антигены – HLA-DR, CD38, CD34.

С мегакариобластным лейкозом могут быть связаны аномалии хромосомы 3 – inv(3), t(3;3), t(9;22), трисомия хромосомы 21.

Иммунологическая характеристика ОМЛ

Показатели	M ₀	M ₁ /M ₂	M ₃	M ₄	M ₅	M ₆	M ₇
МПО	+/-	+	+	+	-/+	-/+	-
CD117	+/-	+	+	+	+/-	-	-
CD13	+/-	+	+	+	+/-	-	+/-
CD14	-	-	-	+/-	+/-	-	-
CD64	-	+/-	+/-	+	+	+/-	-
CD15	-	+/-	-/+	+/-	+	-	-
CD33	+/-	+/-	+	+	+	+	+
CD34	+/-	+/-	-	-/+	-	-	-
CD41	-	-	-	-	-	-	+
CD61	-	-	-	-	-	-	+
Гликофорин А	-	-	-	-	-	+	-
HLA-DR	+/-	+	-	+	+	-	+

- – отрицательная реакция, -/+ – экспрессия антигена отмечается в менее 50% случаев, +/- – экспрессия антигена отмечается в более 50% случаев, + – положительная реакция

Исследование методом проточной цитофлюорометрии в диагностике острого миелобластного лейкоза существенно в случаях, когда необходима верификация вариантов M₀ и M₁, а также в диагностике бифенотипического лейкоза. Кроме того, метод позволяет разграничить варианты M₀ и M₁, а также варианты с гранулоцитарной дифференцировкой – M₂ и M₃.

Наибольшую важность приобрели цитогенетические характеристики, именно они признаны решающими прогностическими факторами. Цитогенетические изменения в лейкемических клетках обнаруживают у 55-78% взрослых пациентов и у 77-85% детей. Ниже приведено описание наиболее частых и значимых в клиническом отношении хромосомных aberrаций при остром миелобластном лейкозе и их прогностическое значение.

Самая частая хромосомная aberrация – t(8;21)(q22;q22), в 90% случаев t(8;21) ассоциирована с вариантом M₂, в 10% – с M₁. Транслокацию t(8;21) относят к числу aberrаций «благоприятного прогноза». Её обнаруживают у 10-15% детей с острым миелобластным лейкозом.

Транслокация – t(15;17)(q22;q12) с образованием химерного гена *PML-RARa*, составляет 6-12% всех случаев острого миелобластного лейкоза у

детей; при варианте M_3 она равна 100%. Транскрипт PML-RARa – маркер лейкемии. У пациентов, достигших ремиссии, его не обнаруживают, а повторное его выявление во время морфологической ремиссии – предвестник клинического рецидива острого промиелоцитарного лейкоза. Инверсия хромосомы 16 – $inv(16)(p13;q22)$ – и её вариант $t(16;16)$ характерны для миеломоноцитарного лейкоза с эозинофилией M_4E_0 , хотя наблюдаются и при других вариантах острого миелобластного лейкоза.

Регион 23 длинного плеча одиннадцатой хромосомы достаточно часто становится участком структурных реаранжировок у детей с острым лейкозом – как лимфобластным, так и миелобластным. При первичном остром миелобластном лейкозе аномалию 11q23 обнаруживают у 6-8% больных, при вторичном – у 85%.

Инверсия $inv(3)(q21q26)/t(3;3)(q21;q26)$ описана при всех вариантах острого миелобластного лейкоза, за исключением M_3/M_{3v} и M_4E_0 . Несмотря на отсутствие связи между определённым FAB-вариантом и инверсией хромосомы 3, у большинства больных в костном мозге обнаруживают общие морфологические признаки: увеличение числа мегакариоцитов и многочисленные микромегакариоциты.

Транслокация $t(6;9)(p23;q34)$ описана более чем у 50 пациентов с острым миелобластным лейкозом. В большинстве случаев это единственная хромосомная аномалия. Несколько чаще $t(6;9)$ выявляют у пациентов с M_2 и M_4 вариантами, хотя встречается она при всех формах острого миелобластного лейкоза.

Транслокация $t(8;16)(p11;p13)$ описана у 30 больных острым миелолейкозом, преимущественно при вариантах M_4 и M_5 . Чаще аномалию обнаруживают у юных пациентов, в том числе у детей до года.

Острые лимфобластные лейкозы. Острые лимфобластные лейкозы (ОЛЛ) – гетерогенная группа заболеваний, каждое из которых имеет клинические, иммунологические и прогностические особенности. ОЛЛ у детей составляет до 75% гемобластозов и до 25% всех опухолей. Сравнение

ФАБ и ВОЗ классификаций ОЛЛ представлено в табл. 3.19. При наличии в костном мозге менее 20% бластных клеток состояние расценивается как лимфобластная лимфома.

Таблица 3.19

Сравнение ФАБ и ВОЗ классификаций ОЛЛ

ФАБ-классификация	ВОЗ-классификация
>30% бластов	>20% бластов
L1/L2 морфология	Пре-В-ОЛЛ (цитогенетические подгруппы)
Морфологический вариант различный	t(9;22)(q34;q11.2) <i>BCR/ABL</i> t(V;11)(V;q23) <i>MLL</i> реарранжировки t(1;19)(q23;p13.3) <i>E2A/PBX1</i> t(12;21)(p13;q22) <i>ETV6/RUNX1 (TEL/AML1)</i> Гиподиплоидия <46 хромосом Гипердиплоидия >50 хромосом Пре-Т-ОЛЛ (цитогенетические подгруппы) t(V;14)(V;q11-13)
L3	Беркиттоподобный лейкоз

Цитохимические признаки бластных клеток при ОЛЛ: лимфобласты характеризуются положительной PAS-реакцией, выявляющейся в >3% клеток в виде мелких или крупных гранул, иногда сливающихся в блоки, и отрицательной реакцией на МПО и хлорэцетатэстеразу. Реакция на липиды чаще всего отрицательная.

Наиболее информативным и решающим методом диагностики ОЛЛ является проточная цитофлуориметрия с использованием моноклональных антител, которая позволяет установить линейную направленность бластных клеток, а также стадию дифференцировки внутри каждой линии, диагностировать бифенотипические и билинейные ОЛ. Современная диагностика ОЛЛ должна включать цитогенетическое и молекулярно-генетическое исследование для идентификации клинически значимых генетических хромосомных aberrаций.

Согласно предложению Европейской группы по изучению острых лейкозов все ОЛЛ разделяют на две группы: В- и Т-линейной направленности, которые, в свою очередь, подразделяются на подтипы в

зависимости от стадии нормальной дифференцировки лимфоцитов (табл. 3.20).

Наиболее благоприятным считается В-II (*common*) вариант ОЛЛ, чаще всего встречающийся у детей. Неблагоприятными прогностическими факторами течения ОЛЛ являются: возраст менее 1 года, наличие Ph-хромосомы, раннее поражение центральной нервной системы, распространенность опухолевого процесса, Т-клеточный вариант ОЛЛ.

Таблица 3.20

Иммунологическая классификация ОЛЛ (EGIL, 1995)

Фенотип	Антигены
В-линейные*:	–
В-I (про-В) ОЛЛ	CD19+ и/или CD79a+ и/или CD22+цитоплазматический
В-II (<i>common</i>) ОЛЛ	CD10+
В-III (пре-В) ОЛЛ	Цитоплазматическая μ -цепь+
В-IV (зрелый-В) ОЛЛ	Поверхностный IgM моноклональный по к-или λ -типу
	Большинство случаев Tdt+, HLA-DR+, кроме В-IV, который часто Tdt-
Т-линейные:	Цитоплазматический или мембранный CD3+
Т-I (про-Т) ОЛЛ	CD7+
Т-II (пре-Т) ОЛЛ	CD2+ и/или CD5+ и/или CD8+
Т-III (кортикальный Т) ОЛЛ	CD1a+
Т-IV (зрелый Т) ОЛЛ	Мембранный CD3+,CD1a-

*Позитивные с двумя из трех маркеров

Смешанные острые лейкозы. Острые лейкозы, при которых опухолевые клетки имеют признаки более одной линии дифференцировки, например, лимфоидной и миелоидной, называются смешанно-линейными, гибридными, бифенотипическими. Коэкспрессию маркеров различных линий объясняют тем, что лейкемогенез – это не абсолютный блок клеточной дифференцировки, а объединение беспорядка созревания и пролиферации, дающее возможность экспрессии антигенов, которые в норме отсутствуют. Описано две категории смешанных ОЛ – ОЛЛ с миелоидно-ассоциированными антигенами ($M\mu+ALL$) и ОМЛ с лимфоидно-ассоциированными антигенами ($Ly+AML$). Ниже представлены критерии для классификации этих вариантов ОЛ:

- при В-линейном *My*+ALL бластные клетки должны обязательно экспрессировать:
 - CD79а или cIg μ или CD19 и CD22;
 - CD3-;
 - MPO-;
 - CD13, CD15, CD33 или CD65.
- при Т-линейном *My*+ALL бластные клетки должны обязательно экспрессировать:
 - CD7 и CD3 (поверхностный или цитоплазматический);
 - CD79а-;
 - MPO-;
 - CD13, CD15, CD33 или CD65.
- при *Ly*+AML бластные клетки должны обязательно экспрессировать:
 - MPO или экспрессия не менее двух других миелоидных маркеров;
 - CD3-;
 - CD79а-;
 - CD2, CD5, CD7 CD19 CD22 или CD56.
- при «истинном» смешанно-линейном лейкозе бластные клетки коэкспрессируют:
 - MPO и CD79а или cIg λ ;
 - или MPO и CD3;
 - или cCD3 и cIg λ .

3.5.3. Миелодиспластические синдромы

Термин миелодиспластические синдромы (МДС) объединяет группу прогрессирующих, необратимых опухолевых заболеваний стволовой кроветворной клетки, характеризующихся длительно существующими цитопениями крови при гипер- или нормоклеточном костном мозге, качественными (диспластическими) изменениями всех миелоидных ростков,

предрасположенностью к трансформации в острый нелимфобластный лейкоз. Заболеваемость МДС довольно высокая – в среднем 3,5-7,7 на 100 000 населения в год, в возрастной группе старше 70 лет – около 50 на 100 000. МДС – болезнь пожилых людей: более 80% случаев в возрасте старше 60 лет, не более 10% – в возрасте до 50 лет.

В результате подавления нормального кроветворения, ускоренной гибели и функциональной неполноценности клеток патологического клона развиваются основные клинические проявления заболеваний, объединенных в группу МДС:

- анемия (в 85-90% случаев);
- нейтропения (у 50% больных, является причиной возникновения инфекционных заболеваний у 10-40%);
- тромбоцитопения (приводит к кровоточивости у 25-70% больных);
- похудание и лихорадка.

Решающее значение в диагностике МДС имеют данные лабораторных исследований крови и костного мозга.

Диагностическая триада МДС:

- хроническая рефрактерная цитопения;
- повышенная клеточность костного мозга;
- дисплазия одного или нескольких ростков гемопоэза.

Диспластические изменения клеток крови наблюдаются не только при МДС, но и при воздействии ряда лекарственных веществ и токсичных препаратов, проникающего излучения, у лиц, инфицированных ВИЧ, у больных вирусными гепатитами, туберкулезом, при лейкозах, дефиците витамина В12 и фолиевой кислоты. Обычно при МДС костный мозг бывает гипер- или нормоклеточным, однако примерно в 10% случаев наблюдается его гипоплазия, что требует дифференциальной диагностики с апластической анемией. Гистологическое исследование трепанобиоптата костного мозга обязательно при диагностике МДС, поскольку позволяет достоверно оценить

клеточность костного мозга, а также выявить характерные особенности, в частности атипичную локализацию миелоидных предшественников (АЛМП) в центральных отделах костномозговых полостей, а не вблизи костных балок.

ФАБ-классификация была разработана в начале 80-х годов прошлого века, основным критерием в данной классификации являлось процентное содержание бластных клеток в костном мозге, при этом процентное содержание этих клеток менее 2% считалось нормальным для здорового костного мозга. Согласно ФАБ-классификации различаются следующие пять подтипов МДС:

- рефрактерная анемия (РА);
- рефрактерная анемия с кольцевыми сидеробластами (РАКС);
- рефрактерная анемия с избытком бластов (РАИБ);
- рефрактерная анемия с избытком бластов в трансформации (РАИБ-Т);
- хронический миеломоноцитарный лейкоз (ХММЛ).

Система классификации ВОЗ для МДС у взрослых больных сохраняет некоторые элементы системы ФАБ-классификации и расширяет категории подтипов МДС. Основные характеристики подтипов МДС, различаемых системой классификации ВОЗ, приведены в табл. 3.21.

Таблица 3.21

ВОЗ-классификация МДС

Подтип МДС	Характеристика
Рефрактерная анемия (РА).	Минимальная дисплазия в одном типе клеток крови (красных кровяных тельцах или эритроцитах) и < 5% бластов в костном мозге
Рефрактерная анемия с кольцевыми сидеробластами (РАКС).	Дисплазия только эритроидного ростка и > 15% кольцевых сидеробластов
Рефрактерная цитопения с мультилинейной дисплазией (РЦМД).	Дисплазия (> 10%) в двух или трех типах клеток крови, < 5% бластов и < 15% кольцевых сидеробластов в костном мозге (количество кольцевых сидеробластов > 15% называется РЦМД-КС)
Рефрактерная анемия с избытком бластов (РАИБ).	РАИБ 1 – количество бластов в костном мозге от 5% до 9% РАИБ 2 – количество бластов в костном мозге от

	10% до 19%
Миелодиспластический синдром/миелопролиферативное заболевание (МДС/МПЗ).	Дисплазия при наличии характеристик, обычно присущих миелопролиферативному заболеванию; включает ХММЛ
5q- (5q минус) синдром.	Больные, у которых отсутствуют хромосомные аномалии, за исключением делеции в длинном плече 5-й хромосомы
Неклассифицируемый МДС.	Включает больных с цитопенией в одном типе клеток крови, кроме анемии (то есть, с нейтропенией или тромбопенией) и какими-либо необычными характеристиками (например, фиброзом костного мозга)

Рефрактерная анемия (РА) с однолинейной дисплазией. Больные этой категории страдают анемией, которая не отвечает на лечение препаратами железа или витаминами, то есть является рефрактерной по отношению к такому лечению. Анемия может сопровождаться тромбоцитопенией и нейтропенией легкой или средней тяжести.

Рефрактерная анемия с кольцевыми сидеробластами (РАКС). У больных с данным видом анемии отмечается дисплазия только в эритроидном ряду. Сидеробласты – клетки эритроидного ряда, содержащие гранулы железа; кольцевые сидеробласты являются аномальными. Рефрактерная анемия с кольцевыми сидеробластами (РАКС) считается наиболее доброкачественным подтипом в системе классификации ВОЗ.

Рефрактерная цитопения с мультилинейной дисплазией (РЦМД). В эту категорию включаются больные, страдающие рефрактерной цитопенией (устойчивым низким количеством клеток крови какого-либо типа, например, рефрактерной нейтропенией или рефрактерной тромбоцитопенией) и имеющие минимальную дисплазию, по меньшей мере, в двух типах клеток крови, а также количество бластов 5% и менее, либо количество кольцевых сидеробластов менее 15%. Если количество кольцевых сидеробластов у больного с РЦМД превышает 15%, ставится диагноз РСМД-КС.

Рефрактерная анемия с избытком бластов (РАИБ). Эта категория делится на две подкатегории, которые различаются количеством бластов в

костном мозге. У больных, имеющих РАИБ-1, количество бластов составляет от 5% до 9%, а у больных с РАИБ-2 – от 10% до 19%.

Миелодиспластический синдром / миелопролиферативное заболевание (МДС/МПЗ). Больные с МДС/МПЗ включают тех, которые страдают хроническим миеломоноцитарным лейкозом (ХММЛ), который является отдельной категорией в системе ФАБ-классификации.

5q- (5q минус) синдром. Синдром 5q-, в настоящее время выделяемый в отдельный подтип МДС, впервые был описан более 30 лет тому назад. Название этого синдрома связано с хромосомной аномалией (делецией) в длинном плече (q) хромосомы 5. Делеция в пределах длинного плеча хромосомы 5 является единственной хромосомной аномалией у больных МДС с диагнозом «синдром 5q-». Обычно этот синдром наблюдается у женщин среднего возраста, как правило, в возрасте 65 лет и сопровождается анемией легкой или средней тяжести, низким количеством лейкоцитов (лейкопения) и зачастую нормальным или повышенным количеством тромбоцитов. Синдром 5q- характеризуется благоприятным прогнозом, длительностью жизни более пяти лет со времени постановки диагноза.

Неклассифицируемый МДС. Данная категория включает больных с цитопенией в одном типе клеток крови (например, тромбопенией или нейтропенией) и какими-либо необычными характеристиками (например, фиброзом костного мозга). Этот синдром встречается относительно редко – не более 1%-2% всех случаев МДС.

3.5.4. Миелопролиферативные заболевания. Классификация миелопролиферативных заболеваний

Хронические миелопролиферативные заболевания – клональные опухоли, развивающиеся из стволовой кроветворной клетки, характеризующиеся пролиферацией в костном мозге одного или более ростков миелоидной линии (гранулоцитарного, эритроидного, мегакариоцитарного). Пролiferация клеток сопровождается относительно

нормальным созреванием (эффективным гемопоэзом), что приводит к повышению числа гранулоцитов, эритроцитов и/или тромбоцитов в периферической крови. Наиболее часто поражаются печень и селезенка, где отмечаются экстрамедуллярные очаги кроветворения, лейкозная инфильтрация и разрушение опухолевых клеток. К миелопролиферативным заболеваниям относят:

- хронический миелолейкоз;
- сублейкемический миелоз (остеомиелосклероз);
- эритремия (истинная полицитемия);
- хронический миеломоноцитарный лейкоз;
- хронический мегакариоцитарный лейкоз (эссенциальная тромбоцитемия).

Хронический миелолейкоз. Хронический миелолейкоз (ХМЛ) составляет 15-20% всех случаев миелопролиферативных заболеваний. Встречается в любом возрасте, чаще у лиц среднего и пожилого возраста. Заболевание связано с опухолевой трансформацией полипотентной гемопоэтической стволовой клетки. Маркером опухолевого клона при ХМЛ является филадельфийская хромосома (Ph-хромосома), которая образуется в результате приобретенной транслокации t(9;22) (q34;q11). При образовании Ph-хромосомы происходит перенос генетического материала хромосомы 9 на 22, что приводит к образованию химерного гена BCR/ABL. Продукт этого гена – онкобелок p210 – является тирозинкиназой с повышенной активностью. Он играет ведущую роль в патогенезе ХМЛ, приводя к неконтролируемой пролиферации, угнетению апоптоза, нарушению дифференцировки гемопоэтических клеток и развитию лейкозного клона. Появление BCR/ABL тирозинкиназы в гемопоэтических предшественниках приводит к нарушению нормального функционирования клетки и ее злокачественной трансформации. Со временем клетки, содержащие патологический белок p210, вытесняют нормальные стволовые, у больного развивается картина ХМЛ. Аномальная хромосома обнаруживается во всех

клетках миелопоэза, а также Т- и В-лимфоцитах, поэтому все потомство – гранулоциты, моноциты, эритрокарициты, мегакарициты и лимфоциты – принадлежит к опухолевому клону. До 95% случаев ХМЛ – Ph-позитивные, лишь 5-8% наблюдений регистрируются как Ph-негативные. Диагноз ХМЛ окончательно может быть верифицирован с помощью цитогенетического или молекулярно-генетического методов исследования и обнаружения Ph-хромосомы или BCR/ABL-транскрипта.

Благодаря успешному использованию ингибиторов тирозинкиназ в лечении ХМЛ, способных элиминировать клоны клеток, несущих Ph-хромосому, достигнуты существенные успехи в увеличении продолжительности жизни больных. Однако полностью уничтожить родоначальные Ph-позитивные клетки пока не удается. В настоящее время необходимым является использование современных методов для оценки минимальной остаточной болезни. Одним из них является метод флюоресцентной гибридизации *in situ* (FISH), который может быть применен как к делящимся, так и неделящимся клеткам, характерным для минимальной остаточной болезни. Цитогенетический ответ определяется по содержанию Ph⁺-клеток в пунктате костного мозга: полный – 0%, частичный – 1-35%, малый – 36-65%, минимальный – 66-95%, нет ответа – более 95%. Молекулярный ответ оценивается на основании определения количества BCR/ABL-транскрипта в периферической крови с помощью метода количественной ПЦР в реальном времени (RQ-PCR). Полным молекулярным ответом считают случаи, когда BCR/ABL-транскрипт выявить не удастся.

Сублейкемический миелоз. Сублейкемический миелоз – хроническое клональное миелопролиферативное заболевание, возникающее вследствие трансформации клеток-предшественниц миелопоэза. У 50% больных обнаруживается мутация JAK2V617F. Неспецифические хромосомные аномалии встречаются у 30-40% пациентов, что наиболее часто свидетельствует о неблагоприятном прогнозе. Заболевание характеризуется опухолевой пролиферацией преимущественно мегакариоцитов и

гранулоцитов в костном мозге, развитием фиброза и экстрамедуллярного кроветворения. Доминирующим признаком сублейкемического миелоза является развитие фиброза в костном мозге, который служит неспецифической реакцией стромальных клеток костного мозга на цитокины, секретируемые опухолевым клоном и клетками стромального микроокружения. Усиление пролиферации фибробластов и остеобластов вследствие воздействия факторов роста, секретируемых мегакариоцитами и тромбоцитами (TGF- β , PDGF, b-FGF), приводит к развитию миелофиброза и остеомиелосклероза.

Прогрессирование заболевания сопровождается увеличением количества лейкоцитов, размеров селезенки, нарастанием анемии. Развитие анемии является следствием недостаточности костномозгового кроветворения. Тромбоцитопения приводит к геморрагическому синдрому, который проявляется кровотечениями, чаще в желудочно-кишечном тракте.

В периферической крови чаще бывает небольшой лейкоцитоз ($10,0-20,0 \times 10^9/\text{л}$). В лейкоцитарной формуле наблюдается сдвиг до миелоцитов, анизоцитоз нейтрофилов, асинхронное созревание ядра и цитоплазмы, нарушение гранулогенеза в нейтрофилах, гипо- и гиперсегментированные нейтрофилы. У большинства больных присутствует нормохромная анемия. В мазках крови имеет место анизоцитоз, пойкилоцитоз с преобладанием каплевидных эритроцитов (дакриоциты), нормобласты, невысокий ретикулоцитоз, атипичные крупные тромбоциты. В отличие от ХМЛ активность щелочной фосфатазы в нейтрофилах резко увеличена.

Костный мозг гиперклеточный с повышенным содержанием незрелых клеток гранулоцитарного ряда, атипичных мегакариоцитов. Содержание эритрокариоцитов может быть в пределах нормы или незначительно снижено. Эволюция сублейкемического миелоза характеризуется постепенным нарастанием лейкоцитоза, может развиваться вторичный острый лейкоз, резистентный к лечению. Развитие лейкоза наблюдается как в

случаях с лейкоцитозом, так и лейкопенией. Обнаружение в крови и/или костном мозге от 10-19% бластов свидетельствует о переходе заболевания в прогрессирующую фазу, более 20% – о трансформации в бластный криз по типу ОМЛ, ОММЛ, острого мегакариобластного лейкоза.

Эритремия (истинная полицитемия). Эритремия – клональное миелопролиферативное заболевание, характеризующееся повышенной продукцией клеток эритроидного ряда в сочетании с избыточной пролиферацией клеток грануло- и мегакариоцитопоэза. Основой патогенеза эритремии является опухолевая трансформация клетки-предшественницы миелопоэза. Мутация (JAK2V617F), ген которой расположен на хромосоме 9, приводит к усилению функций тирозинкиназы JAK2 за счет связывания внутриклеточного и поверхностного домена эритропоэтинового рецептора, что сопровождается пролиферацией эритроидных предшественников независимо от внешней стимуляции ЭПО. Результатом избыточной пролиферации клеток-предшественниц миелопоэза является стимуляция эритроцитоза и тромбоцитоза и развитие эритремии.

Заболевание встречается преимущественно у пожилых людей, характеризуется относительно доброкачественным течением и большей выживаемостью в отличие от других миелопролиферативных заболеваний.

В периферической крови эритроциты имеют нормальную морфологию, в случае развития дефицита железа вследствие кровопотерь появляется гипохромия и микроцитоз. Наиболее часто в лейкоцитарной формуле встречается нейтрофилез и базофилия, реже незрелые гранулоциты. Отмечается высокая активность ЩФ в нейтрофилах. Тромбоцитоз имеет место у 50% больных. Характерно также снижение СОЭ (до 0-1 мм/ час) и увеличение вязкости крови.

На поздних стадиях развития заболевания снижается продукция эритроцитов, нарастает спленомегалия. Костный мозг имеет низкую клеточность, фиброз выражен, отмечаются скопления мегакариоцитов. Количество клеток гранулоцитарного и эритроидного ряда снижается, может

встречаться остеосклероз. В периферической крови прослеживается тенденция к уменьшению количества эритроцитов и гемоглобина до нормальных показателей, развитию нормо- или гиперхромной анемии с выраженным анизоцитозом.

Хронический мегакариоцитарный лейкоз. Хронический мегакариоцитарный лейкоз – клональное миелопролиферативное заболевание, характеризующееся пролиферацией мегакариоцитов и персистирующим тромбоцитозом. Ведущим гематологическим симптомом является гипертромбоцитоз и гиперплазия мегакариоцитов в костном мозге. Клиническая картина характеризуется небольшой спленомегалией, которая прогрессирует по мере развития болезни, реже гепатомегалией, медленно нарастающей анемией. Характерны расстройства микроциркуляции, тромбозы артериальных и венозных сосудов. Геморрагические осложнения встречаются у больных со значительным тромбоцитозом – более $1500 \times 10^9/\text{л}$. В периферической крови наблюдается гипертромбоцитоз ($500-1500 \times 10^9/\text{л}$ и более), фрагменты ядер мегакариоцитов, умеренно выраженная анемия, умеренный лейкоцитоз с левым сдвигом в лейкоцитарной формуле, может наблюдаться базофилия и эозинофилия. Морфология тромбоцитов характеризуется анизоцитозом, увеличением MPV и PDW, появлением гигантских и уродливых форм с псевдоподиями, гипогранулярных тромбоцитов, фрагментов ядер мегакариоцитов.

Костный мозг нормо- или гиперклеточный, с трехростковой гиперплазией, сокращением массы жировой ткани. Отмечается значительная гиперплазия мегакариоцитарного ростка. Мегакариоциты располагаются в мазках костного мозга по одиночке или скоплениями. Характерна морфологическая гетерогенность клеток мегакариоцитарного ростка – гигантские мегакариоциты с многолопастными множественными ядрами без признаков атипии, возможны микроформы мегакариоцитов. При хроническом мегакариоцитарном лейкозе часто наблюдается явление эмпириополизиса (феномен поглощения клеток). По мере прогрессирования

заболевания может развиваться фиброз костного мозга.

3.5.5. Лимфолиферативные заболевания.

Классификация лимфолиферативных заболеваний.

Лимфолиферативные заболевания по месту первичного возникновения делятся на две большие группы: хронические лимфоидные лейкозы и злокачественные неходжкинские лимфомы, которые первоначально имеют внекостномозговую локализацию (лимфатические узлы, селезенка, кожа, лимфоидная ткань слизистой желудка и др.), что отличает их от лейкозов. Рост опухоли может сопровождаться инфильтрацией костного мозга и лейкоемизацией. В соответствии с критериями, предложенными ВОЗ, при верификации диагноза обязательным является установление линейной принадлежности опухолевых лимфоидных клеток (Т- или В-) и степени их дифференцировки (предшественницы или зрелые клетки) (табл. 3.22).

Таблица 3.22

Классификация лимфоидных опухолей (ВОЗ, 2008 г.)

<p>В-клеточные опухоли</p> <ul style="list-style-type: none"> • Из предшественников В-клеток: <ul style="list-style-type: none"> ○ В-лимфобластная лейкоз/лимфома ○ В-лимфобластная лейкоз/лимфома с повторяющимися генетическими аномалиями • В-клеточные опухоли из зрелых (периферических) клеток: <ul style="list-style-type: none"> ○ Хронический лимфолейкоз/лимфома из малых лимфоцитов ○ Пролимфоцитарный лейкоз ○ Лимфоплазмочитарная лимфома ○ Лимфома из клеток мантии ○ Фолликулярная лимфома ○ Первичная кожная лимфома фолликулярного центра ○ Лимфома маргинальной зоны селезенки ○ Волосатоклеточный лейкоз ○ Лимфома/лейкоз селезенки, неклассифицированная ○ Болезнь тяжелых цепей ○ Плазмноклеточные опухоли ○ Экстранодальная лимфома маргинальной зоны MALT-типа (MALT-лимфома) 	<p>Т- и НК-клеточные опухоли</p> <ul style="list-style-type: none"> • Из предшественников Т-клеток: <ul style="list-style-type: none"> ○ Т-лимфобластная лимфома/лейкоз из клеток предшественников ○ Бластная НК-клеточная лимфома • Т-клеточные лимфомы из зрелых (периферических) клеток: <ul style="list-style-type: none"> ○ Т-клеточный пролимфоцитарный лейкоз ○ Т-клеточный лейкоз из БГЛ ○ Хроническое ЛПЗ из НК-клеток ○ Агрессивный НК-клеточный лейкоз ○ Т-клеточная лимфома/лейкоз взрослых (HTLV1+) ○ Экстранодальная НК/Т-клеточная лимфома, назальный тип ○ ВЭБ-Т-ЛПЗ у детей ○ Т-клеточная лимфома,
--	---

<ul style="list-style-type: none"> ○ Нодальная лимфома маргинальной зоны ○ Диффузная крупноклеточная В-клеточная лимфома ○ Первичная диффузная крупноклеточная В-клеточная лимфома (ДКВКЛ) ЦНС ○ Первичная кожная ДКВКЛ ○ ВЭБ позитивная ДКВКЛ пожилых ○ ДКВКЛ, ассоциированная с хроническим воспалением ○ Т-клеточная/богатая гистиоцитами крупноклеточная В-лимфома ○ Медиастинальная крупноклеточная В-клеточная лимфома ○ Внутрисосудистая крупноклеточная В-клеточная лимфома ○ АЛК-позитивная крупноклеточная В-клеточная лимфома ○ Плазмобластная лимфома ○ Крупноклеточная В-клеточная лимфома из болезни Кастельмана, ассоциированной с HHV8 ○ Первичная лимфома серозных полостей ○ Лимфома Беркитта ○ Лимфоматоидный гранулематоз 	<ul style="list-style-type: none"> ассоциированная с энтеропатией ○ Гепатолиенальная Т-клеточная лимфома ○ Т-клеточная паникулитоподобная лимфома подкожной клетчатки ○ Ангиоиммунобластная Т-клеточная лимфома ○ Анапластическая крупноклеточная лимфома ○ Грибовидный микоз/синдром Сезари ○ Первичные кожные CD30-позитивные Т-ЛПЗ ○ Первичная Т-клеточная лимфома NOS ○ Анапластическая крупноклеточная лимфома АЛК-позитивная ○ Анапластическая крупноклеточная лимфома АЛК-негативная
--	---

Диагностика лимфопролиферативных заболеваний включает:

- выявление морфологического субстрата опухоли;
- определение иммунофенотипа опухолевых клеток (иммуногистохимия, проточная цитофлуориметрия);
- установление степени распространенности опухоли (стадии заболевания);
- выявление молекулярно-генетических изменений.

Лимфоидные опухоли из клеток-предшественников В-лимфобластный лейкоз из клеток-предшественников/лимфобластная лимфома – опухоли, морфологическим субстратом которых являются лимфобласты. Диагностика лимфом из клеток-предшественников должна осуществляться только с учетом данных иммунофенотипирования. Неопухолевый аналог находится в костном мозге на антигеннезависимой стадии дифференцировки.

Заболевание встречается у взрослых относительно редко (около 10%),

однако у детей составляет до 40% всех случаев НХЛ. Характерно агрессивное течение с вовлечением в процесс центральной нервной системы, лимфатических узлов, печени, селезенки, яичек, кожи, мягких тканей. В периферической крови отмечается анемия и/или тромбоцитопения и/или нейтропения. Количество лейкоцитов может быть нормальным, сниженным или повышенным. В костном мозге или других тканях имеет место диффузный характер опухолевого роста.

Цитохимия: лимфобласты не содержат МПО, липиды; PAS-положительное вещество распределяется в виде мелких, пылевидных гранул по периферии цитоплазмы или вокруг ядра, может локализоваться блоками или несколькими крупными гранулами в небольшом проценте клеток. В лимфобластах отмечается активность кислой фосфатазы (КФ) разной степени выраженности.

Иммунофенотип: лимфобласты экспрессируют TdT (терминальная дезоксирибонуклеотидилтрансфераза – маркер ранних клеток-предшественников), HLA-DR, CD19, цитоплазматический CD79a.

T-лимфобластный лейкоз из клеток-предшественников / лимфобластная лимфома (Т-ОЛЛ) – опухоли, морфологическим субстратом которых являются лимфобласты. Неопухолевые аналоги находятся в тимусе на антигеннезависимой стадии дифференцировки. Т-ОЛЛ составляет 15% от всех детских острых лимфобластных лейкозов. Особенностью клинической картины является частое вовлечение в опухолевый процесс средостения, серозных оболочек, появление выпота в плевральной полости. Другие места локализации опухоли – кожа, лимфатические узлы, печень, селезенка, лимфатическое кольцо Вальдейера, центральная нервная система, яички. Т-ОЛЛ часто сопровождается гиперлейкоцитозом и большой опухолевой массой.

Иммунофенотип: лимфобласты экспрессируют TdT, CD1a, CD2, CD3, CD4, CD5, CD7, CD8. Может наблюдаться коэкспрессия CD4 и CD8, экспрессия CD10. В зависимости от того, на какой стадии дифференцировки

в тимусе произошла онкогенная трансформация, лимфобласты могут иметь те или иные антигены (на ранней стадии — цитоплазматический CD3, CD2, CD7, несколько позже – CD1a, CD5 (кортикальные тимоциты), на последней стадии – мембранный CD3).

В-клеточные опухоли из зрелых (периферических) клеток. В-клеточный хронический лимфолейкоз/лимфома из малых лимфоцитов – опухоль лимфоидной ткани, характеризующаяся поражением костного мозга и лимфатических узлов (ЛУ). В большинстве случаев опухолевая трансформация происходит на уровне наивных или "девственных" (CD19+CD5+CD23+IgM+IgD+) (прегерминальных) В-лимфоцитов с последующим блоком в их дальнейшей дифференцировке и пролиферацией клона опухолевых клеток. Не менее часто встречается В-ХЛЛ с опухолевой трансформацией постгерминальных В-лимфоцитов (клеток памяти), о чем свидетельствуют обнаруживаемые соматические гипермутации генов вариабельного региона иммуноглобулинов. В-ХЛЛ – заболевание с нарушенным процессом апоптоза. Большинство опухолевых В-лимфоцитов являются покоящимися. Более 99% циркулирующих лимфоцитов находится в G0-фазе клеточного цикла. Цитокины, секретируемые опухолевыми клетками (ИЛ-8, TNF- α), а также ИЛ-2, продуцируемый Т-лимфоцитами, способствуют пролиферации и выживанию клеток ХЛЛ.

Диагностические критерии В-ХЛЛ:

- абсолютный лимфоцитоз в периферической крови более 5000 в 1 мкл;
- пролимфоциты <10%;
- лимфоцитоз в костном мозге >30%;
- иммунологический фенотип – CD19+CD23+CD5+.

В-клеточная клональность устанавливается обнаружением рестрикции легких цепей поверхностных иммуноглобулинов (к либо λ).

Картина периферической крови при ХЛЛ обычно представлена

нормальным или незначительно повышенным количеством лейкоцитов. Анемия и тромбоцитопения, как правило, отсутствуют. Основным гематологическим показателем при ХЛЛ является абсолютный лимфоцитоз. В лейкоцитарной формуле процент морфологически зрелых лимфоцитов составляет от 45 до 95%, встречаются единичные пролимфоциты, имеет место относительная или абсолютная нейтропения. Лимфоциты периферической крови при ХЛЛ характеризуются небольшими размерами (7-10 мкм), округлым ядром, глыбчатым распределением хроматина, отсутствием нуклеол, узкой цитоплазмой базофильного цвета.

По мере прогрессирования опухолевого процесса нарастает лейкоцитоз, относительный и абсолютный лимфоцитоз, нейтропения, наблюдается нормохромная анемия и/или тромбоцитопения. В лейкоцитарной формуле пролимфоциты составляют менее 10%. В том случае, если процент пролимфоцитов составляет 11-55%, устанавливается диагноз «ХЛЛ/пролимфоцитарный лейкоз», который характеризуется более агрессивным течением. При ХЛЛ может наблюдаться аутоиммунная гемолитическая анемия, реже тромбоцитопения за счет образования аутоантител к эритроцитам или эритрокарицитам, тромбоцитам.

Иммунофенотип: опухолевые клетки экспрессируют В-клеточные антигены – CD19, CD20 (слабая), CD22 (слабая), CD79a, CD23, CD43, CD5, отмечается слабая экспрессия поверхностных иммуноглобулинов класса IgM или IgM+IgD (в ряде случаев не обнаруживается), с рестрикцией легких цепей (κ либо λ), вариабельно представлены активационные антигены CD38, CD25, CD71. Экспрессия CD38 на более 20% CD19+CD5+ клетках ассоциируется с плохим прогнозом.

Цитогенетика: приблизительно в 1/3 случаев обнаруживается дополнительная хромосома 12 (трисомия 12), что связывается с более агрессивным клиническим течением заболевания. У 25% больных определяются структурные нарушения в хромосоме 13. Средняя

продолжительность жизни больных составляет 7 лет.

Волосатоклеточный лейкоз. Заболевание составляет 2% от всех лимфоидных лейкозов, встречается в возрасте от 26 до 75 лет, чаще у мужчин. Костный мозг нормо- или гиперклеточный с диффузной лимфоидной инфильтрацией, часто развивается фиброз, процент «волосатых» клеток значительно варьирует (8-60%). В периферической крови панцитопения или двухростковая цитопения (лейкопения, анемия и/или тромбоцитопения) либо сублейкемический лейкоцитоз. В лейкограмме – абсолютный лимфоцитоз, нейтропения (агранулоцитоз), моноцитопения. Среди лимфоцитов обнаруживают «волосатые» клетки, процент которых составляет от 2 до 90% и более. Это клетки среднего размера с округлым, овальным, почковидным ядром, гомогенной, сглаженной структурой хроматина, нуклеолы, как правило, отсутствуют или неотчетливые, цитоплазма обильная светло-голубая, с отростками. Иногда в цитоплазме могут обнаруживаться вакуоли. «Волосатые» клетки характеризуются диффузно-гранулярной реакцией на кислую фосфатазу, не подавляемую тартратом натрия.

Иммунофенотип: опухолевые клетки экспрессируют В-клеточные антигены – CD19, CD20, CD22, sIg+ (M+/-D, G, или A), CD79a, CD11c, CD25, CD103. Клетки не имеют на мембране CD5, CD10, CD23.

Миеломная болезнь (МБ) – В-клеточное лимфопролиферативное заболевание, характеризующееся клональной пролиферацией в костном мозге, реже в экстрамедуллярных очагах плазматических клеток, синтезирующих моноклональный иммуноглобулин (IgG, IgA, IgD, IgE) и/или легкие цепи (κ, λ). Заболевание диагностируется в возрасте 40-70 лет. Среди этиологических факторов выделяют вирус герпеса 8 типа. В патогенезе заболевания большую роль придают активирующему действию некоторых цитокинов, в частности ИЛ-6, который поддерживает пролиферацию плазматических клеток и предотвращает их апоптоз. Выживаемость и рост

опухолевых клеток во многом зависит от стромального микроокружения костного мозга. Адгезия миеломных клеток к внеклеточному матриксу костного мозга с помощью адгезивных молекул (CD44, VLA-4, VLA-5, CD11a, CD56, CD54 (ICAM-1), CD138, MPC-1) локализует опухолевые клетки в костномозговом микроокружении. Находясь в тесном физическом контакте со стромальным микроокружением костного мозга, миеломные клетки секретируют цитокины (TNF- α , TGF- β , VEGF), которые в дальнейшем стимулируют секрецию ИЛ-6 стромальными клетками костного мозга, способствуя остеолизису.

Иммунофенотип: опухолевые плазматические клетки экспрессируют моноклональный цитоплазматический иммуноглобулин (чаще IgG, реже IgA, IgD, IgE, IgM). Пан-В-клеточные антигены (CD19, CD20) отсутствуют, отмечается экспрессия CD38, CD138, CD56/58.

В костном мозге при МБ отмечается плазмоклеточная инфильтрация различной степени выраженности, характеризующаяся анизоцитозом как клеток, так и их ядер, анаплазией и разной степенью зрелости (от плазмобластов, проплазмоцитов до зрелых плазматических клеток). Важным диагностическим признаком МБ является обнаружение моноклонального иммуноглобулина в сыворотке крови и/или моче, выявляемого у 99% больных. У большинства больных наблюдается снижение уровней нормальных иммуноглобулинов более чем на 50%, редко – нормальные их значения. Моноклональный IgG встречается у 50%, IgA – приблизительно у 20%, моноклональные легкие цепи (белок Бенс-Джонса) – у 15%, IgD – у 2%, биклональная гаммапатия – у 2% больных. Протеинурия Бенс-Джонса обнаруживается у 75% больных.

Макроглобулинемия Вальденстрема

Макроглобулинемия Вальденстрема (МВ) – В-клеточная опухоль, морфологически представленная лимфоцитами, зрелыми плазматическими клетками и переходными формами клеток, секретирующими моноклональный IgM. Опухолевая трансформация происходит на уровне

постгерминальных В-лимфоцитов. Макроглобулинемия Вальденстрема составляет 1,5% всех случаев В-клеточных лимфом. Болеют преимущественно мужчины старше 60 лет. Клинические проявления МВ обусловлены пролиферацией лимфоцитов в костном мозге, печени, селезенке, лимфатических узлах и накоплением в сыворотке моноклонального IgM (>30 г/л). Синдром повышенной вязкости крови, коагулопатии, криоглобулинемия, нейропатии – наиболее частые клинические проявления МВ. В костном мозге отмечается пролиферация лимфоцитов, иногда с плазматизированной цитоплазмой, увеличение плазматических клеток (до 15-20%), тучных клеток. Картина периферической крови характеризуется анемией, нередко наблюдается лейкопения с нейтропенией, но чаще количество лейкоцитов нормальное, может наблюдаться моноцитоз. По мере прогрессирования заболевания развивается тромбоцитопения. СОЭ всегда резко увеличена. В сыворотке крови отмечается гиперпротеинемия, а на электрофореграмме – М-градиент класса IgM, в моче – белок Бенс-Джонса.

Иммунофенотип: опухолевые клетки экспрессируют поверхностные и цитоплазматические иммуноглобулины, обычно IgM, В-клеточные антигены (CD19, CD20, CD22, CD79a), CD38. Клетки не экспрессируют CD23, CD5, CD10, CD43 (+/-).

Цитогенетика: в 50% случаев имеет место транслокация t(9;14), нарушение сборки генов тяжелых или легких цепей Ig.

T-клеточные опухоли из зрелых (периферических) T-клеток. Это гетерогенная группа опухолей, представленных T-лимфоцитами со «зрелым» посттимическим иммунологическим фенотипом. Около 15% злокачественных лимфом имеют T-клеточное происхождение.

T-клеточный пролимфоцитарный лейкоз – редко встречающееся заболевание, регистрируется в возрасте старше 70 лет, имеет агрессивное течение. В клинической картине наблюдается генерализованная лимфаденопатия, кожные поражения в виде эритематозных, папулезных

высыпаний, гепатоспленомегалия. В костном мозге отмечается диффузная лимфоидная инфильтрация с преобладанием пролимфоцитов. В периферической крови – анемия, гиперлейкоцитоз с повышенным количеством пролимфоцитов. Иногда клетки мелкие и нуклеолы в ядре не различимы (мелкоклеточный вариант). В ряде случаев Т-клеточного варианта пролимфоцитарного лейкоза имеет место полиморфизм ядер пролимфоцитов (извитые, скрученные, расщепленные, мозговидные).

Иммунофенотип: опухолевые клетки экспрессируют CD2+CD3+CD5+CD7+CD4+CD8–/+.

Цитогенетика: при Т-пролимфоцитарном лейкозе наблюдаются аномалии хромосомы 14, транслокация t(14;14).

Т-клеточный лейкоз из больших гранулярных лимфоцитов – характеризуется длительным лимфоцитозом (свыше 6 месяцев) без четко установленной причины. Т-клеточный лейкоз из больших гранулярных лимфоцитов составляет 2-3% от всех наблюдений ХЛЛ. Характеризуется доброкачественным течением процесса. Клинической картине заболевания свойственны рецидивирующие бактериальные инфекции, симптомы ревматоидного артрита, увеличение размеров селезенки, поликлональная гипергаммаглобулинемия, цитопения (нейтропения, анемия), абсолютный лимфоцитоз. Большие гранулярные лимфоциты имеют диаметр 12-15 мкм, ядро округлой или слегка овальной формы, расположено несколько эксцентрично, хроматин конденсированный, ядрышки не визуализируются. Цитоплазма широкая, светлая или слабобазофильная с нежными или плотными азурофильными гранулами разного размера и количества. Иммунофенотип: в 80% случаев имеет место CD3+, CD4-, CD8 +, TCRαβ+. Редкие варианты:

- CD3+, TCRαβ+, CD4+, CD8–; CD3+, TCRαβ+, CD4+, CD8+;
- CD3+, TCRγδ+, CD4 и CD8 экспрессия неотчетливая;
- экспрессия CD11b, CD56, CD57 значительно варьирует.

Агрессивный НК-клеточный лейкоз. Лейкоз из натуральных Т-киллеров характеризуется клональной пролиферацией НК-клеток, агрессивным клиническим течением. Заболевание регистрируется чаще в странах Азии у лиц молодого возраста. Развивается лихорадка, гепатоспленомегалия, поражение желудочно-кишечного тракта, лимфаденопатия. Заболевание может осложняться коагулопатиями, гемофагоцитарным синдромом, полиорганной недостаточностью. В патогенезе лейкоза из натуральных Т-киллеров играет роль вирус Эпштейна-Барр. В костном мозге наблюдается массивная инфильтрация опухолевыми НК-клетками, имеющих морфологию больших гранулярных лимфоцитов. Могут встречаться реактивные гистиоциты с явлением гемофагоцитоза. В периферической крови анемия, лейкоцитоз с абсолютным лимфоцитозом за счет больших гранулярных лимфоцитов.

Иммунофенотип: опухолевые клетки экспрессируют CD2+CD16+CD56+, отсутствует CD3.

3.6. Контрольные материалы к главе 3

Контрольные вопросы::

1. Какие направления выделяют в современной схеме кроветворения?
2. Какими свойствами обладают стволовые клетки крови?
3. В чем заключаются отличия созревающих и зрелых клеток крови?
4. Какую роль выполняет основное вещество соединительной ткани в регуляции кроветворения?
5. Какие клетки белой крови относят к гранулоцитам и агранулоцитам, их морфологические особенности?
6. Что такое «тромбоцитогамма», каковы функции тромбоцитов?
7. Каковы основные функциональные особенности клеток лейкоцитарного ряда?
8. Каковы кинетика, цитохимические маркеры, функции и признаки

- активации нейтрофильных, эозинофильных и базофильных гранулоцитов?
9. Какие созревающие и зрелые клетки грануломоноцитарного и лимфоидного рядов обнаруживаются в периферической крови?
 10. Каковы возрастные особенности состава периферической крови здорового человека?
 11. Какие современные технологии анализа используются в иммуногематологии?
 12. Какие этапы включает технология гематологических исследований?
 13. Какие методы фиксации и окраски мазков крови используют для подсчета лейкоцитарной формулы?
 14. В чем заключаются особенности приготовления, фиксации и окраски препаратов для подсчета ретикулоцитов?
 15. В чем заключается принцип метода определения фракций гемоглобина? Какие фракции гемоглобина выделяют?
 16. Эритроциты каких размеров относят к нормо-, микро-, макро- и мегалоцитам?
 17. В чем заключается методика подсчета ретикулоцитов в мазке крови?
 18. Какие морфологические формы ретикулоцитов по степени зрелости идентифицируются при микроскопии окрашенных мазков и на анализаторах?
 19. В чем принципиальные отличия методов Панченкова и Вестергрена для определения СОЭ?
 20. Какие существуют методы определения осмотической резистентности эритроцитов?
 21. В чем заключается методика определения абсолютного количества отдельных морфологических форм лейкоцитов крови?
 22. Какова методика подсчета миелокариоцитов в счетной камере Горяева и в счетной камере Фукса-Розенталя?
 23. Что такое миелограмма, какие индексы костного мозга используют в гематологии?
 24. Какие эритроцитарные параметры определяются гематологическими

анализаторами?

25. Каковы причины ложного завышения (занижения) при измерении количества тромбоцитов крови на гематологических анализаторах?

26. По каким показателям можно определить наличие агглютинатов в образце крови?

27. Каковы особенности подсчета лейкоцитарной формулы на различных типах гематологических анализаторов?

28. Какие методы лежат в основе дифференцированного подсчета лейкоцитов на гематологическом анализаторе?

29. Какие методы могут быть использованы для дифференциальной диагностики острых лейкозов?

30. Какие клетки и какую проявляют цитохимическую активность?

31. Какие патогенетические факторы лежат в основе развития наследственных/врожденных и приобретенных дефектов функции лейкоцитов?

32. Как классифицируют лейкоцитозы по изменению в лейкоцитарной формуле?

33. Каковы причины развития и лабораторные признаки нейтрофилии, эозинофилии, базофилии, лимфоцитоза и моноцитоза?

34. Что такое лейкомоидные реакции? Каковы критерии различий лейкомоидных реакций и лейкозов?

35. Каковы причины развития и лабораторные признаки лейкомоидных реакций миелоидного типа?

36. Каковы причины развития и лабораторные признаки лейкомоидных реакций лимфомоноцитарного типа?

37. Каковы дифференциальные критерии диагностики нейтрофильных лейкомоидных реакций и хронического миелолейкоза?

38. Какие этиологические и патогенетические факторы лежат в основе развития лейкопений?

39. Какие выделяют этапы диагностики лейкопений?

ТЕСТЫ

03.01. Гемопоэтическая стволовая клетка характеризуется:

- А) полипотентностью
- Б) неограниченной пролиферативной способностью
- В) ограниченной способностью к дифференцировке
- Г) не способна к самообновлению и самоподдержанию
- Д) стимулирует пролиферацию окружающих клеток

03.02. Под определением «клонное» происхождение лейкозов понимают:

- А) приобретение клетками новых свойств
- Б) анаплазия лейкозных клеток
- В) потомство мутированной клетки
- Г) разнообразие морфологии лейкозных клеток
- Д) особенности фенотипа лейкозных клеток

03.03. Разделение анемии на гипо- нормо- и гиперхромную основано на значении показателя:

- А) RBC
- Б) MCV
- В) RDW
- Г) HGB
- Д) MCH

03.04. На клеточный анизоцитоз указывает повышение :

- А) RBC
- Б) MCV
- В) RDW
- Г) HGB
- Д) MCH

03.05. Цитохимические исследования бластных клеток позволяют установить:

- А) линейную принадлежность
- Б) степень дифференцировки бластных клеток
- В) опухолевую природу
- Г) чувствительность к цитостатикам
- Д) антигенную принадлежность бластов

03.06. Средний объем эритроцита увеличен при:

- А) железодефицитной анемии
- Б) талассемии
- В) гемоглобинопатии
- Г) В12-дефицитной анемии
- Д) фолликулярной лимфоме

03.07. Повышенное количество сидероцитов в периферической крови и сидеробластов в костном мозге обнаруживается при:

- А) приеме противотуберкулезных препаратов
- Б) отравлении свинцом

- В) железодефицитных анемиях
- Г) миеломной болезни
- Д) гемолитической анемии

03.08. Причиной железодефицитной анемии может быть :

- А) авитаминоз
- Б) нарушение синтеза порфиринов
- В) дефицит фолиевой кислоты
- Г) нарушение секреторной активности желудка
- Д) хронические кровопотери

03.09. Увеличение содержания бластов при клеточном или гиперклеточном костном мозге характерно для:

- А) фолиеводефицитной анемии
- Б) острой кровопотери
- В) острого лейкоза
- Г) инфекционного мононуклеоза
- Д) реактивного состояния

03.10. Высокий процент плазматических клеток в костном мозге наблюдается при :

- А) коллагенозах
- Б) инфекционном мононуклеозе
- В) миеломной болезни
- Г) болезни Вальденстрема
- Д) мегалобластной анемии

03.11. При остром лейкозе наиболее характерным показателем периферической крови является:

- А) анемия, тромбоцитопения, лейкоцитоз с присутствием бластных форм
- Б) умеренная анемия, тромбоцитоз, гиперлейкоцитоз с левым сдвигом в лейкограмме до миелоцитов
- В) умеренная анемия и тромбоцитопения, лейкоцитоз с лимфоцитозом
- Г) эритроцитоз, тромбоцитоз, небольшой лейкоцитоз с нейтрофилезом
- Д) нормальное количество эритроцитов и тромбоцитов, небольшая лейкопения без сдвигов в лейкограмме

03.12. Для гемограммы при миелофиброзе характерны :

- А) эозинофилия
- Б) относительный лимфоцитоз
- В) моноцитоз
- Г) ускоренная СОЭ
- Д) анемия, умеренный нейтрофилез, тромбоцитоз

03.13. Лабораторная диагностика острого лимфобластного лейкоза основана на выявлении:

- А) более 20% бластных клеток в костном мозге
- Б) положительной реакции на миелопероксидазу
- В) положительной реакции на щелочную фосфатазу
- Г) положительной реакции на липиды
- Д) цитоплазматических и мембранных лимфоидных антигенов с помощью проточной цитометрии

03.14. Ph-хромосома (филадельфийская) характерна для:

- А) хронического миелолейкоза
- Б) хронического лимфолейкоза
- В) миеломонобластного лейкоза
- Г) эритремии
- Д) аутоиммунной тромбоцитопении

03.15. Для острого миелобластного лейкоза наиболее характерным цитохимическим показателем является :

- А) миелопероксидаза
- Б) PAS-реакция гранулярной форме
- В) щелочная фосфатаза
- Г) кислая фосфатаза
- Д) неспецифическая эстераза

03.16. Для уточнения диагноза «апластическая анемия» необходимо провести дополнительно:

- А) оценку метаболизма железа
- Б) определение содержания витамина В-12 в сыворотке крови
- В) определение свободного гемоглобина плазмы
- Г) проведение стерильной пункции и трепанобиопсии
- Д) прямую реакцию Кумбса

03.17. Для уточнения диагноза «талассемия» дополнительно необходимо провести исследование:

- А) электрофорез фракций гемоглобина
- Б) определение содержания витамина В-12 в сыворотке крови
- В) определение содержания фолатов в сыворотке крови
- Г) определение трансферрина в сыворотке крови
- Д) определение гаптоглобина

03.18. Для уточнения диагноза «острый лейкоз» необходимо провести дополнительно:

- А) определение специфических антигенов и антител
- Б) реакцию иммунофлюоресценции (РИФ)
- В) цитохимические исследования и иммунофенотипирование бластных клеток
- Г) определение аутоантител к тромбоцитам
- Д) миелограмму, трепанобиопсию

Ответы

03.01	03.02	03.03	03.04	03.05	03.06	03.07	03.08	03.09
А	В	Д	В	А	Г	Б	Д	В

03.10	03.11	03.12	03.13	03.14	03.15	03.16	03.17	03.18
В	А	Д	Д	А	А	Г	А	В

ГЛАВА 4. ОБЩЕКЛИНИЧЕСКИЕ (ХИМИКО-МИКРОСКОПИЧЕСКИЕ) ИССЛЕДОВАНИЯ

4.1. Заболевания бронхо-легочной системы

4.1.1. Исследование мокроты

Исследование физических свойств мокроты. Основными составными частями мокроты являются слизь, гной, кровь, иногда – серозная жидкость. В зависимости от преобладания той или иной составной части различают чисто слизистую, слизисто-гнойную, гнойно-слизистую, чисто гнойную, кровянистую, которая может быть также кровавой, слизисто-кровянистой, слизисто-гнойно-кровянистой или серозной. Та часть полиморфной по составу мокроты, которая преобладает в ней, ставится на последнее место.

Слизистая мокрота образуется в результате повышенного образования слизи слизистыми железами дыхательных путей под влиянием бактерий или других раздражителей. Эта мокрота бесцветная вязкая по консистенции и содержит мало клеточных элементов, выделяется при хроническом воспалении верхних дыхательных путей, у курильщиков, при астматических приступах, при коклюше и остром бронхите. При инфильтративной и очаговой форме туберкулеза легких мокрота может быть только слизистой.

Слизисто-гнойная мокрота представляет довольно однородную мутную и вязкую массу. Слизь и гной в ней смешаны. Эта мокрота характерна для заболеваний бронхов и легочной паренхимы.

Гнойно-слизистая мокрота не однородна. Она состоит из слизи, в которой заложены гнойные комочки округлой формы, характерна для заболеваний верхних дыхательных путей. На фоне слизи могут быть видны беловато-серые или кровянистые прожилки, что характерно для рака легкого.

Гнойная мокрота по консистенции полужидкая или жидкая, выделяющаяся в большом количестве, характерна для фиброзно-кавернозной формы туберкулеза. Большое количество гнойной, зеленоватой, с гнилостным запахом мокроты выделяется при абсцессе легкого. Чисто гнойная мокрота выделяется очень редко, только при вскрытии эмпиемы в

просвет бронха. При движении этой мокроты по бронхам к ней примешивается небольшое количество слизи.

Кровавая мокрота наблюдается чаще при туберкулезе легких, но может быть при актиномикозе, гангрене, бронхоэктазах, новообразованиях, сифилисе, при ранении легкого. Кровь может быть и не легочного происхождения: из полости носа, из язвы желудка, при прорыве аневризматического узла аорты в просвет бронха или в трахею.

Слизисто-кровянистая мокрота встречается при инфаркте легкого в стадии обратного развития, при поражении верхних дыхательных путей или носоглотки.

Слизисто-гнойно-кровянистая мокрота часто выделяется при туберкулезе, при тяжелых застойных катарах дыхательных путей, новообразованиях, актиномикозе, при парагонимозе, бронхоэктазах. Примесь крови в слизисто-гнойной мокроте может быть в виде мелких прожилок и тяжей.

Пенистая мокрота, обычно бесцветная, похожая на слюну, характерна при аденоматозе легких.

Серозная мокрота чаще бесцветная, пенистая, по консистенции жидкая, невязкая и довольно прозрачная. При примеси крови и продуктов ее распада цвет мокроты может быть красноватым или желтоватым. Отличительным признаком серозной мокроты является *большое содержание белка*. Такая мокрота характерна для отека легких, отмечается при туберкулезе легких. Следы белка характерны для мокроты при хроническом бронхите.

Морфологическое и бактериоскопическое исследование мокроты при неспецифических процессах, хронических инфекциях, аллергических заболеваниях, микозах. Клеточные элементы мокроты:

Нейтрофилы всегда содержатся в мокроте, чем больше гноя в мокроте, тем больше нейтрофилов. Нейтрофилы могут сочетаться с другими лейкоцитами. При воспалительных неспецифических процессах нейтрофилы

в густом по консистенции гное выглядят как бесцветные, мелкозернистые, четко контурированные объемные клетки. В жидкой, серозной мокроте нейтрофилы – это крупные, в 2,5 раза больше эритроцита по диаметру клетки, с хорошо определяемыми фрагментированными ядрами.

В нативных препаратах мокроты лейкоциты могут быть и хорошо сохранившиеся и на различных стадиях дегенерации, поэтому точное определение видов лейкоцитов, их морфологических особенностей проводится в препаратах, окрашенных азур-эозином.

Эозинофилы – клетки размером 10-12 мкм. Ядро обычно состоит из 2-х сегментов. Распознаются эозинофилы в нативном препарате по желтой сферической зернистости преломляющей проходящий свет. В цитоплазме эозинофилов содержатся гранулы с большим количеством щелочного белка и перекисей, обладающих бактерицидной активностью. Эозинофилы обладают слабой фагоцитарной активностью и обуславливают внеклеточный цитолиз, тем самым участвуют в противогельминтном иммунитете, а также принимают активное участие в аллергических реакциях. Эозинофилы в мокроте появляются при заболеваниях аллергического характера, таких как бронхиальная астма, экзогенный аллергический альвеолит, эозинофильная пневмония Лёффлера, грануломатоз из клеток Лангерганса, лекарственный токсикоз, при поражении легких простейшими и гельминтами и при новообразованиях в легких.

Тучные клетки (тканевой базофил). Единичные тканевые базофилы можно обнаружить в гнойной мокроте среди нейтрофилов, лимфоцитов и/или эозинофилов. Тканевые базофилы обладают гомеостатической функцией, оказывают влияние на проницаемость и тонус сосудов, поддерживают баланс жидкостей в тканях. Защитная функция этих клеток заключается в выделении медиаторов воспаления и хемотаксических факторов. Базофилы участвуют в развитии аллергических реакций. Тканевые базофилы – это клетки размером 10-15 мкм. Ядро занимает большую часть клетки и практически неразличимо под полиморфной, плоской зернистостью

черного темно-коричневого или фиолетового цвета. Зернистость располагается в цитоплазме и на ядре. В гранулах тучных клеток содержится гистамин, хондроитинсульфаты А и С, гепарин, серотонин, ферменты (трипсин, хемотрипсин, пероксидаза, РНК-аза). На клеточной мембране тучные клетки имеют высокую плотность рецепторов к IgE, обеспечивающих не только связывание IgE, но и освобождение гранул, содержимое которых участвует в развитии аллергических реакций. Тканевые базофилы обладают функцией фагоцитоза.

Количество тканевых базофилов резко увеличивается в бронхоальвеолярном лаваже (БАЛ) у больных экзогенным аллергическим альвеолитом.

Лимфоциты основные эффекторные клетки иммунного ответа, участвуют во всех иммунологических реакциях, высокочувствительны к воздействию различных физических, химических факторов. Лимфоциты в большом количестве обнаруживаются в мокроте больных туберкулезом, саркоидозом, экзогенным аллергическим альвеолитом, парагонимозом, аскаридозом, амёбной пневмонией.

Эритроциты имеют вид дисков желтоватого цвета, диаметром 7-8 мкм. Единичные эритроциты в редких полях зрения могут встречаться в любой мокроте. Окрашенная кровью мокрота характерная для инфаркта легкого, застоя в малом кругу кровообращения, туберкулеза, парагонимоза, новообразований в легких.

Цилиндрический реснитчатый эпителий выстилает слизистую оболочку носовых путей, гортани, трахеи, бронхов и бронхоол. В зависимости от того, из какого участка бронхиального дерева отторгаются клетки цилиндрического эпителия, меняется их размер. Клетки цилиндрического реснитчатого эпителия обнаруживаются в препаратах мокроты, приготовленных из белесоватых тяжёлых, нитей и пленок, расположенных на фоне слизи. Клетки цилиндрического эпителия имеют удлиненную форму, расширенную в апикальной части, направленную в

просвет бронха и суженную к основанию клетки. В клетках иногда видно крупное, овальной или круглой формы ядро. На расширенном конце клетки имеется уплотненная оболочка, выделяемая как «кутикула», к которой крепятся реснички. Реснички сохраняются при остром воспалении в свежевыделенной мокроте. В этих клетках видны ядра, расположенные в дистальной части прозрачной цитоплазмы. Клетки цилиндрического эпителия располагаются в мокроте неравномерно группами, пластами в виде пчелиных сот или палисада, в виде скоплений разных размеров. Иногда пласты цилиндрического эпителия образуют при движении по бронхам плотные клеточные комплексы округлой или овальной формы с четкими контурами, по краям которых видны реснички, сохраняющие довольно долго активную подвижность. Это – тельца креола. Движение ресничек на тканевых клочках эпителиальной ткани может сохраняться длительное время в препаратах мокроты. Их можно принять за комплексы клеток злокачественного новообразования или за вегетативные формы простейших. Большое количество клеток цилиндрического мерцательного эпителия обнаруживается в мокроте при острых катарах верхних дыхательных путей различной этиологии, бронхитах, бронхиальной астме и астмоидных состояниях, новообразованиях легких, пневмосклерозе.

Моноциты – клетки диаметром 14-20 мкм, ядро бобовидной, подковообразной формы или многолопастное. Иногда в углублении подковы виден вступающий округлый фрагмент ядра. Структура ядра хроматиновая, нежная, рыхлая и слегка «пощипанная». Цитоплазма относительно широкая, иногда содержит вокруг ядра мелкую азурофильную зернистость и вакуоли. Моноцит, попав в ткань легких, в зависимости от микроокружения трансформируется в *макрофаг* с преобладанием той или иной функциональной направленности.

Альвеолярные макрофаги в легких выполняют фагоцитарную, секреторную, антигенпредставляющую функции и, в зависимости от функции, имеют отличительные морфологические признаки. В слизи они

располагаются отдельно лежащими клетками, в виде небольших групп или большими скоплениями. Альвеолярные макрофаги в препаратах, окрашенных азур-эозином, характеризуются полиморфизмом величины, формы клеток, а также формы ядер и их количества. Диаметр клеток колеблется от 18 до 40 мкм, количество ядер – от одного до 4 и более. Форма макрофагов зависит от вязкости слизи, в которой они расположены. В жидкой, серозной мокроте они имеют круглую форму.

«Клетки курильщика» или кониофаги фагоцитируют пыль, сажу, никотин, краску. Эти включения видны в цитоплазме клеток в виде желтовато-коричневых, коричневых, черных и цветных гранул разных размеров. Иногда этих включений так много, что они практически заполняют всю цитоплазму. Альвеолярные макрофаги в мокроте шахтеров черные, заполнены микрочастицами черного угля, у мукомолов – белые, у людей, работающих в красильном производстве, разного цвета.

Липофаги – альвеолярные макрофаги с каплями жира или *ксантомные* клетки из очага жировой дегенерации ткани легкого. Цитоплазма липофагов заполнена каплями жира, поэтому их обозначают как жировые или зернистые шары. Липофаги характерны для хронического воспалительного процесса или злокачественного новообразования.

Альвеолярные макрофаги с гемосидерином, сидерофаги или клетки «сердечных пороков» содержат в цитоплазме кристаллы гемосидерина золотисто-желтого или коричневатого цвета. Гемосидерин образуется из гемоглобина внутриклеточно в цитоплазме альвеолярных макрофагов при распаде эритроцитов у больных, страдающих застоем в малом круге кровообращения, инфарктом легкого, легочным кровотечением, идиопатическим гемосидерозом легких.

Альвеолярный эпителий обнаруживается в препаратах из бронхо-альвеолярного лаважа (БАЛ), у больных склерозирующим альвеолитом. Заболевание характеризуется диффузным, острым очаговым или хроническим негнойным воспалением легких с исходом в фиброз

интерстициальной ткани легких. Десквамативная пневмония - одна из форм этого заболевания характеризуется обильным слущиванием альвеолярного эпителия. При этой форме в БАЛ общее количество клеток увеличено до $1,0 \times 10^6$ в 1 мл лаважа за счет лимфоцитов, большого количества альвеолярного эпителия, нейтрофилов, эозинофилов и лимфоцитов.

Неклеточные элементы мокроты:

Эластические волокна – это соединительная ткань легочной паренхимы, которая появляется в мокроте при распаде в результате туберкулезного процесса, абсцесса легкого, гангрены, абсцедирующей пневмонии, актиномикоза, новообразований. Эластические волокна имеют вид извитых, тонких, блестящих волокон, равномерной толщины на всем протяжении, напоминают ветки дерева, складываются в пучки, при выраженном распаде сохраняют строение альвеол.

Коралловидные эластические волокна – резко преломляющие свет грубо ветвящиеся образования, напоминающие кораллы. Объемные бугристые наслоения на эластических волокнах состоят из кристаллов жирных кислот и солей жирных кислот, которые образуются в очаге хронического воспаления, каверне, при кавернозном туберкулезе.

Обызвествленные эластические волокна – грубые, хрупкие, пропитанные солями извести, располагаются на фоне грубозернистой массы обызвествленного детрита в виде пунктирных линий, состоящих из сероватых, резко преломляющих свет палочек. При приготовлении нативного препарата они ломаются под покровным стеклом. Обнаруживаются в нативных препаратах мокроты при распаде гонового первичного туберкулезного очага (петрификата), а также при абсцессе, гангрене, новообразованиях легкого. Элементы распада петрифицированного очага носят название «тетрады Эрлиха»: обызвествленные эластические волокна, обызвествленный детрит, кристаллы холестерина, КУМ (микобактерии туберкулеза). Однако все вместе в нативном препарате мокроты элементы тетрады Эрлиха практически не встречаются.

Спирали Куршмана – это плотная слизь в виде осевого цилиндра, окруженная рыхлой слизью, называемой мантией. Центральный осевой цилиндр резко преломляет свет и напоминает блестящую, объемную нить или спираль. Осевые цилиндры образуются в бронхах и бронхолах при застое вязкой слизи во время спазма или сдавления. Спираль Куршмана формируется при кашле, во время движения осевого цилиндра по бронхиальному дереву, когда он окутывается рыхлой слизью (мантией). Спирали Куршмана, образовавшиеся в крупных бронхах, могут быть очень большие, на малом увеличении занимать несколько полей зрения. Гигантские спирали видны при макроскопическом просмотре мокроты, перенесенной в чашку Петри. Очень маленькие, короткие спирали Куршмана, представленные только осевыми цилиндрами, образуются в мелких бронхолах. Спирали Куршмана встречаются в мокроте больных бронхиальной астмой, туберкулезом, при злокачественных новообразованиях легких, т.е. при всех воспалительных процессах, где имеет место спазм или сдавливание бронхов.

Кристаллы Шарко-Лейдена имеют вид вытянутых в длину ромбов разных размеров. Они образуются из эозинофильной зернистости при ее распаде, обнаруживаются в препаратах мокроты, приготовленных из плотных желтоватых или желтовато-коричневатых комочков объемных образований из мелких бронхов, располагаются на фоне эозинофилов или эозинофильной зернистости.

Кристаллы гематоидина золотисто-желтого цвета, имеют форму ромба, вытянутого в длину, разрозненно лежащих игл или игл, складывающихся в пучки или звезды. Гематоидин – продукт распада гемоглобина, образуется в глубине гематом, обширных кровоизлияний, в очагах распада новообразования, в некротизированной ткани легкого. В препаратах мокроты кристаллы гематоидина располагаются на фоне детрита, эластических волокон, на фоне злокачественных клеток или в очагах некроза ткани легкого или распада гематомы.

Кристаллы холестерина – бесцветные тонкие четырехугольной формы пластинки с «обломанным» в виде ступени углом. Они образуются при застое мокроты в полостях, в очагах жировой дегенерации ткани легкого, при новообразованиях и абсцессе легкого. Располагаются кристаллы холестерина на фоне макрофагов с каплями жира, обызвествленных эластических волокон и обызвещенного детрита (петрификат).

Пробки Дитриха обнаруживаются при макроскопическом исследовании гноя в виде мелких желтовато-серых зернышек. Зернышки представляет собой детрит, нафаршированный макрофагами, содержащими жирные кислот в виде игл и/или капель. Пробки Дитриха располагаются в нижнем гнойном слое трехслойной мокроты, образовавшейся в полостях при абсцессе легкого, бронхоэктатической болезни.

Простейшие:

Трихомонады *Trichomonas tenax* или *buccalis* обнаруживаются в теплой гнойной мокроте или в смывах из бронхов при хронических необструктивных бронхитах с аллергическими реакциями. Простейшее имеет размер от 4-13 мкм в длину и 2-9 мкм в ширину, при хроническом тонзилите обитает в гнойном отделяемом миндалин и в тонзиллярных криптах. Аспирация трихомонад может привести к развитию инфекции бронхов и/или легочной ткани. Заболевание протекает как хроническая рецидивирующая или абсцедирующая эозинофильная пневмония с эозинофилией в крови. Мокрота обычно гнойно-слизистая, вязкая. В препаратах для микроскопии много эозинофилов, кристаллов Шарко-Лейдена, спиралей Кушмана, на фоне которых обнаруживаются активно подвижные трофозоиды *Trichomonas tenax*. Трихомонады можно обнаружить при микроскопии соскобов со слизистой оболочки зева, миндалин, десен, материала из десневых карманов.

Entamoeba histolytica (дизентерийная амёба) является анаэробным паразитарным простейшим. Трофозоид имеет размер 25-60 мкм, обнаруживается в теплой кровянистой мокроте при амебиазе легких.

Тканевые амёбы попадают в легкие гематогенным путем из кишечника больного амебиазом. В препарате, приготовленном из только что полученной мокроты, можно обнаружить *подвижный эритрофаг*. Эта активно подвижная бесцветная, слегка преломляющая свет амёба. Внутренний слой цитоплазмы зернистый, содержит эритроциты и одно ядро. Наружный слой (эктоплазма) плотный, гомогенный, хорошо заметен при образовании псевдоподий. Образование псевдоподий внезапное, точкообразное, при их образовании происходит «переливание» эндоплазмы и поступательное движение амёбы.

Pneumocystis carinii условно-патогенный сапрофит, может вызвать пневмоцистоз. Пневмоцисты повреждают интерстициальную выстилку легких механически, затем развивается инфильтрация стенок альвеол моноцитами, а интерстициальная ткань – плазматическими клетками. Это увеличивает толщину альвеол в 5-20 раз. *P. Carinii* выделяют большой поверхностный гликопротеид (БПГ), который повреждает сурфактант, что приводит к ослаблению растяжимости альвеол при дыхании. Почти полностью исчезают фосфолипиды сурфактанта, увеличивается содержание белков, что приводит к альвеолярно-капиллярному блоку, тяжелой гипоксии и смерти от нарастающей дыхательной недостаточности. Болеют пневмоцистной пневмонией ослабленные дети. У взрослых пневмоцистная пневмония возникает на фоне тяжелых заболеваний, таких как ВИЧ, СПИД-ассоциированные заболевания.

Мокрота у больных пневмоцистной пневмонией может быть пенистая, вязко-слизистая, гнойно-слизистая. Пневмоцисты в нативных препаратах мокроты обнаружить невозможно, но в слизистых участках препаратов мокроты, окрашенных азур-эозином, возможно. Их оболочка не окрашена, но цитоплазма простейшего достаточно четко контурирована. В почти бесцветной цитоплазме содержатся от 1 до 8 внутрицистных телец, окрашенных в вишнево-коричневый или синеватый цвет.

Гельминты:

Стронгилоидоз – возбудителем являются стронгилоиды – мелкие нитевидные нематоды *Strongyloides stercorales*. Самцы имеют веретенообразную форму, размеры 0,7 x 0,04-0,06 мм, самки 2,2 мм в длину и 0,03 мм в ширину. Каждая самка откладывает до 50 яиц ежедневно, из которых вылупливаются рабдитовидные личинки. Личинки обитают преимущественно в либеркюновых железах двенадцатиперстной кишки. Выделенные с фекалиями личинки растут, половые зачатки уменьшаются, хвост удлиняется, пищевод из рабдитовидного превращается в цилиндрический – развивается инвазивная филяриеvidная личинка. Заражение человека стронгилоидозом происходит путем проникновения филяриеvidных личинок через кожные покровы или при проглатывании инвазионных личинок, но и в этом случае они внедряются в слизистую полости рта и/или пищевода и далее мигрируют по большому и малому кругу кровообращения. Достигнув по кровеносным сосудам легких, личинки проникают через альвеолы в бронхи, поднимаются в глотку, выделяются с мокротой, вновь заглатываются, попадая в желудок и тонкую кишку. В процессе миграции личинки увеличиваются в размере, у них начинает проявляться половой диморфизм. В легких, по-видимому, может происходить развитие личинок до половозрелой стадии, и даже оплодотворение самок.

Диагностика стронгилоидоза основана на обнаружении филяриеvidных личинок в фекалиях, в дуоденальном содержимом или в мокроте. Передний конец их тела тупой, они имеют пищевод с двумя расширениями, первое – цилиндрической формы, второе – грушевидной. Пищевод занимает $\frac{1}{2}$ тела, кишечник заканчивается анальным отверстием. Хвостовой конец филяриеvidной личинки раздвоен или тупой.

Парагонимоз – возбудителем являются *Paragonimus westermani*, которые относятся к классу сосальщиков. Взрослые паразиты яйцевидной формы, длиной 8-13 мм, шириной – 4-6 мм, толщиной 3-4 мм. Паразитируют в мелких бронхах, иногда в плевре, диафрагме, располагаясь в фиброзных

капсулах размером от 10 до 45 мм. В легких личинки вызывают обширные кровоизлияния, острый бронхит, очаговые, сливные или переbronхиальные пневмонии. Паразиты поражают обычно нижние доли легких, при массивной инвазии – средние и верхние. Со второго месяца в воспалительных очагах вокруг паразитов образуются кисты, которые нагнаиваются. Стенка кисты плотная. Внутри кисты находится казеозная масса серо-белого, шоколадного или темно-красного цвета. Парагонимоз сопровождается кровохарканьем, возникающим в результате разрушения растущей кистой стенок мелких сосудов легкого. Заражение происходит при употреблении в пищу сырых «пьяных крабов», которых перед едой погружают в вино, речных раков, недостаточно термически обработанных, в которых содержатся инвазионные для человека личинки – *метацеркарии*.

При микроскопическом исследовании на фоне детрита и слизи видны кристаллы Шарко-Лейдена, эозинофилы, нейтрофилы, макрофаги, яйца паразитов. Кисты могут соединяться с бронхами извитыми ходами. При разрушении сосудов яйца и взрослые особи мигрируют в другие органы, часто в головной мозг. После освобождения кисты от паразитов в течение нескольких недель происходит ее рубцевание. В легких паразиты могут жить до 5 лет. Диагноз парагонимоза подтверждается обнаружением в мокроте, плевральной жидкости и/или в фекалиях яиц легочной двуустки.

Аскаридоз, легочная фаза. Заражение человека *Ascaris lumbricoides* происходит при проглатывании инвазионных яиц. Яйца становятся инвазионными для человека только после того, как во внешней среде при достаточной влажности, наличии кислорода и температуре от +10⁰ до +36⁰С они созреют, и в них сформируются личинки. После многократного деления бластомеров в оплодотворенном яйце аскариды многоклеточный зародыш проходит стадию морулы, гастрюлы, головастика, молодой личинки и, наконец, образуются подвижные личинки. Легкие при аскаридозе поражаются мигрирующими личинками, проникающими в них из кишечника по лимфатическим и кровеносным сосудам. Это конечный этап их миграции

по органам и тканям. Если в начале миграции их длина не превышает 0,5 мм, то в период их проникновения через альвеолы в бронхиальное дерево составляет около 2 мм. В альвеолах и мелких бронхиолах при миграции личинок возникают интенсивные травматические кровоизлияния. При выраженной инвазии очаговые кровоизлияния захватывают большие участки легких. В ткани легких возникают эозинофильная пневмония. У больных появляется слабость, субфебрильная температура, кашель с гнойно-слизисто-кровянистой мокротой. При микроскопии мокроты на фоне слизи с эритроцитами, эозинофилами и кристаллами Шарко-Лейдена можно обнаружить личинки аскарид. Их длина в этот период составляет от 1,5 до 2,5 мм.

Эхинококкоз связан с циклом развития ленточных гельминтов *Echinococcus granulosus* и *Echinococcus alveolaris*. На стадии личинки в легких образуются одно- или многокамерные кисты. При нагноении и прорыве этих кист в бронх в мокроте появляются патогномичные структуры эхинококка – крючья, обрывки хитиновой оболочки, а иногда целые сколексы, которые обнаруживают при исследовании препаратов, приготовленных из гнойной части мокроты. Элементы эхинококка располагаются на фоне детрита, эозинофилов, кристаллов Шарко-Лейдена.

Грибы:

Легочная локализация грибов достаточно актуальна в связи с применением лучевой, иммунодепрессантной химиотерапии. Многие грибы хорошо различимы как в нативных, так и окрашенных азур-эозином препаратах, что позволяет по их морфологическим особенностям верифицировать диагноз.

Актиномикоз легких – характерно образование гнойных инфильтратов, извитых свищевых ходов, вскрывающихся наружу. Друзы актиномицетов в гнойной части мокроты макроскопически имеют вид мелких желтоватых зернышек. Отделяемое вскрывшихся инфильтратов имеет гнойно-кровянистый характер с примесью мелких желтоватых крупинок (друз). В

препаратах, приготовленных из желтоватых мелких зернышек, можно обнаружить сплетение тонких, ветвящихся, несептированных нитей мицелия, длиной 200-300 мкм, расположенных на фоне лейкоцитов, альвеолярных макрофагов, ксантомных клеток и небольшого количества эритроцитов. На радиально расположенных концах мицелия находятся колонии в виде колбообразных вздутий. Решающее значение в диагностике актиномикоза принадлежит посеву.

Аспергиллез. Легкие часто поражает *Aspergillus fumigatus*. Прорастание конидиев (спор) *Aspergillus* в нижних дыхательных путях может привести к незаметной для заболевшего колонизации слизистой. Предрасположенность к аспергиллезу имеют лица с атопическими аллергическими реакциями, больные с иммунодефицитом или с выраженной нейтропенией. Аспергиллез проявляется ограниченной или обширной инвазией, тяжелым деструктивным процессом и диссеминацией в другие органы. У больных с хронической обструктивной легочной болезнью и у курильщиков аспергиллез проявляется кашлем с выделением мокроты со слизистыми пробками, содержащими конидии и мицелий гриба. В легких иногда возникает только ограниченное кавернозное поражение с колонией грибов в виде шара. При глубоком поражении грибом развивается некротическая пневмония с абсцессами, некротический бронхит. В мокроте или материале, полученном при бронхоскопии, обнаруживают характерные сплетения толстых, толщиной до 5 мкм, равномерно септированных гифов, ветвящихся под углом 45°. Иногда при поражении легкого можно обнаружить в исследуемом инструментальном материале или в мокроте характерную для этого плесневого гриба шаровидную щеткообразную корону из коротких цилиндрических клеток стеригм (конидиеносцев), на которых располагаются цепочки ярко пигментированных звездчатых округлых конидий-спор. Фон такого препарата – зернистые некротические массы, дегенерированные фрагменты мицелия. Иногда встречаются единичные гигантские многоядерные клетки типа инородных тел. При аспергиллезе часто развивается плоскоклеточная

метаплазия цилиндрического эпителия бронхов с признаками тяжелой атипии, что требует дифференциации с плоскоклеточным раком легкого. Для подтверждения аспергиллеза применяется метод ПЦР.

Кандидоз. Дрожжеподобный гриб *Candida albicans* чаще выполняет роль сапрофита, но у тяжелых больных с резко сниженным иммунитетом может вызвать абсцедирующую пневмонию. В препаратах мокроты обнаруживаются двуконтурные, мелкие, округлой и овально-удлиненной формы, часто почкующиеся клетки размером 2-4 мкм. Нити псевдомицелия одноконтурные, лишены перегородок. При кандидозной пневмонии на зернистом фоне некроза и нейтрофилов можно обнаружить лимфоциты, моноциты, клетки Пирогова-Ланганса, фагоцитирующие споры гриба.

Криптококкоз вызывает *Cryptococcus neoformans*. Криптококкоз не является строго оппортунистическим микозом, он может поражать людей без иммунодефицита. Заражение происходит при вдыхании пыли с мелкими спорами гриба, лишенными капсулы. Заболевание проявляется слабостью, недомоганием, потливостью, кашлем со слизистой мокротой, иногда болью в груди и кровохарканьем. На фоне СПИД у заболевших отмечается лихорадка, кашель, одышка, потеря веса, кровохарканье, плевральный выпот, образование каверн и быстрая генерализация процесса. Криптококковая пневмония встречается более чем у трети больных СПИД.

При микроскопии в окрашенных азур-эозином препаратах мокроты обнаруживаются круглые, дрожжевидные почкующиеся клетки размером 4-8 мкм, с толстыми бесцветными стенками – это полисахаридная капсула. Для *Cryptococcus* характерно наличие полисахаридной капсулы и отсутствие мицелия. С помощью полисахаридной капсулы *Cryptococcus* противостоит фагоцитозу и подавляет образование ряда цитокинов, в частности, фактора некроза опухоли. *Cryptococcus neoformans* имеет фермент, которого нет у других болезнетворных грибов – фенолоксидазу, считаемую фактором патогенности. Защита организма от криптококковой инфекции обеспечивается, в первую очередь, клеточным иммунитетом –

Т-лимфоцитами и макрофагами. Поэтому тяжелые диссеминированные формы криптококкоза встречаются у больных с клеточным иммунодефицитом при СПИД, у больных получающих лечение кортикостероидами и цитостатиками (лимфома, саркоидоз, лейкозы, аутоиммунные заболевания). У больных с иммунодефицитом развивается хроническое заболевание легких, которое приводит к генерализации процесса гематогенным путем. Криптококкоз является СПИД – индикаторным заболеванием. При отсутствии терапии больные умирают от отека мозга.

Бактериоскопическое исследование препаратов, окрашенных по Цилю-Нильсену. Микроскопическое исследование мокроты должно выполняться в обязательном порядке, так как позволяет уже через 1-2 ч поставить этиологический диагноз и назначить адекватную этиотропную терапию. В зависимости от задач исследования готовят несколько мазков, которые окрашивают по Граму, Цилю-Нильсену или микроскопируют в нативном виде для выявления мицелия грибов и друз актиномицетов. По морфологическим и тинкториальным признакам при микроскопии мазка, окрашенного по Граму, можно ориентировочно идентифицировать следующие микроорганизмы, присутствующие в мокроте:

- скопления грамположительных кокков – *Staphylococcus spp.*, *Micrococcus spp.*;
- цепочки грамположительных кокков – *Streptococcus spp.*;
- ланцетовидные грамположительные диплококки, окруженные капсулой – *St. pneumoniae*;
- грамотрицательные диплококки – *Neisseria spp.*;
- грамотрицательные палочки – *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas spp.*, *Haemophilus spp.*, неспорообразующие анаэробы;
- грамотрицательные палочки с закругленными концами, окруженные капсулой – *Klebsiella spp.*;

- мелкие полиморфные грамотрицательные палочки в виде скоплений – *Haemophilus spp.*;

- обрывки тонкого несептированного ветвящегося мицелия фиолетового цвета, споры темно-фиолетового цвета и друзы розового цвета – *Actinomyces spp*

При бактериоскопическом исследовании диагностически значимо обнаружение трех и более пневмотропных микроорганизмов в большинстве полей зрения. Анализ результатов микроскопии мазка мокроты в сочетании с клинико-рентгенологическими особенностями течения заболевания, позволяет поставить ранний клинико-бактериологический диагноз более чем у 80% больных острой пневмонией или, по крайней мере, облегчает выбор антибактериального препарата на основании преобладания грамположительной или грамотрицательной микрофлоры. На основании морфологии микроорганизмов, выявляемых при бактериоскопии, может быть высказано более точное суждение об этиологии процесса, чем это возможно при анализе результатов рутинного бактериологического метода. Это связано с тем, что посев на питательные среды, обычно применяемые в настоящее время в практических лабораториях, не всегда позволяет обнаружить облигатных анаэробов, играющих ведущую роль при данной патологии. Кроме того, результаты целенаправленного бактериологического исследования на неспорообразующие облигатно анаэробные микроорганизмы можно получить только на 7-8-й день.

Оценка результатов бактериологического исследования проводится на основании сочетанного анализа информации о видовом составе микрофлоры (по данным бактериоскопического и бактериологического исследований), численности отдельных видов микроорганизмов, стабильности их выделения во времени, клинических данных и результатах лечения.

При оценке результатов бактериологического исследования необходимо принимать во внимание определяющее значение некоторых видов микроорганизмов в типичных клинических ситуациях.

В целом, главную роль в этиологии внебольничных пневмоний играет *St. pneumoniae*.

Этиологическая структура основных видов пневмоний:

- крупозная пневмония – *St. pneumoniae*;
- лобарная пневмония – *St. pneumoniae*, *Klebsiella spp.*, *Staphylococcus spp.*;
- очаговые пневмонии – *St. pneumoniae*, *H. influenzae*, энтеробактерии, *P. aeruginosa*.
- первичная атипичная пневмония – микоплазмы, легионеллы или хламидии;
- пневмония на фоне хронического бронхита – *H. influenzae*, *Streptococcus spp.*;
- пневмония на фоне гриппа – *Staphylococcus spp.*, *St. pneumoniae*, *H. influenzae*;
- аспирационная пневмония – энтеробактерии, *P. aeruginosa*, анаэробы;
- пневмония на фоне иммунодефицита – энтеробактерии, *Staphylococcus spp.*

Госпитальная пневмония у новорожденных (0-7 дней) чаще обусловлена *Streptococcus spp.*, *E. coli*, реже – *S. aureus*, *Chlamydia trachomatis*, *Pseudomonas spp.* Острые бронхиты и бронхиолиты, вызываются, как правило, вирусами или микоплазмами, но со 2-3-го дня заболевания осложняются присоединением бактериальной инфекции, чаще всего обусловленной *St. pneumoniae* или *H. influenzae*. Бронхолегочная инфекция у больных муковисцидозом наиболее часто вызывается *P. aeruginosa*. Господствующая роль в этиологии острых инфекционных деструкций легких принадлежит неспорообразующим анаэробам и *Staphylococcus spp.*

4.1.2. Клиническое значение химико-микроскопических лабораторных исследований

Туберкулез легких. У человека туберкулез в подавляющем проценте случаев вызывают микобактерии туберкулеза человеческого вида *Mycobacterium tuberculosis*. Микобактерии туберкулеза относятся к роду *Mycobacterium*. Для представителей этого рода характерно наличие чрезвычайно устойчивой к внешним воздействиям гидрофобной клеточной стенки. Ее высокая гидрофобность обусловлена наличием остатков миколовых кислот. Строение клеточной стенки обуславливает способность микобактерий к кислотоустойчивому окрашиванию, а также их более высокую по сравнению с другими бактериями устойчивость к кислотам и щелочам.

Методы микроскопических исследований. Устойчивость микобактерий к воздействию кислот и щелочей используют практически во всех методах микробиологического выявления этих микроорганизмов. Кислотоустойчивые микобактерии (КУМ) выявляют с помощью специальных методов окраски с использованием карболовых производных анилиновых или флуоресцентных красителей. Наиболее распространенным таким методом является окраска по Цилю–Нильсену. Микобактерии туберкулеза характеризуются выраженным многообразием форм существования, большим полиморфизмом и широким диапазоном изменчивости биологических свойств. Вышеприведенные причины не позволяют делать заключение о принадлежности обнаруженных КУМ к микобактериям туберкулеза (МБТ) или бациллам Коха на основании микроскопического исследования. Микроскопическое исследование направлено только на обнаружение КУМ.

Метод микроскопии по Цилю-Нильсену с вероятностью 50% выявляет КУМ в образцах мокроты, содержащих 5000 и более микобактериальных клеток. Этот метод позволяет зарегистрировать только 50-60% случаев туберкулеза. Однако, у больных с массивным бактериовыделением, представляющих собой наибольшую эпидемическую опасность, чувствительность метода превышает 90%. Специфичность этого метода очень высока – 98% и выше. Чувствительность метода микроскопии можно

повысить, если просматривать несколько мазков от одного пациента. Отрицательный результат бактериоскопического исследования не исключает диагноз туберкулеза, поскольку мокрота некоторых пациентов содержит меньше микобактерий, чем может выявить микроскопия.

При окраске мазков по методу Циля-Нильсена результаты оценивают по критериям, представленным в табл. 4.1.

Таблица 4.1

Оценка результатов микроскопического исследования по методу Циля-Нильсена

Число обнаруженных КУМ	Число просмотренных полей	Результат
Нет	На 300 полей	Отрицательный, КУМ не обнаружены в 300 полях зрения
1–2	На 300 полей	Результат не оценивают, необходимо исследовать еще одну порцию мокроты
1–9	На 100 полей	Положительный, указать точное количество КУМ, обнаруженных в 100 полях
10–99	На 100 полей	Положительный, 1+, (от 10 до 99 КУМ на 100 полей зрения)
1–10	В поле зрения	Положительный, 2+, (1-10 КУМ в 1 поле зрения в 50 полях зрения)
Более 10	В поле зрения	Положительный, 3+, (более 10 КУМ в 1 поле зрения, в 20 полях зрения)

Исследования методом посева. Большинство проб, поступающих в микробиологическую лабораторию для культурального исследования, в различной степени загрязнено быстрорастущими бактериями. Бурный рост этих бактерий на богатых питательных средах мешает развитию микобактерий и затрудняет их выделение. Поэтому перед посевом на питательную среду диагностический материал подвергают специальной обработке, обеспечивающей деконтаминацию, то есть гибель гноеродной и гнилостной микрофлоры. При этом используют свойство повышенной устойчивости микобактерий туберкулезного комплекса к кислотам и щелочам.

Посев диагностического материала на питательные среды – основной метод выделения микобактерий туберкулеза. Преимущество метода культурального исследования перед методом микроскопии – он позволяет выделить культуру возбудителя, которую затем можно подробно исследовать: описать видовую принадлежность и спектр лекарственной чувствительности. К недостаткам метода относят его высокую стоимость, сложность обработки диагностического материала, а также необходимость длительного ожидания результатов исследования (2-12 недель).

Ускоренные методы диагностики. Вследствие широкого распространения лекарственно устойчивых форм туберкулеза необходимо собирать данные о спектре лекарственной чувствительности возбудителя в течение первых нескольких дней после постановки диагноза. Из методов, известных в настоящее время, только молекулярно-генетические методы могут уложиться в необходимые сроки. Применение тест-систем, основанных на амплификации генов возбудителя туберкулеза, позволяет получить подтверждение принадлежности возбудителя к виду *M. tuberculosis* и наличие или отсутствие у выделенного штамма мутации, приводящей к устойчивости к изониазиду и/или рифампицину, в течение трех суток с момента поступления образца. Наиболее перспективна с точки зрения клинических потребностей комбинация методов исследования с применением автоматических анализаторов и жидких сред с молекулярно-генетическими методами. При появлении тест-систем, основанных на амплификации ДНК и способных эффективно выявлять возбудителей в образцах диагностического материала, этот метод будет оптимальным для лабораторной диагностики туберкулеза.

Бронхиальная астма. Мокрота появляется при длительном течении эндогенной бронхиальной астмы, особенно при ее сочетании с хроническим бронхитом. Мокрота может быть слизистой или слизисто-гноющей. Желтая или желто-зеленая мокрота появляется при распаде эозинофилов и других клеток и не обязательно свидетельствует об инфекции. Исследование мазков

мокроты помогает в оценке эффективности кортикостероидов и диагностике инфекции.

Мокроту собирают во время кашля. Если она не отходит, проводят ингаляцию физиологического раствора и перкуSSIONный массаж. В мазках обычно выявляется много макрофагов, эпителиальных клеток, нейтрофилов, слизи, фибрина, иногда обнаруживаются бактерии. При экзогенной бронхиальной астме в мокроте определяются клетки мерцального эпителия (25-35 %), эозинофилы (5-18 %), число нейтрофилов разное. При бронхиальной астме и хроническом бронхите в мокроте присутствуют те же клеточные элементы, однако преобладают нейтрофилы, содержание эозинофилов колеблется от 5 до 20 %. При обострении эндогенной бронхиальной астмы общее число клеток в мокроте увеличивается, однако соотношение между ними остается прежним, при обострении экзогенной бронхиальной астмы в мокроте повышается число эозинофилов. При лечении кортикостероидами число эозинофилов в мокроте уменьшается, что может быть критерием их эффективности при экзогенной бронхиальной астме.

При присоединении инфекции повышается число нейтрофилов и соотношение между нейтрофилами и эозинофилами, в мазке могут выявляться микробы. Для выявления возбудителя и определения его чувствительности к антимикробным средствам проводят посев мокроты. Это исследование особенно важно при частных приступах бронхиальной астмы и неэффективности лечения.

Патоморфологически при бронхиальной астме обнаруживается закупорка всех мелких бронхов вязкими желтоватыми слизистыми пробками. Легкие растянуты, имеется выраженная в различной степени осложняющаяся пневмония. Микроскопически обнаруживаются резкое увеличение количества бокаловидных клеток, бронхиальных желез, слущивание поверхностных слоев эпителия, утолщение базальной мембраны и множество эозинофильных гранулоцитов как в стенках бронхов, так и в содержащейся в

них слизи. В бронхиолах выраженных изменений не наблюдается. Могут появляться поля многослойной метаплазии и фиброз стенки бронхов. Макроскопически в мокроте видны желтоватые плотноватые, частью крошковатые клочки, в которых при микроскопическом исследовании выявляется большое количество фибрина, частично распадающихся эозинофильных гранулоцитов, кристаллы Шарко-Лейдена и спирали Куршмана.

Эпителиоциты бронхов находятся в мокроте в виде скоплений и пластов, могут быть метаплазированными или в состоянии жировой дистрофии. Иногда наблюдаются железистоподобные структуры. Аналогичные элементы можно обнаружить в мокроте и при аллергическом бронхите, сывороточной болезни и заболеваниях органов дыхания другой этиологии, протекающих с аллергическим компонентом, поэтому для правильной оценки результатов исследования мокроты необходимо учитывать данные клиники, особенно наличие основного синдрома бронхиальной астмы – приступа удушья.

В бронхоальвеолярном лаваже отмечается снижение количества альвеолярных макрофагов, некоторое повышение числа лимфоцитов и нейтрофилов, и особенно выражено увеличение эозинофилов.

Характерным признаком бронхиальной астмы в общем анализе крови является эозинофилия, которая увеличивается при частых приступах астмы. В ряде случаев эозинофилия наблюдается только перед приступом, после приступа и в ремиссию эозинофилия может отсутствовать. Высокие показатели гемоглобина и эритроцитов появляются при развитии недостаточности внешнего дыхания. Возможно увеличение альфа-2- и гамма-глобулинов), сиаловых кислот, гаптоглобина, фибриногена, серомукоида. В крови повышается концентрация IgG и снижается количество Т-супрессорных лейкоцитов. Определение общего количества и IgE может быть использовано для дифференциальной диагностики аллергической и

неаллергической астмы. Высокий уровень иммуноглобулина G (Ig G) характерен для рецидивирующей атопической астмы.

4.2. Исследование содержимого желудочно-кишечного тракта

4.2.1. Заболевания органов пищеварительной системы

Исследование физических и химических свойств желудочного содержимого. Слюна секретруется тремя парами слюнных желез (околоушными, подчелюстными и подъязычными), 90% слюны вырабатывается околоушными и подъязычными железами. Это серозная бесцветная, слегка опалесцирующая жидкость, содержащая 99% воды, бикарбонаты, некоторые органические вещества, а также гликопротеины (муцин), обволакивающие пищевой комок, амилазу и небольшое количество мальтазы. Слюна, выделяемая подъязычными железами, содержит также слизистые компоненты. В течение суток количество слюны, выделяемое здоровым человеком, может составлять от 1 до 2 литров, а в среднем 600-700 мл. *Амилаза* слюны расщепляет внеклеточный крахмал и гликоген принятой пищи на эритро- и ахродекстрины, которые затем, под влиянием того же фермента, превращаются в дисахарид мальтозу, которая ферментом мальтазой расщепляется до глюкозы. Весь этот довольно сложный процесс гидролиза происходит в полости рта в течение 5-10 секунд.

Гидролиз компонентов пищи продолжается в желудке в течение 20-30 мин, до тех пор, пока пищевая масса, не пропитается кислым желудочным соком. В течение этого времени происходит почти полное расщепление внеклеточных углеводов до глюкозы и мальтозы.

Запах нормального содержимого слегка кисловатый или отсутствует. При гипо- или ахлоргидрии за счет продуктов брожения появляется запах масляной, молочной или уксусной кислоты. Цвет у нормального

содержимого отсутствует. В присутствии крови HCl превращает гемоглобин в гематин, который окрашивает желудочное содержимое в коричневый цвет. Интенсивность окраски зависит от степени кровотечения. Слизь всегда присутствует в скудном количестве, увеличивается при гастритах и язвах желудка.

Желудочный сок обладает выраженным бактерицидным свойством, обусловленным соляной кислотой и лизоцимом. Желудочный сок здорового человека не содержит бактерий. В то же время при ахлоргидрии и ахилии в желудке развивается обильная микробная флора, включая грамотрицательную, характерную для толстой кишки. В желудке доминируют два главных процесса: секреция соляной кислоты, необходимая для химической обработки пищи, и секреция пепсиногена, гастрина и катепсина для протеолитической обработки пищи. Соляная кислота секретруется париетальными (обкладочными) клетками перешейка трубчатых желез желудка, а энзимы – главными клетками, расположенными также в трубчатых железах слизистой дна желудка. При обычной смешанной пище железы слизистой оболочки желудка выделяют около 1,5-2,0 л желудочного сока.

Кислото-, ферментно белковообразующие и эвакуаторная функции желудка. Чистый желудочный сок – это бесцветная, слегка опалесцирующая жидкость, рН которой колеблется в пределах 1,2-3,5. Относительная плотность желудочного сока 1,002-1,007 г/мл. В нем содержатся желатиназа, липаза, лизоцим, муцин и слизь. Соляная кислота растворяет поступающие в желудок с растительной пищей кристаллы оксалата кальция и мацерирует оболочку клеток перевариваемой клетчатки, содержащей крахмал и другие углеводы. Под действием соляной кислоты мышечные волокна разволокняются. Пепсиноген, активируемый соляной кислотой в пепсин при рН 1,2-1,8, расщепляет коллаген пищи до альбумоз и пептонов. Желатиназа расщепляет содержащийся в соединительной ткани белок желатин.

Пептиды, образующиеся при расщеплении пепсином белков, стимулируют выработку клетками антрального отдела желудка гастрина, катепсина, гистамина и ацетилхолина. Максимальная активность гастрина проявляется при рН 3,2 катепсина – при рН 3,5. Эти два фермента осуществляют створаживание молока. В грудном возрасте в желудке выделяется много катепсина. Вырабатываемый в желудке «внутренний фактор» Кастла – кофактор, необходимый для экстрагирования из пищи витамина В₁₂, он связывается с витамином В₁₂ и способствует его всасыванию в тонкой кишке.

Клетки дна желудка вырабатывают желудочную липазу, которая при рН 5,0 расщепляет жиры пищи до глицерина и жирных кислот, но она не играет существенной роли в процессе катаболизма пищевых жиров у взрослых, так как действует только на эмульгированные жиры, которые находятся в молоке. У грудных детей она расщепляет до 25% молочных жиров. В желудке продолжается расщепление углеводов, начавшееся в полости рта амилазой слюны. У человека большая часть внеклеточного крахмала расщепляется амилазой слюны именно в желудке (оптимальная рН амилазы слюны 6,7-7,4).

При атрофическом гастрите в зависимости от тяжести поражения снижается образование HCl и пепсина. Для язвы характерна усиленная пепсинообразующая функция и выделение щелочного компонента. Выявление ахлоргидрии у больных язвой желудка рассматривается как признак рака. При хроническом гастрите, язве этиологическим фактором этих заболеваний и фактором риска рака желудка являются неспорообразующие грамм-отрицательные бактерии *Helicobacter pylori*.

Сок поджелудочной железы. Сок поджелудочной железы представляет собой бесцветную жидкость щелочной реакции (рН 7,8-8,4) с относительной плотностью 1,007-1,009г/мл. В сутки выделяется около 700 мл сока. В соке поджелудочной железы содержится большое количество бикарбонатов и ферменты. Протеолитические ферменты разделяются на 2 группы:

протеиназы (трипсин, хемотрипсин, эластаза, калликреин) и карбоксипептидазы. Карбоксипептидазы расщепляют пептидную цепь со стороны, в которой находится конечная аминокислота, содержащая карбоксильную группу. Аминопептидазы действуют на пептидную цепь в непосредственном соседстве с аминокислотой, имеющей свободную аминогруппу. Нуклеаза расщепляет нуклеиновые кислоты до простых нуклеотидов. Липаза расщепляет жиры до глицерина и жирных кислот. Амилаза расщепляет полисахариды до дисахаридов.

Исследование дуоденального содержимого, физические свойства.

Желчь в период пищеварения через общий желчный проток поступает непосредственно в полость двенадцатиперстной кишки, а в покое скапливается в желчном пузыре и общем желчном протоке. Различают дуоденальную, печеночную и пузырную желчь. Дуоденальная желчь золотисто-желтого цвета с относительной плотностью 1,010-1,015 г/мл и рН 7,2-7,4. Пузырная желчь темно-коричневого цвета, сгущается в результате резорбции воды. Ее концентрации в 3-4 раз больше дуоденальной и в 5-6 раз больше печеночной, относительная плотность 1,016-1,040 г/мл, рН 6,5-7,4. Печеночная желчь лимонно-желтого цвета, ее относительная плотность 1,007-1,010 г/мл и рН 7,5-8,2. Основные компоненты, придающие своеобразие желчи, это желчные пигменты, желчные кислоты и их соли, холестерин. Путем секреции в желчь из организма выделяются водонерастворимые вещества, в частности холестерин. Желчные кислоты – это таурохолевая и, преимущественно, гликохолевая. В течение суток образуется 10-20 г желчных кислот. Желчные кислоты уменьшают поверхностное натяжение капель жира и подвергают их тонкому эмульгированию, что увеличивает площадь действия липазы. Соли желчных кислот (натриевые соли гликохолевой и таурохолевой кислоты) активируют липазу. Желчные кислоты образуют с жирными кислотами водорастворимые комплексы – мицеллы, что облегчает их совместную резорбцию, затем желчные кислоты вновь возвращаются через кровотоки в печень.

Желчь активизирует липазу поджелудочной железы в просвете двенадцатиперстной и тонкой кишки. В присутствии желчи активность липазы увеличивается в 20 раз. Желчь эмульгирует жиры, ускоряет абсорбцию жирных кислот, холестерина, аминокислот, солей кальция и растворимых в жирах витаминов. Желчь образуется в гепатоцитах в течение суток в зависимости от потребностей в количестве 500-1200 мл.

Фракционное дуоденальное зондирование – процесс получения дуоденального содержимого, разделенный на пять фаз с отбором фракций желчи в пробирки каждые 10 мин. Этот вариант зондирования позволяет оценить проходимость желчевыводящих путей и эвакуационную способность желчного пузыря, дает возможность получить материал для микроскопического исследования. Определение количества дуоденального содержимого в различные фазы зондирования, динамики и скорости его выделения, результатов микроскопического исследования слизи и осадка помогают в диагностике дуоденита, холангита, холедохита, ангиохолита, холецистита, дискринии, нарушений функции желчевыводящих путей и двенадцатиперстной кишки.

Микроскопическое исследование дуоденального содержимого при заболеваниях двенадцатиперстной кишки желчевыделительной системы. Микроскопическому исследованию должны быть подвергнуты все порции желчи, содержащие взвешенные хлопья слизи и/или осадок на дне пробирок. При этом необходимо учитывать, что протеолитический фермент поджелудочной железы, трипсин, находится в активном состоянии и быстро расщепляет клеточные элементы. Микроскопическое исследование желчи необходимо проводить немедленно, по мере получения очередной пробирки (фракции), так как уже через несколько минут клеточные элементы двенадцатиперстной кишки и желчевыводящей системы, заключенные в рыхлую слизь, будут частично или полностью лизированы. Долго сохраняются в дуоденальном содержимом клеточные элементы дыхательных путей (носовая слизь, мокрота), заключенные в густую и плотную слизь. При

длительном стоянии *in vitro* нарушается коллоидная стабильность полученной желчи, из раствора выпадают кристаллы желчных кислот или холестерина, а билирубин окисляется до биливердина, что сопровождается позеленением желчи.

При воспалении внутрипеченочных ходов (холангит, холангиогепатит) лейкоциты сочетаются с *низким призматическим эпителием*, выстилающим внутрипеченочные ходы. Этот эпителий имеет высоту 15–18 мкм, ядра располагаются близко к основанию клеток. Однако, если в слизи данной порции обнаруживается в большом количестве только низкий цилиндрический эпителий, диагноз холангита или холангиогепатита не исключается, так как лейкоциты обычно разрушаются непосредственно во внутрипеченочных желчных ходах.

При холедохите (воспаление общего желчного протока), лейкоциты сочетаются со «*спичечным*» эпителием, выстилающим общий желчный проток (длинный и узкий цилиндрический эпителий высотой до 40–50 мкм и шириной 5–6 мкм). Большое количество этого эпителия, покрывающее все поле зрения, даже без сочетания с лейкоцитами позволяет поставить или подтвердить диагноз холедохита.

При холецистите *цилиндрический эпителий*, выстилающий желчный пузырь обнаружить практически не удастся, так как отторгнутый при воспалении цилиндрический эпителий желчного пузыря и лейкоциты разрушаются *in vivo*, непосредственно в желчном пузыре. При холецистите во время операции лейкоциты обнаруживаются не в просвете, а непосредственно в воспаленной стенке желчного пузыря, что подтверждается при микроскопии желчи, полученной при пункции желчного пузыря перед его удалением. О наличии холецистита при дуоденальном зондировании можно судить по темно-зеленой или зеленоватой окраске только что полученной пузырьной порции желчи.

Лейкоциты при воспалении двенадцатиперстной кишки, дуодените, располагаются на фоне *цилиндрического кутикулярного эпителия*. На

свободной, обращенной в полость двенадцатиперстной кишки поверхности этого эпителия имеется довольно толстая *кутикула*, образующая исчерченную кайму, хорошо различимую в нативных препаратах. Кутикула состоит из сети тонких перекладин, между которыми находятся узкие каналы. Через эти каналы происходит всасывание. Цилиндрический кутикулярный эпителий имеет высоту 45-52 мкм, ширину в апикальной части 12-16 мкм, крупные ядра овальной формы, веретенообразно выдавливающие нижнюю часть клеток.

При дуодените в слизи всех фракций дуоденального содержимого обнаруживаются скопления и большие пласты кутикулярного эпителия в виде палисада или пчелиных сот. Эпителий двенадцатиперстной кишки постоянно травмируется кислым содержимым желудка, поэтому в норме он полностью обновляется в течение 2 суток.

Осадочные образования – их присутствие желчи указывает на потерю ее коллоидной стабильности и позволяет заподозрить дискринию или наличие камней в желчных протоках.

Диагностическое значение имеют следующие осадочные образования: микролиты, билирубинат кальция, кристаллы холестерина, кристаллы жирных кислот, кристаллы желчных кислот.

Микролиты – темноватые, преломляющие свет округлые или многогранные образования, обнаруживаются чаще в порции желчи, поступающей в двенадцатиперстную кишку в конце «пузырного рефлекса», но иногда и в первой порции желчи у больных с клинически выраженной патологией желчевыводящих путей. В микролитах округлой формы входят слизь, известь и небольшое количество холестерина.

Кристаллы холестерина – бесцветные, прозрачные прямоугольной формы пластинки обычно с выемками в виде ступенек. Кристаллы холестерина растворяются в концентрированной серной кислоте с образованием соединений красного цвета. Кристаллы холестерина встречаются у лихорадящих больных, иногда у практически здоровых людей.

Холестерин может выпадать в осадок в чистых порциях желчи при ее длительном стоянии.

При патологии желчевыводящих путей кристаллы холестерина в первой порции желчи встречаются часто в большом количестве в виде осадка на дне пробирок или в хлопьях слизи, что объясняется временной потерей коллоидной стабильности желчи. Поэтому содержание большого количества кристаллов холестерина в желчи не является доказательством наличия желчных камней и свидетельствует только о высоком риске их образования. При этом целесообразно проведение профилактических мероприятий, направленных на предупреждение образования камней в желчевыводящих путях.

Билирубинат кальция – бурые, желтые или черные комочки, глыбки пигмента, встречаются в большом количестве в желчи пожилых людей, страдающих заболеваниями печени, продолжительным неполным застоем желчи. Билирубинат кальция в отдельных хлопьях слизи, часто в сочетании с кристаллами холестерина и крупинками желчных кислот, служит основой для образования камней.

Кристаллы желчных кислот – мелкие блестящие, коричневатые, ярко-желтые или серые зернышки, часто покрывающие все поля зрения в слизи нативного препарата. Большое количество аморфных кристаллов свободных желчных кислот наблюдается в дуоденальной желчи при примеси кислого желудочного сока. При этом дуоденальная желчь становится равномерно мутной, а на дне пробирки скапливается обильный осадок. Результаты исследования загрязненной желудочным соком желчи в бланк-ответ не вносятся.

Соли желчных кислот входят в состав желчных камней, поэтому обнаружение их в незагрязненных фракциях желчи свидетельствует о дискринии.

Кристаллы жирных кислот – длинные нежные иглы, часто сгруппированные в пучки. Если кристаллы жирных кислот обнаружены

только в порции пузырной желчи, то вероятно это связано со снижением рН за счет воспалительного процесса, а также уменьшением их растворимости в желчи. Жирные кислоты в больших количествах отщепляются от лецитина желчи под влиянием фермента – лецитиназы, активность которой увеличивается в присутствии солей дезоксихолевой кислоты, глютаминовой кислоты и бактерий.

При микроскопическом исследовании только что полученных фракций желчи можно обнаружить подвижные трофозоиды лямблий, личинки *Strongyloides stercoralis*, яйца печеночного сосальщика.

Клиническое значение химико-микроскопических лабораторных исследований. Исследование кишечного отделяемого необходимо при обследовании больных, страдающих заболеваниями ЖКТ. Оно позволяет диагностировать:

- нарушение кислотообразующей и ферментативной функций желудка;
- ферментативной функции кишечника, поджелудочной железы;
- нарушение функции печени;
- наличие ускоренной эвакуации из желудка и кишечника;
- нарушение всасывания в двенадцатиперстной и тонкой кишке;
- воспалительный процесс на том или ином уровне ЖКТ.

Исследования желудочного сока – один из основных методов, позволяющих изучать функциональное и морфологическое состояние слизистой оболочки желудка, а также ориентировочно оценивать эвакуаторную функцию желудка. Наибольшее распространение для характеристики желудочной секреции получили различные зондовые и беззондовые методы исследования. Метод зондирования является главным для изучения секреторной (количество желудочного сока), кислотообразующей и ферментообразующей функций желудка, объединяемых часто одним термином «секреторная» функция. На начальном

этапе желудочного зондирования в течение 1 часа проводят исследование интенсивности секреции желудочных желез («базальной секреции» в период их функционального покоя. Для изучения секреторной деятельности слизистой оболочки желудка в условиях желудочного пищеварения в лаборатории зондовых исследований стимуляцию секреции в ответ на пищу имитируют у пациентов подкожным введением медикаментозных стимуляторов желудочной секреции (гистамин, гисталог, пентагастрин). Химические раздражители желудочной секреции позволяют получить чистый, годный для лабораторного анализа желудочный сок. От применения пищевых возбудителей желудочной секреции (кофеин, алкоголь, капустный отвар, мясной бульон и др.) в настоящее время отказываются вследствие слабых стимуляторных свойств данных продуктов и невозможности получения объективной оценки состояния кислотообразования и ферментной продукции желудком.

Беззондовые методы исследования желудочной секреции (определение уропепсина в моче, десмоидная проба или тест с ионообменной смолой - ацидотест) имеют только ориентировочное значение. Они позволяют получить ответ лишь на вопрос относительно того, сохранена ли секреторная способность желудка, да и то лишь приблизительно. Исследование пациентов, находящихся в стационаре и обследуемых в поликлинике, у которых, по мнению врача, наличие болезней желудка, двенадцатиперстной кишки и других органов пищеварения вполне реально, беззондовыми методами оценки желудочной секреции нецелесообразно.

Дуоденальное зондирование имеет важное значение при заболеваниях печени и желчных путей, поскольку одной из составных частей его является желчь. По данным исследования дуоденального содержимого можно судить о желчевыделении и о состоянии желчных путей. Этот метод позволяет судить о характере концентрационной (всасывание воды из желчи, сгущение ее) и сократительной (перемешивание желчи и выведение ее в кишку) функций желчного пузыря, о функциональном состоянии сфинктера Одди, о

наличии воспалительных элементов, болезнетворных микробов и возбудителей ряда заболеваний в желчных путях. Исследования дуоденального содержимого может дать ценную диагностическую информацию при выяснении функции поджелудочной железы.

В последние годы широко используется 5-фракционный (многомоментный) метод дуоденального зондирования. Он позволяет изучить время выделения отдельных фракций с учетом количества поступающей желчи, темпа ее выделения и последующего тщательного качественного анализа каждой фракции.

Химический состав желчи свидетельствует о функции печени, состоянии обмена веществ организма, процессах (в том числе патологических), протекающих в желчном пузыре. По результатам микроскопического исследования желчи можно судить о состоянии коллоидных ее свойств, устанавливать характер осадка (соли, «песок» и др.), обнаружить присутствие паразитов (лямблии, яйца печеночной, кошачьей и китайской двуусток, личинки кишечной острицы и др.), способных вызвать заболевание печени, желчевыводящих путей, двенадцатиперстной кишки. Бактериологическое исследование желчи имеет не столь большое клиническое значение, однако оказывает существенную помощь в идентификации микробной флоры, заселяющей желчные пути.

4.2.2. Заболевания кишечника

Анализ кала является важным исследованием, позволяющим подтвердить и/или установить поражение желудка, кишечника, печени и поджелудочной железы, следить за развитием заболевания и за результатами лечения. При тщательно проведенном копрологическом анализе возможна диагностика язвенного, аллергического, спастического колита; диагностика поражения злокачественным новообразованием дистального отдела толстой кишки.

При исследовании фекалий можно обнаружить вегетативные формы простейших, их цисты, яйца, личинки и взрослые особи гельминтов.

Исследование физических и химических свойств кишечного содержимого. Здоровый человек за 24 ч выделяет 100-200 г каловых масс. Преобладание в рационе белковой пищи сопровождается уменьшением, растительной – увеличением их количества. Количество каловых масс резко уменьшается при запорах, спастических колитах. Напротив, увеличение их количества характерно для поражений поджелудочной железы (до 1 кг/сут и более), а также встречается при недостаточном переваривании в толстой кишке (бродильная и гнилостная диспепсия, воспалительные процессы), при колите, сопровождающемся поносом, изъязвлениями, ускоренной эвакуацией химуса из кишечника.

Физические свойства кала. Консистенция кала зависит от содержания в нем воды, растительной клетчатки, слизи и жира. Содержание воды в норме составляет 80-85% и зависит от времени пребывания каловых масс в дистальном отделе толстой кишки, где происходит всасывание жидкости. При поражении эпителия толстой кишки, при гиперсекреции слизи клетками толстой и прямой кишки, при наличии воспалительного экссудата не всосавшаяся вода придает калу жидкую, водянистую консистенцию. В присутствии большого количества неизмененного или расщепленного жира кал становится мазевидным или тестообразным, а при большом содержании перевариваемой клетчатки – кашицеобразным, «слизистым».

Мазевидный характер фекалии приобретают при нарушении секреции поджелудочной железы (острый панкреатит, некроз поджелудочной железы, муковисцидоз). Жидкий, водянистый кал характерен для недостаточного переваривания в тонкой кишке при энтерите, ускоренной эвакуации, ахолии (синдром нарушения всасывания в тонкой кишке). Такой же характер фекалий можно наблюдать при поражении толстой кишки (колит с изъязвлениями, гнилостный колит) – в основном в результате нарушения всасывания воды в дистальном отделе толстой кишки. Повышенная

секреторная функция слизистой оболочки толстой кишки приводит к ложным поносам. Кашицеобразный характер кал приобретает при бродильной диспепсии, колите, хроническом энтероколите и ускоренной эвакуации содержимого толстой кишки. Пенистый кал бывает при бродильном колите, дисбиозе и дисбактериозе. Крошковатый оформленный и бесцветный кал характерен для ахолии. «Овечий» кал, в виде мелких, округлых фрагментов образуется при спастическом колите. Лентовидную, карандашеобразную форму фекалии приобретают при наличии у больного геморроидальных узлов, спазма ректального сфинктера, трещины заднего прохода, при опухоли прямой кишки.

Цвет нормальных каловых масс коричневый, обусловлен наличием стеркобилина. Цвет фекалий меняется при патологических процессах в пищеварительной системе. Черный или дегтеобразный цвет фекалии приобретают при кровотечении из желудка, двенадцатиперстной и тонкой кишки. Темно-коричневый цвет отмечается при недостаточности желудочного пищеварения, при гнилостной диспепсии, колите с запором, с изъязвлением, при повышенной секреторной функции толстой кишки, при запорах. Такая окраска обусловлена стеркобилином и скудным содержанием бесцветного стеркобилиногена. Светло-коричневый цвет фекалии приобретают при ускоренной эвакуации содержимого толстой кишки из-за большого содержания в нем бесцветного стеркобилиногена. Красноватый кал выделяется при колите с изъязвлениями и обусловлен присоединением свежей крови. Желтый цвет фекалии приобретают за счет преимущественного содержания стеркобилиногена при недостаточности переваривания в тонкой кишке, при бродильной диспепсии и ускоренной эвакуации химуса по кишечнику. Серый, бледно-желтый цвет фекалий типичен для недостаточности поджелудочной железы и обусловлен частыми дефекациями, при которых фекалии содержат только стеркобилиноген. При окислении кислородом воздуха бесцветные фекалии покрываются темно-коричневой коркой – стеркобилиноген окисляется до коричневого

серкобилина. Белый кал выделяется при внутриспеченочном застое или полной обтурации общего желчного протока.

Запах каловых масс в норме обусловлен продуктами распада белков (индол, скатол, фенол, орто- и паракрезолы). При обилии белков в пище запах усиливается. Запах почти полностью исчезает при запорах, так как часть ароматических веществ всасывается. Гнилостный запах наблюдается при недостаточности желудочного пищеварения, гнилостной диспепсии, язвенном колите – при этих патологиях образуются сероводород и метилмеркаптаны.

Зловонный (запах прогорклого масла) отмечается при нарушении секреции липазы поджелудочной железой, а также при ахолии (отсутствии поступления желчи). Этот запах обусловлен бактериальным разложением жира и жирных кислот. Кислый запах встречается при бродильном процессе в толстой кишке и возникает за счет образования летучих органических кислот (масляная, уксусная, валериановая) при нарушении всасывания жирных кислот в тонкой кишке (острый энтерит, ускоренная эвакуация расщепленной пищи из тонкой кишки).

Химическое исследование фекалий. Химическое исследование фекалий складывается из определения рН, выявления скрытого воспалительного процесса, обнаружения скрытого кровотечения, диагностики обтурации желчевыделительной системы. Для обнаружения причисленных патологических состояний возможно применение диагностических полосок, позволяющих определить рН фекалий, наличие белка, крови, стеркобилина, билирубина, лейкоцитов.

Кислотность каловых масс (рН). В норме у практически здоровых людей, находящихся на смешанной пище, реакция кала нейтральная или слабощелочная (рН 7,0-7,5), она обусловлена продуктами жизнедеятельности нормальной бактериальной флоры толстой кишки. Кислая реакция (рН 6,0-6,5) может быть связана с присутствием жирных кислот (ускоренная эвакуация расщепленного химуса или нарушение всасывания в результате

воспалительного процесса в тонкой кишке). Резко кислая реакция (рН 5,0-5,5) характерна для усиленных бродильных процессов в толстой кишке (бродильная диспепсия: бродильный дисбиоз, дисбактериоз, колит). При поступлении в толстую кишку большого количества нерасщепленных углеводов происходит пролиферация бродильной флоры нормальной, а затем и патологической. Усиленные процессы брожения приводят к образованию углекислого газа и органических кислот, вызывающих мацерацию и экссудацию слизистой толстой кишки, т.е развитие бродильного колита. Щелочная реакция (рН 8,0-8,5) наблюдается при усиленных процессах гниения остатков белковой пищи, непереваренной в желудке и/или в тонкой кишке, и/или воспалительного экссудата, поступающего в толстую кишку при энтерите. Сдвиг рН в щелочную сторону приводит к активации гнилостной флоры и образованию в толстой кишке аммиака и других компонентов гниения, которые раздражают слизистую толстой кишки, вызывая мацерацию, а затем экссудацию и развитие гнилостного колита, при котором рН каловых масс обычно резко щелочная и колеблется от 8,5 до 9,5 ед.

Белок. В каловых массах здорового человека белка нет. Положительная реакция на белок свидетельствует о наличии воспалительного экссудата, слизи, непереваренного пищевого белка или кровотечения. Белок в каловых массах обнаруживается при поражении желудка (гастрит, язва, рак), двенадцатиперстной кишки (дуоденит, язва, рак фатерова соска), тонкой кишки (энтерит, целиакия), толстой кишки (колит бродильный, гнилостный, язвенный, аллергический, полипоз, рак, дисбактериоз, повышенная секреторная функция толстой кишки), прямой кишки (геморрой, трещина, проктит, рак).

Лейкоциты. Каловые массы здорового взрослого человека и ребенка не содержит лейкоцитов (нейтрофилов). Скудное количество нейтрофилов присутствует в слизи грудных детей (слабо положительная реакция на белок в сочетании со слабо положительной реакцией на лейкоциты). При

поражении воспалительным процессом слизистой дистальных отделов толстой и прямой кишки на фоне слизи в экссудате можно диагностировать нейтрофилы, эозинофилы и клетки цилиндрического эпителия. При воспалении слизистой верхних отделов толстой кишки и при воспалении тонкой и двенадцатиперстной кишки практически не удается обнаружить при микроскопическом исследовании нативных препаратов, приготовленных из каловой эмульсии, ни слизи, ни клеточных элементов.

Тест-полоской на лейкоциты в сочетании с тестом на белок удается диагностировать наличие воспаления тонкой, толстой и прямой кишки, даже если при микроскопии не были обнаружены в слизи лейкоциты.

Кровь. Положительная реакция на кровь (гемоглобин) указывает на кровотечение из любого отдела пищеварительного тракта: десен, варикозных вен пищевода, желудка, кишечника, пораженных язвенным, воспалительным процессом или злокачественным новообразованием слизистой. Кровь в кале появляется при геморрагическом диатезе, язве, полипозе, геморрое. Кровотечение из верхнего отдела толстой кишки, из тощей и тонкой кишки можно подтвердить при обнаружении в кале кристаллов гематоидина. Гематоидин образуется при распаде гемоглобина без доступа кислорода. Это золотистого цвета иглы и ромбики. Алая кровь – свидетельство кровотечения из толстой кишки.

С помощью диагностических полосок выявляется так называемая «скрытая кровь», которая не определяется при макроскопическом исследовании. Иммунохроматографические тесты позволяют определять в кале только человеческий гемоглобин и не реагируют на редуцирующие вещества, такие как хлорофилл, продукты распада крови животных (мясные, рыбные и др. продукты) и на лекарственные препараты, содержащие железо.

Сочетание положительной реакции на белок и лейкоциты с быстрой положительной реакцией на кровь (гемоглобин) подтверждает заболевание слизистой ЖКТ. Для диагностики колоректального рака активно внедряется тест для одновременного определения в кале гемоглобина и трансферрина.

Уробилиноген и стеркобилиноген являются конечными продуктами катаболизма билирубина в кишечнике. Аналитически различить уробилиноген и стеркобилиноген весьма трудно. Уробилиноген (i-уробилиноген) всасывается в двенадцатиперстной и тонкой кишке и окисляется до дипиролов в печеночных клетках. Стеркобилиноген образуется из билирубина желчи в толстой кишке в результате жизнедеятельности нормальной бактериальной флоры. В дистальном отделе толстой кишки он окисляется до стеркобилина. Стеркобилиноген бесцветен, а продукт его окисления стеркобилин окрашивает каловые массы здорового человека в разные оттенки коричневого цвета. В сутки с калом выделяется от 40 до 280 мг стеркобилиногена и стеркобилина.

При полной обтурации желчевыводящих путей стеркобилин и стеркобилиноген в кале отсутствуют. Кал становится бесцветным. При остром панкреатите с калом выделяется стеркобилиноген. Каловые массы имеют светло-серую окраску. Поверхностный слой каловых масс *in vitro* приобретает темно-коричневую окраску в результате окисления кислородом воздуха стеркобилиногена в стеркобилин. При скрытом дисбактериозе содержание стеркобилиногена снижено и обнаруживается билирубин, так как патологическая бактериальная флора толстой кишки не способна восстановить весь билирубин до стеркобилиногена.

Билирубин. В норме билирубин содержится в меконии и фекалиях ребенка, находящегося на грудном вскармливании, примерно до 3-х месячного возраста. К этому времени в ЖКТ ребенка появляется нормальная бактериальная флора, которая частично восстанавливает билирубин до стеркобилиногена. К 6-7 месяцу жизни билирубин почти полностью окисляется кишечной флорой до стеркобилиногена-стеркобилина. У здорового ребенка в 9 месяцев в кале ребенка присутствует только стеркобилиноген-стеркобилин.

Обнаружение в кале билирубина указывает на патологию: быстрая эвакуация пищи по кишечнику, тяжелый дисбактериоз (отсутствие

нормальной бактериальной флоры в толстой кишке, подавление микрофлоры кишечника при длительном приеме антибиотиков и сульфаниламидных препаратов). Сочетание стеркобилина с билирубином указывает на появление в толстой кишке патологической флоры и вытеснение ею нормальной флоры (скрытый, вялотекущий дисбактериоз) или быструю эвакуацию химуса из кишечника.

Микроскопическое исследование отделяемого кишечника. В норме в кале при микроскопическом исследовании в нативном препарате на фоне большого количества мелкозернистой массы калового детрита, состоящего из живых и мертвых бактерий и недифференцируемых остатков съеденной пищи, встречаются единичные в редких полях зрения лишенные исчерченности (сарколеммы) мышечные волокна, скудное количество солей жирных кислот (мыл) и остатки растительной пищи в виде непереваримой клетчатки. Непереваренное мясо в виде белесоватых клочков волокнистого строения (мышечные волокна, связки, хрящи, фасции, сосуды) можно обнаружить при приготовлении каловой эмульсии. Различают переваримую и непереваримую растительную клетчатку. Переваримая клетчатка состоит из клеток, имеющих тонкую, легко разрушающуюся оболочку. Через эту оболочку легко проникают пищеварительные ферменты, которые расщепляют содержимое клетки. Мякоть растительной пищи (переваримая клетчатка) видна в неоформленном кале и в каловой эмульсии в виде прозрачных, бесцветных, напоминающих слизь округлых комочков, иногда окрашенных в тот или иной цвет в зависимости от съеденной растительной пищи. Обнаружение переваримой клетчатки указывает на быструю эвакуацию пищи или на отсутствие в желудочном соке соляной кислоты. Растительная непереваримая клетчатка обнаруживается при микроскопическом исследовании в каждом кале, как в нормальном, так и в патологическом. Такая клетчатка не подвергается действию ферментов пищеварительной системы человека. Она отличается толстыми оболочками клеток, и толстыми межклеточными перегородками, обилием растительных сосудов.

Пищеварительные органы человека не вырабатывают ферментов, способных ее расщепить. Некоторые микроорганизмы толстой кишки обладают такими ферментами и расщепляют непереваримую растительную клетчатку. Такая микрофлора находится в илиоцекальной области: клостридии, *Bacillus cellulose dissolvens*, *Bacillus mesentericus vulgaris*. Однако даже при нормальном темпе передвижения пищи по толстой кишке микроорганизмы не успевают расщепить всю непереваримую растительную клетчатку. Количество выделяемой с калом растительной клетчатки по сравнению с вводимой с пищей уменьшается до 50-60%. Поэтому непереваримая растительная клетчатка при микроскопическом исследовании кала обнаруживается легко, но этот показатель не имеет диагностического значения.

Непереваримая растительная клетчатка в кале отличается огромным разнообразием, может напоминать различные элементы кала, такие как остатки непереваренной белковой пищи, мышечные волокна, соединительную ткань. Обнаружение капель растительного жира, содержащегося внутри клеток грубой непереваримой клетчатки (семечки, орехи) может быть неверно истолковано, как патогномичный признак нарушения липолиза при недостаточности поджелудочной железы

Интерпретация результатов копрологического исследования при ахилии-ахлоргидрии, гиперхлоргидрии, ахолии, быстрой эвакуации пищи из желудка. Недостаточность пищеварения в желудке. Ахилия, ахлоргидрия при микроскопическом исследовании кала проявляется большим количеством мышечных волокон с резко обрубленными краями, покрытых сарколеммой с исчерченностью продольной или поперечной и расположенных преимущественно пластинами. Просматривается соединительная ткань, пласты и клетки перевариваемой клетчатки, кристаллы оксалата кальция.

Быстрая эвакуация пищи из желудка или гипохлоргидрия диагностируются в кале по большому количеству разрозненно лежащих

мышечных волокон с поперечной или продольной исчерченностью и без нее, по умеренному количеству переваримой клетчатки и единичным в редких полях зрения кристаллам оксалата кальция. В препарате с раствором Люголя можно обнаружить незначительное количество вне- и/или внутриклеточного крахмала на разных стадиях переваривания.

Гиперхлоргидрия диагностируется при обнаружении в кале большого количества покрытых сарколеммой (с продольной исчерченностью), разрозненно лежащих мышечных волокон и соединительной ткани.

Нарушение желчеотделения. Ахолия характерна для печеночных и подпеченочных желтух. Кал бесцветный. При микроскопическом исследовании выявляется большое количество жирных кислот (стеаторея) в виде капель или игл. При запорах, типичных для ахолии, жирные кислоты, невоссавшиеся в тонкой кишке из-за отсутствия желчных кислот, поступают в огромном количестве в толстую кишку, где реагируют с ионами K^+ , Ca^+ , Mg^+ , Na^+ , $R_{неорг.}$, образуя соли жирных кислот – мыла. Стеаторея, представленная мылами, обнаруживается при микроскопии нативного препарата. Это иглы и/или глыбки, содержащиеся в огромном количестве в каловом детрите. Стеаторея при ахолии, представленная жирными кислотами или солями жирных кислот, является следствием отсутствия желчных кислот.

Особенности копрограмм при заболеваниях поджелудочной железы, тонкой и толстой кишки, нарушения эвакуаторной функции кишечника и врожденной патологии. Особенности копрограмм при заболеваниях поджелудочной железы. При поражении поджелудочной железы (острый панкреатит, некроз, муковисцедоз) каловые массы, если они оформленные, покрыты блестящим жирным налетом. В жидких фекалиях жир виден на поверхности. Это не расщепленный нейтральный жир (триглицериды), наличие его в кале является показателем нарушения панкреатического пищеварения. Большое количество нейтрального жира (стеаторея), обнаруженное при микроскопическом исследовании каловой эмульсии,

свидетельствует об отсутствии липазы. Капли нейтрального жира в препарате с метиленовой синью остаются бесцветными на синем фоне препарата. Сочетание в препарате с метиленовой синью капель нейтрального жира и капель жирных кислот (расщепленный жир) – признак неполного отключения поджелудочной железы (острый панкреатит, муковисцидоз) или восстановления ее функции при остром панкреатите. Нейтральный жир, обнаруженный при микроскопическом исследовании, в кале больного с желтухой, является признаком рака поджелудочной железы.

Нарушение всасывания в тонкой кишке – синдром мальабсорбции.

Многие заболевания и их осложнения могут вызывать нарушение всасывания в тонкой кишке – мальабсорбцию (табл. 4.2). Нарушение всасывания в тонкой кишке любой этиологии характеризуется стеатореей, выраженной в большей или меньшей степени. Кал, как правило, бледно окрашен, неоформленный, кашицеобразный или жидкий. При микроскопии обнаруживается большое количество капель нейтрального жира или капель жирных кислот и аморфных глыбок и игл. Не всосавшиеся в тонкой кишке при поражении энтероцитов жирные кислоты в толстой кишке реагируют с ионами K^+ , Ca^+ , Mg^+ , Na^+ , $P_{неорг.}$, образуя соли жирных кислот – мыла. Обнаружение в кале при микроскопическом и микрохимическом исследовании жирных кислот и/или солей жирных кислот позволяет диагностировать синдром нарушения всасывания (мальабсорбцию) в тонкой кишке.

Дисахаридазная недостаточность развивается при врожденном или приобретенном недостатке одного или нескольких ферментов гидролиза дисахаридов. У детей различают 2 формы непереносимости лактозы: доброкачественная без лактозурии и злокачественная с лактозурией. При 1 форме исключение из пищи новорожденных лактозы приводит к исчезновению патологических проявлений. При 2 тяжелой форме возникают значительные вторичные проявления: дегидратация, ацидоз, лактозурия, замедляется рост ребенка, может наблюдаться поражение почек, ЦНС,

развивается гипотрофия. Непереваренная лактоза поступает в толстую кишку, где расщепляется бактериями до органических кислот (молочная, уксусная). Повышение концентрации лактозы и органических кислот увеличивает осмолярность в просвете кишки, нарастает секреция жидкости, объем химуса, усиливается моторика кишечника, развивается осмотическая диарея.

Таблица 4.2

Патологические состояния, сопровождающиеся мальабсорбцией

Нарушение пищеварения:	при недостаточном перемешивании химуса	<ul style="list-style-type: none"> • гастроэнтеростомия • гастроэктомия • желудочно-ободочный свищ
	при недостаточности факторов пищеварения	<ul style="list-style-type: none"> • острый и хронический панкреатит • хроническая дисфункция печени • непроходимость желчных путей • дисахаридазная недостаточность • муковисцедоз
	при аномальных средах	<ul style="list-style-type: none"> • усиленный бактериальный рост (деконъюгация желчных солей) • дивертикулы кишечника • амилоидоз кишечника
Нарушение всасывания:	при остром воспалении эпителия	<ul style="list-style-type: none"> • острые кишечные инфекции • острые отравления (щелочи, кислоты, спирты)
	при хроническом воспалении слизистой кишечника.	<ul style="list-style-type: none"> • целиакия (глютеновая энтеропатия) • ишемическая энтеропатия • болезнь Крона (грануломатоз кишечника) • экссудативная энтеропатия
	при укорочении кишечника	<ul style="list-style-type: none"> • резекция кишечника (заворот кишок, инфаркт кишки)
Нарушение транспорта		<ul style="list-style-type: none"> • заблокированные лимфатические сосуды при лимфоме • лимфангиоэктазия

Глютеновая энтеропатия (целиакия или целиакическая болезнь) развивается при врожденной недостаточности L-глутамилпептидазы, характеризуется нарушением расщепления глютена. В процессе расщепления глютена образуется глютамин, который вызывает аллергическую реакцию и тормозит регенерацию эпителия тонкой кишки. Целиакия проявляется у

детей с момента прикорма мучнистыми веществами, содержащими глютен (пшеничная и ржаная мука, рис, овес). Жидкие каловые массы стеаторейного характера выделяются до 5-10 раз в сутки, имеют цвет «мастики» с отвратительным затхлым запахом. При микроскопическом исследовании обнаружены жирные кислоты или соли жирных кислот. Присутствие на фоне слизи эозинофилов и/или кристаллов Шарко-Лейдена подтверждают аллергическую реакцию со стороны слизистой кишечника.

Муковисцидоз или кистозный фиброз (кишечная форма) – наследственное заболевание, характеризуется нарушением секреторной функции поджелудочной железы, желез желудка и кишечника. Дети грудного возраста с этим заболеванием страдают полифекалией: частый, кашицеобразный стул с резким зловонным запахом, жирный, реакция нейтральная или слабокислая (рН 6,5-7,0). На пеленках остаются жирные пятна, которые практически не отстирываются. У детей возраста 6-7 месяцев возможна склонность к запорам, но всегда кал бледно окрашенный, жирный, со зловонным запахом прогорклого масла. Жир смешан с калом и выделяется дополнительно в конце дефекации, покрывая кал с поверхности. В этот период возможно осложнение заболевания в виде кишечной непроходимости.

При микроскопическом исследовании обнаруживаются капли жира, которые остаются бесцветными в препарате с 0,5% водным раствором метиленовой сини. Это характерно для нейтрального жира и указывает на кистозное перерождение поджелудочной железы, которое приводит к отсутствию липазы. Кистозное перерождение пищеварительных желез желудка и тонкой кишки проявляется в период перехода с грудного на смешанное кормление. Микроскопически выявляется большое количество непереваренной белковой пищи, представленной соединительной тканью, микроскопическими кусочками непереваренного мяса и разрозненно лежащими мышечными волокнами с поперечной или продольной исчерченностью. Можно также обнаружить переваримую растительную

клетчатку, крахмал вне- и внутриклеточный. Все это свидетельствует о нарушении гидролиза, протеолиза и липолиза в сочетании с нарушенной эвакуацией пищи из желудка и по кишечнику.

Патологические процессы в толстой кишке. *Бродильные процессы* в толстой кишке возникают обычно при передозировке углеводов в рационе. Микроскопическое исследование позволяет обнаружить в нативном препарате большое количество перевариваемой клетчатки и внутри- и внеклеточного крахмала на разных стадиях переваривания. В окрашенных раствором Люголя препаратах наблюдается большое количество нормальной йодофильной флоры – клостридий (бациллы, округлой формы, окрашенные йодом в черный цвет). Реакция кала сдвигается в кислую сторону (рН 6,0-6,5). Каловые массы теряют форму, становятся кашицеобразными, пенистыми. Это – **бродильный дисбиоз**. Процесс брожения сопровождается образованием органических кислот и углекислого газа, которые в течение длительного времени раздражают слизистую толстой кишки, вызывая ее гиперемия, а затем – мацерацию и экссудацию, что приводит к развитию **бродильного колита**. В кале появляется слизь с лейкоцитами и эпителием толстой кишки. Нормальная йодофильная флора (клостридии) вытесняется патологической – мелкие и крупные кокки, мелкая и крупная палочковая флора. Бродильный дисбиоз переходит в **бродильный дисбактериоз, на фоне которого развивается бродильный колит**.

Гнилостные процессы развиваются при поступлении в толстую кишку из тонкой кишки большого количества непереваренного или недостаточно переваренного мяса или воспалительного экссудата. Кристаллы трипельфосфата указывают на резко щелочную реакцию (рН 8,0-9,0), обусловленную усиленными процессами гниения в толстой кишке. Это сопровождается образованием аммиака, меркаптана, индола, скатола. При этом цилиндрическая форма каловых масс подтверждает усиленную пролиферацию нормальной гнилостной флоры толстой кишки и развитие **гнилостного дисбиоза**.

Гнилостный дисбактериоз, гнилостный колит. Нарушение формы каловых масс (жидкий, водянистый кал), резко щелочная реакция, непереваренные или частично переваренные мышечные волокна, появление экссудата и слизи с клеточными элементами воспаления указывают на развитие *гнилостного колита и гнилостного дисбактериоза*. Водянистый характер кала является прямым признаком нарушения всасывания воды в толстой кишке в результате глубокого поражения эпителия.

Передозировка антибиотиков приводит к развитию колита с тяжелым дисбактериозом и кандидамикозом слизистой толстой кишки. При микроскопическом исследовании калового детрита можно обнаружить нити псевдомицелия и споры гриба *Candida albicans*. Часто обнаруживаются нити мицелия и споры других грибов и слизь с лейкоцитами и клетками цилиндрического эпителия.

4.3. Исследование мочи

4.3.1. Технология исследования мочи

Исследование физических и химических свойств мочи. Количество мочи. В течение суток у здоровых женщин выделяется 1-1,6 л, у мужчин 1-2 л. Изменение количества мочи у взрослых и детей при патологии представлено в табл. 4.3.

Цвет мочи. Цвет мочи у взрослых и детей старшего возраста колеблется от янтарно-желтого до соломенно-желтого. Концентрированная и кислая моча обычно окрашена интенсивнее, выделяется в меньшем количестве и обладает высокой относительной плотностью – *гиперхромурия*. Бледно окрашенная моча имеет низкую относительную плотность, слабокислую или нейтральную реакцию и выделяется в большом количестве (физиологическая полиурия) – *гипохромурия*. Причины, обуславливающие цвет мочи в норме и при патологии, представлены в табл. 4.4.

Таблица 4.3

Количество мочи у взрослых и детей при патологии

Количество мочи	Патология
Полиурия – увеличение суточного количества мочи до 3л и более	При повышенной жажде; рассасывании отеков, транссудатов, экссудатов; после приема мочегонных препаратов; снижении или отсутствии секреции антидиуретического гормона (АДГ) нейрогипофизом (несахарный диабет), при нечувствительности почечных канальцев к АДГ (наследственный сахара́ный диабет, после трансплантации почки, острый канальцевый некроз, гипокалемия, гиперкальце́мия); при системных заболеваниях (миелома, амилоидоз), синдроме Шегрена; при развитии осмотического диуреза при сахарном диабете, при заболеваниях почек в стадии хронической почечной недостаточности (ХПН).
Олигурия – уменьшение суточного количества мочи	При гидролабильности у детей, лихорадочных состояниях, заболеваниях сердца, острой почечной недостаточности (ОПН), нефросклерозе
Анурия – отсутствие мочи	При ОПН, тяжелых нефритах, закупорке мочевых путей опухолью или камнем (ретенционная анурия), менингитах – рефлекторно, при отравлениях, перитоните.
Олакизурия – редкое мочеиспускание	При нервно-рефлекторных нарушениях.
Задержка или затрудненное (странгурия) мочеиспускание	При аденоме и раке предстательной железы, камне и обструкции нижних отделов мочевыводящих путей (уролитиаз, склероз шейки мочевого пузыря, стриктура мочеиспускательного канала), задержка мочи после операции, парапроктите, остром цистите.
Поллакиурия – учащенное мочеиспускание	При воспалении мочевыводящих путей и мочевого пузыря, при пиелонефрите (типичный симптом), мочекаменной болезни, простатите.
Анишурия - недержание мочи, связанное с нарушением сфинктеров мочевого пузыря, проявляется произвольным мочеиспусканием без позывов	Частое следствие послеродовой травмы, органических поражений ЦНС, спинного мозга (нейрогенная дисфункция мочевого пузыря), пороков развития мочевыводящих путей, при воспалении мочевых путей, судорогах, тяжелых лихорадочных состояниях, функциональных (рефлекторных) нарушениях у детей невротического склада, проявляющееся как ночное недержание мочи.
Недержание мочи – неспособность удержать мочу в мочевом пузыре при императивном позыве	При остром цистите, аденоме, раке простаты, опухоли шейки мочевого пузыря.

Таблица 4.4

Причины, вызывающие окраску мочи

Цвет мочи	Причины, вызывающие патологическую окраску мочи	Комментарии
Гиперхромурия	<i>Дегидратация</i> : поносы, токсикозы, рвота, лихорадка	При взбалтывании – пена бесцветная. Реакция на уробилин и билирубин («сухая химия») отрицательная
	<i>Уробилинурия</i> : гепатиты, цирроз печени, гемолитические состояния, рассасывание кровоизлияний, малярия, тяжелая скарлатина	При взбалтывании мочи - пена бесцветная. Положительная реакция на уробилиноген
	<i>Билирубинурия</i> : обтурационная желтуха, гепатиты острые и хронические, цирроз печени	При взбалтывании мочи - пена желтая. Положительная реакция на билирубин
Гипохромурия	Полиурия на фоне сахарного и несахарного диабета	При сахарном диабете – высокая относительная плотность мочи и положительная реакция на глюкозу
	Нефросклероз	Изостренурия, плотность мочи постоянно около 1.010 г/мл
Красный, бурый, красновато-желтый	<i>Гемоглобинурия</i> : холодовая, маршевая, пароксизмальная, отравлении грибами, сульфаниламидами	Положительная реакция на кровь
	<i>Гематурия</i> : кровотечение из почек, мочевыводящих путей	
	Миоглобинурия при некрозе мышц, отравление барбитуратами, окисью углерода, при пищевых токсикоинфекциях	Качественная проба с кристаллическим сульфатом аммония (образование ярко-красной окраски)
Розово-красный	Порфиринурия: заболевание печени, интоксикации, инфекции, гемолитическая анемии, цитостатическая терапия.	Отрицательная реакция тест-зон диагностических полосок на кровь
Зеленовато-желтый	Окисление билирубина в биливердин	Инфекционная или обтурационная желтухи – положительная реакция на билирубин
Молочно-белый	Много нейтрофилов (<i>пиурия</i>) – цистит, обострение пиелонефрита, вскрытие абсцесса почки	Положительная реакция на лейкоциты. Нейтрофилы при микроскопии осадка мочи

<p><i>Липурия:</i> нефрозы липоидные, амилоидно-липидные. При тяжелых травмах разрыв крупного лимфатического протока</p>	<p>При микроскопии осадка клетки почечного эпителия в состоянии жировой дистрофии, гиалиновые цилиндры с каплями жира, жировые цилиндры, иногда кристаллы холестерина.</p>
--	--

Относительная плотность (удельный вес). Относительная плотность мочи зависит от количества растворенных частиц и их молекулярной массы, в норме определяется в основном количеством экскретируемых электролитов и мочевины. Относительная плотность мочи повышается, если почка экскретирует глюкозу, плазменный белок или экзогенные вещества, например контрастные вещества. Относительная плотность первичной мочи равна относительной плотности безбелковой плазмы крови и составляет 1,010 г/мл. В зависимости от потребностей организма почки могут концентрировать или разводить первичную мочу. Относительная плотность мочи взрослого человека в течение суток колеблется в пределах от 1,003 до 1,040 г/мл. Моча у детей раннего возраста менее концентрирована, ее относительная плотность колеблется от 1,002 до 1,030 г/мл.

При *паренхиматозных заболеваниях почек* (хронический гломерулонефрит, пиелонефрит, нефросклероз) способность почек к разведению и концентрации мочи снижается, а в терминальный период заболевания – полностью утрачивается. Почки перестают концентрировать и разводить первичную мочу и выделяют окончательную мочу с постоянной относительной плотностью, равной относительной плотности первичной мочи – 1,010 г/мл – *изостенурия*.

Высокая относительная плотность мочи может наблюдаться при дегидратации, адреналовой недостаточности, заболеваниях печени или при сердечной недостаточности, сопровождающейся отеками.

При частичной утрате почками функции концентрации и разведения относительная плотность мочи длительное время колеблется в диапазоне 1,007-015 г/мл – *гипостенурия*. Это признак тяжелого заболевания почек. При незначительном поражении почек относительная плотность мочи в

течение суток может колебаться от 1,004 до 1,023 г/мл. Относительная плотность 1,023 г/мл рассматривается как минимальная верхняя граница концентрационной способности здоровых почек. Если относительная плотность мочи у обследуемого больного доходит до 1,023 г/мл, концентрационная способность почек оценивается как нормальная, если не достигает 1,023 г/мл, – это признак снижения концентрационной способности почек. Чем ближе относительная плотность мочи к 1,010 г/мл, тем нарушение концентрационной функции почек более значительное. После стандартной водной нагрузки относительная плотность мочи при здоровых почках достигает значения 1,003 г/мл, поэтому считают, что относительная плотность 1,003-1,004 г/мл является признаком вполне достаточной способности почек к разведению.

При *сахарном диабете*, который может сопровождаться массивной глюкозурией, относительная плотность мочи увеличивается до 1,040-1,050 г/мл. При нелеченом диабете с нарушением обратной реабсорбции воды в канальцах почек выделяется моча с относительной плотностью 1,001-1,004 г/мл.

При *тубулоинтерстициальных нефропатиях и хронической почечной недостаточности* относительная плотность мочи колеблется в пределах 1,005-1,008 г/мл, что соответствует гипостенурии.

Измененная относительная плотность отдельной порции мочи сама по себе не может быть использована для дифференцировки нормы от патологии. Кроме степени концентрации мочи необходимо знать еще и состояние водного баланса и/или концентрацию натрия в плазме. Измерение относительной плотности мочи предоставляет важную информацию, которая необходима при интерпретации результатов других исследований. В моче с высокой относительной плотностью происходит ингибирование реакции с участием глюкозооксидазы, которая используется для обнаружения глюкозы. Моча с низкой относительной плотностью вызывает гемолиз эритроцитов,

набухание и лизис лейкоцитов и других клеточных элементов организованного осадка.

pH (реакция). Активность ионов водорода в моче зависит от характера пищи и от отдельных метаболических процессов. При употреблении «тяжелой» пищи (мясо), содержащей серу и фосфор, образуется кислая моча (pH 4,5-5,5), а при употреблении молочной и растительной пищи – нейтральная или слабо щелочная (pH 7,0-7,5). Почечные канальцы участвуют в поддержании кислотно-основного состояния (КОС) путем реабсорбции профильтрованного через почечный фильтр иона бикарбоната (HCO_3^-) и выведения H^+ с мочой. Реабсорбция HCO_3^- происходит главным образом в проксимальном отделе нефрона. В просвете канальца акцептором H^+ является аммиак и фосфаты. В организме примерно 1 ммоль/кг/день H^+ образуется в виде нелетучих кислот, таких как H_2SO_4 и H_2PO_4 . Они экскретируются почками. В норме течение суток примерно 30 - 40 ммоль ионов H^+ экскретируется этим путем.

pH мочи здорового взрослого человека и ребенка старшего возраста колеблется в пределах 5,5-7,0 (чаще 6,0-6,5), а при патологии – в пределах 5,0-9,0.

Ацидурия – состояние когда pH окончательной мочи постоянно составляет 4,6-5,0 единиц. При передозировке или преобладании в рационе мясной пищи возникает **алиментарная ацидурия**. Резко кислая моча образуется при всех состояниях, приводящих к метаболическому или дыхательному ацидозу, так как почки коррегируют или компенсируют сдвиги КОС (мочекислый диатез, подагра, лейкозы, цитостатическая и лучевая терапия). Сопутствующие друг другу ацидоз и кетонурия встречаются, как правило, при голодании и относительном дефиците углеводов. Сочетание ацидурии, кетонурии и глюкозурии свидетельствует о декомпенсированном сахарном диабете. Это состояние выделяют, как диабетический кетоацидоз. Гипергликемический синдром (включая подагру), сопровождающийся ацидурией, может привести к кристаллизации в

канальцах почек мочевой кислоты с последующим образованием конкрементов в мочевыводящих путях (лоханках и мочевом пузыре). Кристаллизация мочевой кислоты в канальцах почек при лейкозах может вызвать анурию. При таких состояниях необходимо не только увеличивать объем выделяемой мочи, но и способствовать ее ощелачиванию, вводя цитраты в количествах, поддерживающих рН мочи в диапазоне от 6,5 до 7,0. Резко кислая реакция мочи характерна для туберкулеза почек, острой и хронической почечной недостаточности.

Алкалурия – состояние, при котором рН мочи постоянно выше 7,0. Если исключается алиментарная алкалурия (молочно-овощная диета или введение щелочных растворов), следует предположить, что стойкая щелочная реакция мочи с рН 7,0-9,0 связана с инфекцией мочевыводящих путей (микробы способны гидролизировать мочевины). «Аммониевое расщепление» может наблюдаться при бактериальной контаминации мочи *in vitro*, при этом рН достигает 8,5-10,0 единиц. Как дыхательный, так и метаболический ацидоз в первое время приводят к алкалурии, но постепенно при истощении запасов калия или развитии гиперальдостеронизма моча становится кислой.

Интерпретация результатов рН мочи приобретает клиническое значение только в том случае, если можно провести корреляцию с другой информацией, полученной при обследовании пациента, или при поставленном диагнозе. Тогда по результатам, полученным при исследовании рН мочи, можно судить о течении заболевания. Самостоятельное определение рН мочи не имеет большого клинического значения. В табл. 4.5 представлено соотношение рН мочи и крови при некоторых патологических состояниях.

Таблица 4.5

рН мочи и крови при патологических состояниях

Реакция и рН мочи	рН крови	Патология (заболевания):
-------------------	----------	--------------------------

Кислая рН 5,0-6,0	Ацидоз рН<7,35	Диабет (предкома, кетоацидотическая кома), лихорадочные состояния, голодание, почечная недостаточность, туберкулез почек, лейкозы
Щелочная рН 8,0-9,0	Алкалоз рН>7,45	Циститы, пиелиты, гематурия, после рвоты и поноса, при рассасывании экссудатов и трансудатов, при приеме соды и минеральных вод
Щелочная рН 8,0-9,0	Ацидоз рН <7.35	Гиперхлоремический ацидоз, почечный тубулярный ацидоз, хронические инфекции мочевыводящих путей - бактериальное разложение азотсодержащих веществ мочи до аммиака
Кислая рН 5,0-6,0	Алкалоз рН >7,45	Гипокалемия, лечение алкалоза внутривенной инфузией больших количеств NaCl (парадоксальная ацидурия)

Белок. Повышение экскреции белка с мочой, **протеинурия**, сопровождается практически любую патологию почек. В результате фильтрации плазмы крови через гломерулярный фильтр в плазменный фильтрат попадают низкомолекулярные полипептиды, тогда как макромолекулярных белки остаются в системе циркуляции. Размеры пор гломерулярного фильтра, по-видимому, соответствуют размерам альбумина. Однако слой гликокаликса с анионными окончаниями формирует электростатический заряд на поверхности фенестрированного эндотелия, базальной мембраны и подоцитов. В результате альбумин, как полиэлектролит, отталкивается этим зарядом.

Профильтовавшиеся через гломерулярный фильтр низкомолекулярные белки подвергаются реабсорбции в извитом проксимальном отделе нефронов. Реабсорбция осуществляется на уровне микроворсинок почечного эпителия в результате эндоцитоза. Реабсорбированные молекулы белка расщепляется в клетках почечного эпителия лизосомальными ферментами, часть метаболитов реутилизируется, а конечные продукты вновь секретируются в мочу. Количество белков, которые фильтруются и оказываются в окончательной моче, в норме не превышает 100-150 мг в сутки.

Транзиторные протеинурии возникают после продолжительных физических нагрузок (маршевая), после перегревания или переохлаждения, эмоциональном стрессе. Увеличение проницаемости капилляров клубочков, приводящее к протеинурии, наблюдается во время лихорадки на фоне

высокой температуры, интоксикации, вызванной некоторыми лекарственными препаратами, а также при длительных запорах. При этом варианте транзиторной протеинурии в осадке мочи отмечается увеличенное количество лейкоцитов, эритроцитов, цилиндров, клетки переходного и почечного эпителия.

Протеинурии при патологических состояниях делятся на преренальные, ренальные и постренальные. Основные их характеристики представлены в таблице 4.6.

Таблица 4.6

Типы протеинурий и причины их вызывающие

Тип протеинурии	Причина	Масса белков (кДа)	Маркерный белок
Преренальная протеинурия	Увеличенный синтез низкомолекулярных белков, распад тканей	Hb, миоглобин, моноклональные Ig (белок Бенс-Джонса)	Увеличение количества общего белка. Содержание альбумина в пределах нормы
Селективная гломерулярная протеинурия	Увеличенная проницаемость клубочков для анионных белков средней мол. массы	50 – 70, в основном альбумин и трансферрин	Альбумин, трансферрин
Неселективная гломерулярная протеинурия	Увеличенная проницаемость клубочков для высокомолекулярных белков	50 – > 150	Альбумин, IgA, IgG
Тубулярная протеинурия	Снижение реабсорбции низкомолекулярных белков в проксимальном отделе нефрона	10 – 70	α_1 -микроглобулин, β_2 -микроглобулин, β -NAG, цистатин С
	Увеличенная секреция белка клетками почечного эпителия дистального отдела нефрона	80-100	Белок Тамма-Хорсфалла (БТХ)
Смешанная протеинурия	Увеличенная гломерулярная проходимость белков с вторичным нарушением или насыщением тубулярной реабсорбции	10 - > 150	Альбумин, α_1 -микроглобулин, общий белок
Постренальная протеинурия	Кровотечение или воспаление мочевыводящих путей	Плазменные белки, IgA	α_2 -макроглобулин, аполипопротеин А-1

Преренальная протеинурия связана с появлением в плазме патологических белков, которые интенсивно синтезируются или появляются при распаде тканей. Примерно у 20 % больных миеломной болезнью опухоль

продуцирует только легкие цепи иммуноглобулинов (каппа или лямбда), которые из-за низкой молекулярной массы легко фильтруются через почечный фильтр, диагностируются в моче в виде **белка Бенс-Джонса**. **Парапротеины** структурно однородны, молекула состоит из тяжелых или легких цепей одного типа. Класс и тип парапротеина не меняется в течение болезни. *Парапротеины встречаются наиболее часто при множественной миеломе, а также при макроглобулинемии Вальденстрема, болезни тяжелых цепей, лимфоме с парапротеинемией.* Для подтверждения диагноза в моче методом электрофореза определяют белок Бенс-Джонса или определяют специфические белки иммунохимическим методом.

Ренальная протеинурия. Протеинурия частый, но неспецифический симптом патологии почек. Почечная протеинурия, как правило, имеет персистирующий характер, белок присутствует в моче больного в любое время суток. Обнаружение протеинурии недостаточно для диагностики патологии почек, необходимо провести дифференциальную диагностику протеинурии.

Различают клубочковую, тубулярную и смешанную ренальную протеинурию.

Клубочковая (гломерулярная) протеинурия характерна для всех заболеваний почек, протекающих с поражением коркового вещества. Это острый и хронический гломерулонефрит, нефропатия при сахарном диабете, нефропатия беременных, нефрозы, опухоль почки, поражение почек при гипертонической болезни, подагра. Протеинурия при этих патологических процессах связана с нарушением принципа относительной селективности в почечных клубочках.

Селективная гломерулярная протеинурия – развивается при нарушении фильтрации вследствие изменения поверхностного заряда сиалогликопротеинов на гломерулярной мембране или изменения поверхностного заряда белков. Типичным примером такого эффекта является гликирование альбумина (фруктозамин) и поверхностных белков

гломерулярного фильтра при сахарном диабете. В результате на ранних стадиях диабетической нефропатии развивается микроальбуминурия, а затем, по мере прогрессирования заболевания, протеинурия. При селективной гломерулярной протеинурии электрофореграмма белков мочи не соответствует электрофореграмме белков сыворотки крови. Гломерулярный фильтр не пропускает высокомолекулярные глобулины. Это характерно для компенсированной стадии хронического гломерулонефрита. Такие больные поддаются лечению стероидными препаратами и иммуносупрессорами.

Неселективная (низкоселективная) гломерулярная протеинурия возникает когда почечный фильтр практически отсутствует и пропускает плазменные белки разной молекулярной массы. При неселективной протеинурии в моче обнаруживаются белки с молекулярной массой более 100 кДа (IgA, IgG), за исключением белков с очень большой массой (IgM, α -2 макроглобулин). Электрофореграмма мочевого белка идентична электрофореграмме плазменного белка. Эта форма протеинурии характерна для нефротического синдрома, при котором больные не чувствительны к лечению стероидными гормонами.

Тубулярная протеинурия проявляется нарушением реабсорбции белков в проксимальном отделе нефрона или усиленной продукцией белка (белок Тамма-Хорсфалла) клетками почечного эпителия дистального отдела нефрона. Характерным является выведение с мочой белков низкомолекулярной массы (менее 40 кДа), таких как бета-2-микроглобулин, ретинол-связывающий белок или лизоцим и уропротеин Тамма-Хорсфалла. Эта форма протеинурии встречается при тубулярной нефропатии, развивающейся при отравлениях солями тяжелых металлов (ртуть, свинец, кадмий), токсическими веществами (этиленгликоль, четыреххлористый углерод), нефротоксическими препаратами (антибиотики из группы аминогликозидов, фенацитин). Тубулярная протеинурия возникает при острой почечной недостаточности, сопровождающейся тубулярным некрозом, как осложнение при трансплантации почек, интерстициальном

нефрите, при тяжелых ожогах, при синдроме Фанкони, врожденном почечном ацидозе.

Смешанная (гломерулярно-тубулярная) протеинурия является признаком нескольких типов почечной недостаточности: нарушения фильтрации в клубочках и нарушения реабсорбции в канальцах. Это, обычно, манифестная стадия всех нефропатий, при которой в моче могут быть обнаружены практически все белки плазмы крови (низкоселективная протеинурия). За сутки с мочой может теряться до 1 г белка. Причиной смешанной протеинурии могут быть острая почечная недостаточность, пиелонефрит, тромбоз почечных вен.

Пострэнальная протеинурия встречается при кровотечениях из мочевыводящих путей, при инфекции мочевыводящих путей, полипозе, раке мочевого пузыря. Часто при пострэнальной протеинурии моча бывает мутной из-за примеси лейкоцитов и большого количества воспалительных белков.

Определение общего белка в моче не позволяет поставить точный диагноз. Для дифференциальной диагностики протеинурии необходимо производить определение количества индивидуальных – специфических белков в моче. Наиболее широко используется определение альбумина в моче, как маркера селективной протеинурии – раннего признака диабетического поражения почек. Для выявления микроальбуминурии предложено несколько методов, самый воспроизводимый иммунохимический метод.

Глюкоза. Примерно треть пациентов, у которых была обнаружена глюкозурия после алиментарной нагрузки глюкозой, страдает сахарным диабетом. Глюкозурия другой этиологии также имеет определенное диагностическое значение. Поэтому обнаружение глюкозы в моче считается одним из важных диагностических тестов. Глюкоза, как беспороговое вещество, фильтруется в клубочках почек, но затем практически полностью реабсорбируется в проксимальных канальцах. В реабсорбции принимают

участие транспортные белки и гексокиназа, осуществляющая фосфорилирование глюкозы для удержания ее в клетках эпителия канальцев. Величина канальцевой реабсорбции относительно постоянна, но с возрастом отмечается тенденция к ее снижению. Если содержание глюкозы в крови и соответственно количество фильтрующейся в клубочках превышает количество, которое может быть реабсорбировано в канальцах, глюкоза появляется в моче. При превышении в крови уровня 8,8-9,9 ммоль/л глюкоза выделяется с мочой. Показатель гликемии, при котором появляется глюкозурия, называется *почечным порогом*. Почечный порог снижается при хронических заболеваниях почек, при гипертонической болезни, при диабетической нефропатии. При этих заболеваниях глюкозурия может появляться при концентрации глюкозы в крови ниже 8,8 ммоль/л. У больных с почечной недостаточностью или страдающих снижением кровоснабжения почек, из-за низкой скорости кровотока в клубочках глюкозурии не будет даже при очень высокой концентрации глюкозы в крови. Поэтому по уровню глюкозы в моче нельзя ставить диагноз сахарный диабет. Глюкозурии делятся на две большие группы панкреатические и внепанкреатические.

Панкреатическая глюкозурия появляется при снижении образования поджелудочной железой инсулина. Наиболее частая причина панкреатической глюкозурии – *сахарный диабет*. Количество глюкозы в моче у больных сахарным диабетом может достигать 100-120 г/л. Общая потеря глюкозы с мочой зависит от степени полиурии, обычно существует параллелизм между количеством выделенной глюкозы и степенью полиурии. При *остром панкреатите* глюкозурия – явление временное и исчезает при стихании воспалительного процесса. При *остром некрозе поджелудочной железы* происходит гибель островков Лангерганса с последующим развитием панкреатической глюкозурии. К панкреатическим глюкозуриям относят глюкозурию, развивающуюся при длительном голодании. Эта глюкозурия исчезает через несколько дней после прекращения голодания.

Внепакреатические глюкозурии возникают по нескольким причинам. «Центральные» глюкозурии развиваются при раздражении центральной нервной системы, после чего происходит усиление распада гликогена в печени, что приводит к гипергликемии и глюкозурии. Глюкозурии центрального происхождения непродолжительны, возникают при травмах, опухолях мозга, менингитах, токсикозах, энцефалитах, кровоизлияниях. Причиной временной глюкозурии могут быть наркоз, отравление (токсическая глюкозурия), лихорадка.

Гормональные глюкозурии возникают при гипертиреозе, феохромоцитоме, синдроме Иценко-Кушинга, акромегалии, опухоли коры надпочечника. Приводит к глюкозурии увеличение секреции контринсулярных гормонов – адреналина, тироксина, гликокортикоидов. По аналогичному механизму глюкозурия возникает при передозировке кортикостероидов и адренокортикотропного гормона или при их длительном употреблении.

Почечные глюкозурии развиваются вследствие нарушения реабсорбции глюкозы почечным эпителием в проксимальном отделе нефрона. Почечная глюкозурия в отличие от диабетической возникает при нормогликемии, нормальном значении гликированного гемоглобина (HbF_{1C}) в сыворотке крови.

Кетоновые тела. Диагностическое значение имеют 3 кетоновых тела: 2 кислоты – ацетоуксусная кислота (ацетоацетат) и β-гидрооксимасляная кислота (β-гидроксибутират) и ацетон. У здоровых людей в процессе липолиза в жировой ткани образуются жирные кислоты и глицерин, жирные кислоты в свою очередь превращаются в печени в ацетоацетат. Основная часть ацетоацетата при участии ферментов превращается в β-гидроксибутират, небольшая часть спонтанно декарбоксилируется в ацетон. Кетоны активно потребляются в качестве энергетических субстратов ЦНС, сердцем и другими органами. У здорового человека с мочой выделяется 20-

50 мг кетонов в сутки. Выделение с мочой большого количества кетонов носит название *кетонурия*.

Кетонурия наблюдается у детей раннего возраста при голодании на фоне истощения (токсикозы, гастроэнтероколиты, дизентерия и т.д.), а также при лихорадке, отравлениях, тяжело протекающих инфекционных заболеваниях. При всех этих заболеваниях кетонурия является вторичным непостоянным признаком (*вторичная кетонурия*) и не имеет диагностического и прогностического значения.

Кетоацидоз при сахарном диабете. При недостатке инсулина снижение утилизации глюкозы как источника энергии в инсулинзависимых тканях приводит к усиленному липолизу и гидролизу триглицеридов в жировой ткани и протеолизу в мышечной ткани. Усиление липидного и белкового метаболизма приводит к накоплению ацетил-КоА, который в ходе последовательных реакций превращается в ацетоуксусную кислоту. Клетки ЦНС и некоторые другие ткани потребляют глюкозу инсулиннезависимым механизмом. В нормальных условиях они помимо глюкозы в качестве субстратов используют кетоновые тела. При гипергликемии увеличивается поступление глюкозы в инсулиннезависимые ткани, и они практически перестают утилизировать кетоновые тела, поэтому кетоны полностью не утилизируются тканями, они накапливаются в крови и фильтруются через почечный фильтр в мочу. Обнаружение кетонов в моче позволяет диагностировать метаболическую декомпенсацию у больных диабетом. Кома и прекоматозные состояния почти всегда сопровождаются кетозом и кетонурией. Кетоацидотическая кома – наиболее серьезное осложнение диабета.

Алкогольный кетоацидоз. При запое и отказе от пищи в течение 2-3 дней возможно развитие состояния с дефицитом инсулина и стимуляцией липолиза. При алкогольном кетоацидозе кетоновые тела в моче обнаруживаются в 90 % случаев.

Билирубин. Конъюгированный билирубин водорастворим, он поступает с желчью в желчный пузырь, где под воздействием дегидрогеназ частично восстанавливается в мезобилирубин и в *i*-уробилиноген. *i*-уробилиноген вместе с остальным билирубином поступает через общий желчный проток в двенадцатиперстную кишку. Повышенная концентрация конъюгированного билирубина в сыворотке крови больных инфекционным гепатитом сопровождается увеличенной экскрецией билирубина с мочой. Почечный фильтр свободно пропускает прямой билирубин. При обтурационных желтухах билирубинурия явление постоянное. Снижение содержания билирубина в моче или его полное исчезновение указывает на частичное или полное восстановление проходимости желчных путей.

При гепатоцеллюлярной (паренхиматозной) желтухе, когда в результате интоксикации повреждаются гепатоциты, в крови одновременно повышается уровень конъюгированного и неконъюгированного билирубина. При этой патологии интенсивность билирубинурии усиливается параллельно с тяжестью заболевания, достигая максимальных значений в разгар болезни, после чего начинает уменьшаться. Высокая концентрация билирубина в моче (моча цвета «темного пива») на фоне выраженной желтухи и бесцветных каловых масс является признаком разгара заболевания.

Непрямой (неконъюгированный) билирубин может попасть в мочу только, если увеличение его концентрации в сыворотке крови сочетается с нарушением проницаемости гломерулярного фильтра.

Уробилиноген. Уробилиногеновые тела являются нормальными продуктами катаболизма, которые в физиологических условиях образуются с определенной скоростью, постоянно экскретируются с калом и в небольших количествах с мочой. При различных заболеваниях их образование может увеличиваться, что приводит к повышению экскреции; либо их образование резко снижается или прекращается, тогда уробилиноген обнаруживается в моче в следовых количествах или вообще не обнаруживается.

Уробилиногенурия характерна для гемолитических состояний, поражений паренхимы печени и кишечной патологии.

Гемолитические состояния – с мочой выделяется главным образом стеркобилиноген: гемолитическая анемия, пернициозная анемия, пароксизмальная ночная гемоглобинурия, эритремия, внутрисосудистый гемолиз (гемотрансфузионная реакция, инфекция, укус ядовитых змей), рассасывание массивных гематом.

Поражение паренхимы печени – экскретируется с мочой главным образом *u*-уробилиноген: вирусный гепатит, хронический гепатит, токсическое поражение печени, рак печени и метастазы.

Заболевания кишечника – происходит усиленная реабсорбция стеркобилиногена в дистальном отделе слизистой толстой кишки, приводящая к повышению его концентрации в моче. Этот тип стеркобилиногенурии чаще наблюдается у детей: энтероколиты, продолжительные запоры, кишечная непроходимость, усиленные гнилостные процессы в толстой кишке.

Снижение или полностью исчезновение уробилиногена в моче может после продолжительной окклюзии желчного протока опухолью, камнем или в результате полного прекращения образования желчи (тяжелый вирусный гепатит, тяжелое токсическое поражение печени). При обтурационной желтухе кал бесцветный, стеркобилин в кале и его следы в моче появляются только в период восстановления поступления желчи по желчным путям в двенадцатиперстную кишку. Уробилиноген (стеркобилиноген) не определяется в моче новорожденного, находящегося на грудном вскармливании, так как в кишечнике не происходит восстановления билирубина в стеркобилиноген из-за отсутствия кишечной флоры. Это можно считать нормой примерно до 3-х месячного возраста новорожденных. Но, если нормальная бактериальная флора кишечника подавлена при лечении антибиотиками и билирубин желчи не восстанавливается до

стеркобилиногена, в моче такого больного он также не определяется. Это тяжелый дисбактериоз.

Кровь (эритроциты). Кровь в моче может быть представлена эритроцитами (синдром гематурии) или продуктами их распада (гемоглобинурия, гемосидеринурия, гематоидин). В моче здоровых людей обнаруживаются единичные эритроциты. При применении камерных методов установлено, что у практически здоровых людей в сутки выделяется до 1 миллиона эритроцитов. При исследовании осадка мочи обнаруживают до 1000 эритроцитов, что соответствует 10 эритроцитам в камере Горяева (или 1 эритроциту в 1 мкл не центрифугированной мочи). Это норма для детей и взрослых. При использовании в работе нецентрифугированной мочи в 1 мкл обнаружить эритроциты не удастся, реакция нормальной мочи на кровь отрицательная.

Гематурии делятся на почечные и внепочечные. Почечные гематурии разделяют на функциональные и органические.

Функциональные гематурии. В раннем детском возрасте эритроциты в осадке мочи встречаются чаще и в большом количестве, что объясняется несостоятельностью почечного фильтра, его увеличенной проницаемостью. Почки грудного ребенка реагируют на малейшее раздражение: удар, неосторожную пальпацию поясничной или брюшной области. При переохлаждении и перегревании микрогематурия обнаруживается и у взрослых. Микрогематурия отмечается после спортивных нагрузок и при длительных пеших переходах (маршевая гематурия) и сочетается с альбуминурией.

Органические гематурии. При остром диффузном гломерулонефрите гематурия – основной симптом. Моча цвета «мясных помоев» (макрогематурия) появляется в первые дни заболевания. Эритроциты через пораженную воспалительным процессом стенку гломерулярных капилляров проникают в первичную мочу. При очаговом гломерулонефрите цвет мочи не изменен, а единичные в поле зрения эритроциты обнаруживаются только при

микроскопическом исследовании осадка мочи. При прогрессировании заболевания у больных развивается протеинурия и гипертония диастолического типа. В период выздоровления эритроциты обычно исчезают из осадка мочи быстрее, чем нормализуется протеинурия. Если в период выздоровления в осадке мочи обнаруживаются эритроциты – это прямой признак не стихающего гломерулита, симптом обозначается как «остаточная гематурия». Хронические гломерулонефриты и нефрозы сопровождаются умеренной гематурией (микрогематурией). Острая почечная недостаточность, коллагенозы, тромбоз почечных вен сопровождаются тяжелой гематурией (макрогематурией). *Застойная гематурия* развивается при заболеваниях сердца, инфаркте почек (веностаз), она обусловлена циркуляторными нарушениями, приводящими к вторичной почечной недостаточности. Застойные микрогематурии быстро стихают при улучшении состояния сердца. *Гематурия при туберкулезе почек* относится к микрогематурии, которая очень упорна и продолжается долгие годы, сочетаясь с кислой реакцией мочи (рН 5,0-6,0). *Гематурия при токсикоинфекциях* (сепсис, грипп, скарлатина, инфекционный мононуклеоз, свинка, краснуха, бронхопневмония, ангина, дизентерия и др.) свидетельствует о вовлечении в процесс почек и является ранним признаком осложнения, особенно у детей.

При пиелонефрите у трети больных наблюдается гематурия. Диагностически значимым является обнаружение у больного лейкоцитурии и бактериурии.

Опухоли почки могут проявляться болезненной гематурией задолго до того, как будет поставлен окончательный диагноз злокачественного новообразования. Поэтому, при обнаружении гематурии неясной этиологии необходимо в первую очередь исключить опухолевый процесс.

Пострэнальные гематурии возникают *при воспалении, полипозе, новообразовании или травме мочевыводящих путей*, обычно сопровождаются пиурией, лейкоцитурией и бактериурией. *Камни в почках и*

мочевом пузыре по разным оценкам обнаруживаются у 1-3 % взрослого населения. При длительно протекающей мочекаменной болезни гематурия наблюдается примерно у 20% больных и часто сочетается с лейкоцитурией, как признак присоединившейся инфекции. Микрогематурия - первый симптом мочекаменной болезни, диагностируется на фоне болей в области поясницы, является основным признаком мочекаменной болезни.

Гемоглобинурии. Гемоглобинурии возникают в результате интравитального и интравазального гемолиза и гемоглобинемии. При внутрисосудистом гемолизе гемоглобин появляется в моче, когда концентрация свободного гемоглобина в плазме крови превысит 60 мкмоль/л (10г/л), что составляет «почечный порог» гемоглобина. Гемоглобин появляется в моче после того, как насыщаются гаптоглобин-связывающая способность плазмы крови и тубулярная реабсорбция в почках. Гемоглобинурии делят на первичные (идиопатические) и вторичные (симптоматические).

К *первичным гемоглобинуриям* относятся: холодовая, приступы которой вызываются переохлаждением, маршевая или спортивная, при ночной пароксизмальной гемоглобинурии.

К *вторичным гемоглобинуриям* относятся: при переливании несовместимой крови, при отравлении сульфаниламидами, анилиновыми красками, грибами, хлороформом, стрихнином, при инфекционных заболеваниях (сепсисе, тифе, скарлатине, малярии, ангине), при врожденных и приобретенных гемолитических анемиях.

Эритроциты, попавшие в мочу при гематурии, подвергаются гемолизу и *in vivo* и *in vitro*. Присутствие свободного гемоглобина в моче при гематурии – явление обычное, так как моча не является физиологической средой для эритроцитов, в ней эритроциты достаточно быстро разрушаются.

Лейкоциты. Лейкоциты всегда присутствуют в моче здоровых людей. При ориентировочном микроскопическом исследовании осадка мочи их количество определяется как 0-3 в поле зрения. Норма количества

лейкоцитов по методу Каковского-Аддиса – 2 000 000 в сутки, по Нечипоренко – 2000 в 1 мл мочи. Лейкоцитурия у женщин наблюдается значительно чаще, чем у мужчин. Это связано с большей распространенностью заболеваний мочевыводящих путей у женщин и высокой вероятностью контаминации мочи лейкоцитами влагалищных выделений.

Лейкоцитурия – моча прозрачная, а количество лейкоцитов в осадке после центрифугирования превышает норму. Если моча мутнеет от количества лейкоцитов, а в осадке после центрифугирования лейкоциты густо покрывают все поля зрения – это *пиурия*. Лейкоцитурия и пиурия являются важнейшими патологическими признаками воспаления почек и мочевыводящих путей.

Особенно велико значение пиурии (лейкоцитурии) в раннем детском возрасте. 70-80% пиурий у детей возникают в первые 2 года жизни, из них большая часть относится к первым 3 месяцам жизни ребенка. После 6-ти месяцев в основном болеют девочки. В детском возрасте выделяют 3 группы пиурий:

Первичные (септические, острые) *пиурии*. Это пиелоститы, инфекция попадает в мочевыводящие пути восходящем путем, у ребенка появляется лихорадка и нарастают симптомы, характерные для интоксикации.

Сопутствующие пиурии. Это вторичные пиелоститы, возникшие как осложнения после первичного заболевания (грипп, ангина, пневмония, отит, хроническая дистрофия).

Хронические рецидивирующие пиурии развиваются обычно вследствие врожденных анатомических дефектов (аномалия уретры, пионефроз, гидронефроз и т.д.).

Обычно лейкоцитурии и пиурии «образованы» нейтрофилами. В осадке мочи нейтрофилов много, часто они густо покрывают все поле зрения микроскопа, склеиваются в комочки. В нецентрифугированной моче при пиурии в 1 мкл содержится более 10 000 клеток. Цистопиелиты, особенно у

грудных детей, могут протекать без пиурии. Обычно это связано с задержкой лейкоцитов в уретре при ее спазме. Чтобы исключить пиурию у маленьких и грудных детей однократного исследования мочи недостаточно. Диагностировать скрытую лейкоцитурию (пиурию) помогают подсчет количества лейкоцитов в камере. Иногда, в раннем детстве, пиурии протекают без температуры, поэтому исследование мочи необходимо делать у каждого больного ребенка.

Лейкоцитурия может быть инфекционной (бактериальной) и асептической. Пиурия, сочетающаяся с бактериурией, является признаком инфекционно-воспалительного процесса в мочевой системе. При гломерулонефрите с нефротическим синдромом в период обострения можно обнаружить до 30-40 лейкоцитов в каждом поле зрения микроскопа, при этом бактериурии нет, что подтверждается микробиологическими исследованиями мочи.

Инфекционная лейкоцитурия (пиурия) при пиелонефрите и других локализациях воспалительного процесса в мочевыводящих путях представлена нейтрофилами. Для абактериальной лейкоцитурии при волчаночном нефрите, хроническом гломерулонефрите в лейкоцитарной формуле мочи определяется до 20% и более лимфоцитов. Эозинофилы появляются в осадке мочи при атопических формах нефрита и лекарственном интерстициальном нефрите, при аллергической реакции на лекарственные препараты. О происхождении лейкоцитов из почек свидетельствует обнаружение в осадке мочи на фоне лейкоцитов клеток почечного эпителия, лейкоцитарных, зернистых, эпителиальных цилиндров.

Увеличение содержания лимфоцитов в лейкоцитарной формуле мочи (более 20%) на фоне лейкоцитурии отмечается при подостром, хроническом и, особенно, волчаночном гломерулонефрите в период обострения, а также при отторжении почечного аллотрансплантата. При остром пиелонефрите, цистите и цистопиелите в мочевой лейкоцитарной формуле нейтрофилы составляют основную массу клеток (100%). При переходе этих заболеваний в

хроническую форму в лейкоцитарной формуле мочи на фоне нейтрофилов появляются моноциты, макрофаги и плазматические клетки – клеточные элементы, типичные для хронического вялотекущего воспалительного процесса, а при присоединении аллергического компонента – эозинофилы.

Нитриты (бактериурия). У здоровых людей мочевая система стерильна, то минимальное количество непатогенных бактерий, которое смывается мочой из дистального отдела мочеиспускательного канала, обычно не превышает 1×10^4 в 1 мл. Такое количество бактерий не может или не успевает превратить нитраты, присутствующие в любой моче, в нитриты, поэтому реакция мочи на нитриты в норме отрицательная.

Бактериурия – появление бактерий в моче в количестве, превышающем 1×10^5 в 1 мл, свидетельствует об инфицировании почек и/или мочевыводящих путей. Бактерии попадают в мочевыводящие пути гематогенным путем или в результате восходящей инфекции при сниженном иммунитете. При гематогенном пути распространения бактерии в моче появляются при гломерулонефрите в результате повреждения гломерулярного фильтра. Более частой причиной бактериурии является восходящая инфекция мочевыводящих путей, которая может в результате пузырного заноса достигать лоханок, проникнуть в паренхиму почки и вызывать пиелонефрит. При обеих формах основными возбудителями инфекции являются грамотрицательные бактерии. В мочевом пузыре бактерии быстро размножаются, т.к. моча является хорошей питательной средой. При бактериурии нитраты восстанавливаются в нитриты в результате жизнедеятельности таких грамотрицательных микроорганизмов, как *Escherichia coli*, *Proteus*, *Klebsiella*, *Citrobacter*, *Salmonella* и, вероятно, энтерококков, стафилококков и *Pseudomonas*. Обнаружение нитритов при исследовании мочи позволяет диагностировать бактериурию.

Развитию восходящей инфекции мочевыводящих путей способствует глюкозурия. В группу риска развития пиелонефрита входят больные уретритом, циститом, пиелоциститом, мочекаменной болезнью,

гипертензией, а также пациенты, подвергавшиеся инструментальному обследованию мочевыводящих путей или хирургическому вмешательству.

Микроскопическое исследование осадка мочи. Автоматизированный анализ для мочевого осадка. Морфологическое исследование форменных и кристаллических элементов осадка входит в комплекс общего анализа мочи, которое обязательно проводится при положительном результате любого из показателей тест-полосок и у больных с заболеваниями почек, мочевыводящих путей и другими соматическими заболеваниями. Скрытая патология почек и мочевыводящих путей может быть выявлена только при микроскопическом исследовании. Для дифференциации нормальных и патологических клеточных элементов, таких как мезотелий и клетки злокачественных новообразований рекомендуется применять суправитальную окраску. При любой суправитальной окраске живые объекты в осадке мочи не окрашиваются, что позволяет легко обнаружить бесцветные споры гриба и нити мицелия на цветовом фоне препарата. В то же время кристаллы оксалата кальция овоидной формы хорошо окрашиваются. Исследование осадка мочи проводится ориентировочным и количественным методами вручную и с помощью анализаторов.

Ориентировочный метод исследования мочевого осадка позволяет идентифицировать наличие признаков заболевания в моче. Исследование нативного препарата осадка мочи проводят на предметном стекле. Если клеточных элементов много и подсчитать их в поле зрения не удастся, отмечают в бланке, что лейкоциты (эритроциты) густо покрывают все п/зр. При скудном содержании таких форменных элементов как цилиндры, исследование проводят на малом увеличении микроскопа и указывают их количество в препарате (2 цилиндра в препарате). Если цилиндров много, их количество отмечают в поле зрения, т.е. на большом увеличении микроскопа. Для таких элементов, как эпителиальные клетки (многослойный плоский, переходный, почечный эпителий), кристаллы, принято давать оценку

«большое», «умеренное», «небольшое» или «незначительное» количество, используя малое увеличение микроскопа.

Количественные методы исследования осадка мочи – это метод Каковского-Аддиса и метод Нечипоренко. Принцип методов – подсчет количества форменных элементов мочи (эритроцитов, лейкоцитов и цилиндров) в счетных камерах. Количественные методы используются для диагностики скрытого воспалительного процесса и для контроля эффективности проведенного курса лечения больных с заболеваниями почек и/или мочевыводящих путей.

Анализаторы для автоматической микроскопии мочи. Анализаторы мочевых элементов функционируют на основе планарной проточной цитометрии или проточной цитофлуорометрии. В обоих случаях исследование проводится на нецентризузированной моче, которую пропускают через проточную кювету. Все элементы фотографируются и с помощью патентованного алгоритма на основе архива изображений анализатор распознает эритроциты, лейкоциты, лейкоцитарные сгустки, бактерии, гиалиновые цилиндры, другие патологические цилиндры, клетки плоского эпителия, другие эпителиальные клетки, кристаллы, сперматозоиды, слизь, артефакты. Все объекты сохраняются в памяти в виде сортированного архива микрофотографий и доступны для просмотра оператором или врачом. Поскольку объем проточной ячейки известен, то анализатор вычисляет все параметры в виде концентраций объектов в одном микролитре. Затем он может пересчитать результат в те единицы измерения, которые приняты для выдачи на бланке в лечебном учреждении. Одновременно анализаторы автоматически оценивают параметры химического состава мочи, определяемые с помощью мочевых тест-полосок «сухая химия».

Особенности осадка мочи при поражении клубочков, канальцев и интерстициальной ткани почек. Отражательная фотометрия с использованием тест-полосок «сухая химия». При проведении

профилактических осмотров, массовых исследований в ЛПУ, непрофильных по заболеваниям почек и мочевыводящих путей, анализ мочи проводят с помощью полифункциональных тест-полосок. Распространен алгоритм, при котором дальнейшее исследование мочи, в том числе микроскопию осадка мочи, проводят тогда, когда получен хотя бы один положительный тест из шести основных (лейкоциты, эритроциты, нитриты, белок, билирубин, уробилин). Это достаточно простой алгоритм, который позволяет выявить до 90% патологий.

4.3.2. Диагностическое значение элементов мочевого осадка

Эритроциты и продукты их распада. Эритроциты в осадке мочи бывают *неизменные, измененные* или обнаруживаются продукты их распада, в частности, *гемосидерин* и *гематоидин*.

Неизменные эритроциты – безъядерные клетки зеленовато- желтого цвета в виде дисков с центральным углублением. Неизменные эритроциты обнаруживаются в моче слабокислой реакции (рН 6,5) нейтральной (рН-7,0) или слабощелочной (рН-7,5). Неизменные эритроциты, как правило, характерны для внепочечной гематурии. чаще всего является результатом мочекаменной болезни.

Измененные эритроциты не содержат гемоглобин, они бесцветны, представлены в виде одно- или двухконтурных колец, обнаруживаются при пребывании в резко кислой моче при рН 4,5-5,0. Эти эритроциты, прошедшие пораженный воспалительным процессом почечный фильтр (дисморфные эритроциты), обычно свидетельствуют о ренальной гематурии. К измененным эритроцитам относятся сморщенные эритроциты с неровными зазубренными краями, они встречаются в концентрированной моче с высокой относительной плотностью (1,030-1,040 г/мл), но содержат гемоглобин. Эритроциты, резко увеличенные в размерах, наблюдаются в моче с рН 9-10 и низкой относительной плотностью (1,002-1,005 г/мл), они также содержат гемоглобин.

Гемосидерин образуется из гемоглобина эритроцитов в клетках, обладающих макрофагальной функцией. При микроскопическом исследовании осадка мочи в клетках почечного эпителия обнаруживаются аморфные желто-коричневые кристаллы. Гемосидерин в моче встречается при болезни Маркиафава-Микели (ночная пароксизмальная гемоглобинурия), хронических гемолитических анемиях, гемохроматозе, анемии Кули, фетальных эритроблостозах. При этих заболеваниях гемосидеринурия сочетается с гемоглобинурией

Гематоидин образуется при распаде гемоглобина без доступа кислорода в гематомах, расположенных глубоко в тканях. Кристаллы гематоидина – это золотисто-желтые или желто-оранжевые слегка вытянутые в длину ромбы и/или довольно длинные иглы. Гематоидин обнаруживается в осадке мочи при вскрытии старых почечных гематом, при застое крови у больных калькулезным пиелитом, при абсцессе почки, раке мочевого пузыря и почек.

Лейкоциты. В норме в 1 мкл осадка мочи содержится не более 20 лейкоцитов (нейтрофилов), что составляет 2000 лейкоцитов в 1 мл мочи. При ориентировочном изучении осадка утренней порции мочи это количество соответствует у мужчин 0-2 , у женщин 0-3 лейкоцита в полях зрения микроскопа при увеличении 400х. Выглядят лейкоциты как бесцветные клетки круглой формы в 1,5-2,0 раза больше неизмененного эритроцита. Дифференциальная диагностика клеток проводится в препарате, окрашенном азур-эозином.

Нейтрофилы обычно содержатся в моче. При рН 5-7 и относительной плотности 1,015-1.030 г/мл это сероватые мелкозернистые, круглые клетки в 1,5 раза больше эритроцита по диаметру. При низкой относительной плотности (1.002-1,008 г/мл) и щелочной реакции мочи нейтрофилы увеличиваются в размерах, разбухают, в цитоплазме просматриваются сегментированные ядра. При длительном нахождении в моче, содержащей бактерии, нейтрофилы разрушаются.

Эозинофилы такого же размера как нейтрофилы, но отличаются содержанием в цитоплазме характерной зернистости одинакового размера, сферической формы, желтовато зеленоватого цвета, резко преломляющей свет. Размер клетки и плотность расположения эозинофильной зернистости в цитоплазме зависят от рН и относительной плотности мочи.

Лимфоциты обнаруживаются в моче только в препаратах, окрашенных азур-эозином.

Макрофаги могут быть обнаружены в осадке мочи больных, страдающих длительным воспалительным процессом мочевыводящих путей. Это окрашенные мочевыми пигментами клетки с грубыми включениями, резко преломляющими свет.

Цилиндры. Цилиндры – образования белкового или клеточного происхождения цилиндрической формы, разной величины, обнаруживаются при патологии мочеобразовательной системы при исследовании осадка мочи. В кислой моче они сохраняются довольно долго, в щелочной – быстро разрушаются. Различают гиалиновые, зернистые, восковидные, пигментные, эпителиальные, эритроцитарные, лейкоцитарные и жировые цилиндры. Образованию патологических цилиндров способствует уменьшение почечного кровотока, увеличение содержания в первичной моче плазменных белков, электролитов, интоксикация, присутствие желчных кислот, повреждение клеток почечного эпителия, спазм или дилатация канальцев.

Белковые цилиндры образуются в просвете извитой, наиболее узкой части дистального канальца в кислой среде (рН 4,5-5,3) при наличии в моче белка Тамма-Хорсфалла, альбумина, иммуноглобулинов. При увеличении концентрации белка Тамма-Хорсфалла, в сочетании с увеличением концентрации электролитов и ионов водорода, в первичной моче происходит агрегация белка и образование геля, который служит основой для формирования гиалиновых цилиндров. Клеточные элементы захватываются и погружаются в гель. Этот процесс происходит обычно в самой узкой части нефрона – в просвете извитой части дистального канальца. Содержание белка

Тамма-Хорсфалла в нормальных гиалиновых цилиндрах в 50 раз больше, чем альбумина.

Гиалиновые цилиндры – полупрозрачные, нежные, гомогенной структуры с закругленными концами, разной формы (короткие или длинные, широкие или узкие, извитые) плохо видны при ярком освещении препарата. В моче здорового человека и ребенка гиалиновые цилиндры можно обнаружить только при исследовании в камере. Гиалиновые цилиндры постоянно встречаются в моче при всех органических заболеваниях почек, количество их не коррелирует с тяжестью процесса. На их поверхности могут откладываться кристаллы, лейкоциты, эритроциты, почечный эпителий, зернистые белковые массы, бактерии. При геморрагическом гломерулонефрите цилиндры окрашиваются в буроватый цвет, при инфекционном гепатите они окрашиваются билирубином в желтый или биливердином в зеленый цвет.

Зернистые цилиндры – непрозрачные, мелко или грубозернистой структуры, желтоватого, желтого цвета или почти бесцветные. Грубозернистые цилиндры образуются при распаде клеток почечного эпителия, а мелкозернистые – при распаде нейтрофилов или коагуляции белка при изменении физико-химических условий в канальцах. Они обнаруживаются при гломерулонефрите, пиелонефрите, туберкулезе, раке почек, диабетической нефропатии, скарлатине, системной красной волчанке, остеомиелите.

Восковидные цилиндры имеют резко очерченные контуры, бухтообразные вдавления, обломанные концы, трещины по ходу цилиндра, почти всегда окрашены более или менее интенсивно в желтый цвет. Их структура может быть гомогенной, плотной крупнозернистой. Они образуются преимущественно из гиалиновых и зернистых при длительном их пребывании в канальцах. Такие цилиндры получили название – *застойные цилиндры*. Широкие застойные цилиндры, образовавшиеся в собирательных трубочках нефронов, получили название – *терминальные цилиндры*.

Появление застойных цилиндров в моче свидетельствует о тяжелом поражении почек.

Пигментные цилиндры имеют зернистую или гомогенную структуру и окрашены в желто-коричневый или бурый цвет, образуются при коагуляции гемоглобина или миоглобина, располагаются на фоне зернистых масс пигмента.

Эпителиальные цилиндры состоят из клеток почечного эпителия, всегда более или менее интенсивно окрашены мочевыми пигментами и располагаются на фоне этих же клеток. Обнаруживаются в моче при острой почечной недостаточности, тубулярном некрозе, остром и хроническом гломерулонефрите.

Жировые цилиндры образуются из капель жира (липоидов) в почечных канальцах при жировой дистрофии клеток почечного эпителия. Располагаются на фоне жироперерожденного почечного эпителия, иногда в этих препаратах можно обнаружить кристаллы холестерина и иглы жирных кислот. Встречаются при хроническом гломерулонефрите, пиелонефрите, осложненных нефротическим синдромом, при липоидном нефрозе и диабетической нефропатии.,

Эпителий. В осадке мочи встречается 4 основных вида эпителия: многослойный плоский ороговевающий эпителий, многослойный плоский неороговевающий эпителий, переходный эпителий, а в мужской моче еще и цилиндрический эпителий.

Многослойный плоский ороговевающий эпителий. Это поверхностно расположенные клетки наружных половых органов, в осадке мочи обычно бесцветные, полигональные или округлые, в 3-6 раз больше лейкоцитов по диаметру, с центрально расположенными маленькими ядрами, плотной, гомогенной цитоплазмой. Клетки многослойного плоского эпителия смываются мочой с мочевыводящих путей. Обнаружение в моче клеток многослойного плоского эпителия диагностического значения не имеет.

Многослойный плоский неороговевающий эпителий выстилает дистальный отдел мужской и женской уретры и влагалище. Этот эпителий характерен для влажных поверхностей, где не нужна функция всасывания. В нативном препарате они располагаются разрозненно или небольшими пластами.

Переходный эпителий выстилает лоханки почек, мочеточники, мочевой пузырь, крупные протоки предстательной железы и верхний отдел мочеиспускательного канала. Это многослойный эпителий. Он объединяет в себе морфологические признаки многослойного плоского и цилиндрического эпителия. Отторгнутые клетки переходного эпителия полигональные, округлые, цилиндрические, в 3-8 раз больше лейкоцита, их цитоплазма обычно находится в состоянии дистрофии чаще грубозернистой белковой, вакуольной. Иногда в этих клетках видны ядра.

Единичные клетки переходного эпителия могут встречаться в осадке мочи здоровых людей. В большом количестве переходный эпителий обнаруживается при интоксикации, в моче лихорадящих больных, после операций, при непереносимости наркоза, лекарственных препаратов, при желтухах различной этиологии, а также при почечнокаменной болезни в момент прохождения камня, хроническом цистите, полипозе и раке мочевого пузыря в сочетании с клетками и комплексами клеток злокачественного новообразования.

Почечный (тубулярный) эпителий – клетки неправильной округлой, угловатой, четырехугольной формы, в 1,5-2,0 раза больше лейкоцита, окрашены мочевыми пигментами в бледно-желтый, а билирубином - в желтый или желто-коричневый цвет. Цитоплазма клеток находится в состоянии мелко-зернистой белковой или жировой дегенерации. Клетки почечного и переходного эпителия даже при незначительном содержании билирубина в моче окрашиваются в желтый цвет, поэтому обнаружение их окрашивания при микроскопическом исследовании является индикатором билирубинурии.

В моче здоровых людей клетки почечного эпителия не встречаются. При дегенеративных поражениях канальцев клетки почечного эпителия могут располагаться в нативных и в окрашенных азур-эозином препаратах разрозненно, пластами или группами, «накладываться» на гиалиновые и восковидные цилиндры, а при усиленном отторжении – образовывать эпителиальные цилиндры. В период олигурической стадии острой почечной недостаточности клетки почечного эпителия находятся в состоянии резко выраженной пролиферации, увеличиваются в размерах (в 3-5 раз больше лейкоцитов), накладываются на гиалиновые цилиндры и образуют ажурный контур вокруг них, располагаются в препаратах в виде железистых структур. Клетки почечного эпителия в состоянии жировой дегенерации принимают круглую или овальную форму, могут в 2-4 раза увеличиваться в диаметре по сравнению с нормальной клетки почечного эпителия. Почечный эпителий обнаруживается в моче больных нефротической формой хронического гломерулонефрита, липоидным нефрозом.

4.3.3. Диагностическое значение исследования мочи

Нефриты и нефрозы. *Нефрит* – заболевание почек, протекающее с воспалительным поражением всей почки или отдельных ее компонентов – клубочков, канальцев, чашечек или лоханки. В зависимости от локализации воспаления различают следующие виды нефритов:

- гломерулонефрит – воспалительное заболевание аутоиммунного характера с преимущественным поражением клубочкового аппарата почки;
- интерстициальный нефрит – воспалительное заболевание инфекционного характера с преимущественным поражением межпочечного характера;
- пиелонефрит – инфекционно-воспалительное поражение почки инфекциями гнойного характера, при котором поражаются преимущественно канальцевый аппарат почки, а также мочевыводящие пути

В анализе мочи при нефрите может наблюдаться:

- макрогематурия или микрогематурия, в первые дни заболевания в моче содержатся преимущественно свежие эритроциты, затем – выщелочные;
- незначительная или выраженная протеинурия; обычно альбуминурия в течение 2-3 недель;
- выраженная лейкоцитурия больше характерна для пиелонефрита, для гломерулонефрита характерно повышение в моче количества лимфоцитов;
- Появление β 2-микроглобулина в моче свидетельствует о поражении интерстиция почки;
- снижение фильтрационной способности почек по результатам исследования клиренса эндогенного креатинина.

Хронический пиелонефрит часто встречающееся заболевание. Течение его обычно бессимптомное, без субъективных клинических проявлений (20-30% случаев). Хронический пиелонефрит часто обнаруживается случайно или диагностируется на поздних стадиях, когда имеются выраженные нарушения функции почек или при патологоанатомическом вскрытии. Заболевание проявляется неспецифическими симптомами, такими как быстрая утомляемость, постоянные головные боли, снижение аппетита, похудание, тошнота, персистирующая субфебрильная температура, отеки. Реже отмечается болезненное мочеиспускание, преобладание ночного диуреза над дневным, анурез, протеинурия. Появление этих признаков требует дополнительного обследования для выявления инфекции мочевыводящих путей и почек. Пиелонефрит встречается у всех групп населения, чаще у молодых женщин и детей, больных диабетом и мужчин старше 45 лет. У беременных бактериурия выявляется в 5 раз чаще, чем у небеременных женщин. При этом примерно в 40% случаев развивается пиелонефрит.

Бессимптомная бактериурия может сопровождать латентную почечную патологию (врожденные анатомические дефекты развития почек и

мочевыводящих путей), которая рано или поздно проявляется острым или уже хроническим пиелонефритом. Поэтому важно провести диагностику инфекционного процесса мочевой системы на стадии, когда можно предотвратить возможные осложнения. Для ранней диагностики инфицирования мочевой системы показано регулярное массовое обследование школьников, женщин детородного возраста и людей, входящих в группы риска.

Нефроз – это функциональное нарушение, возникающие вследствие поражения почечных канальцев и интерстиция, что приводит к олигурии, нарушению канальцевой фильтрации, нефропатии, нефротическому синдрому. У большинства людей с данной патологией прослеживаются дистрофические изменения почечных канальцев. Основную роль в генезе различных форм нефротического синдрома отводят расстройствам иммунологических механизмов, особенно гиперчувствительности замедленного типа. Чаще развивается липоидный нефроз, реже – амилоидный нефроз. Помимо расстройств иммунных механизмов, в генезе нефротического синдрома принимают участие нарушения метаболических и физико-химических механизмов деятельности базальных мембран. Всё это приводит к метаболическим, структурным и функциональным нарушениям. Утолщение базальной мембраны обычно сопровождается нарушением её структурной целостности и резким повышением проницаемости, в первую очередь для белков. Поэтому основной признак нефротического синдрома – протеинурия > 3 г/день. С протеинурией связаны отеки, так как теряется альбумин и снижается онкотическое давление.

Часто возникает гиперхолестеринемия как результат активации синтетических процессов в печени в ответ на гипоальбуминемию. При нефротическом синдроме электрофореграмма мочевого белка идентична электрофореграмме плазменного белка, при этом больные не чувствительны к лечению стероидными гормонами.

Острая почечная недостаточность. Под острым повреждением почек (ОПП) понимают *острое (дни/недели) потенциально обратимое повреждение почечной паренхимы различной этиологии и патогенеза со снижением или без снижения экскреторной функции почек*. ОПП – распространенное быстро прогрессирующее заболевание с высокой смертностью. Диализ необходим 20-60% пациентов с ОПП. ОПП часто развивается после операций на сердце. Менее тяжелые формы ОПП приводят к длительной госпитализации. ОПП необходимо отличать от преренальной азотемии (ПА) – физиологического ответа почек на различные предрасполагающие факторы (снижение объема крови, использование диуретиков, ренин-ангиотензиновая блокада), которая быстро разрешается введением заместительных растворов, коррекцией лекарственной терапии и экстраренальных расстройств. В качестве критериев определения стадии ОПП в настоящий момент используют значения креатинина сыворотки крови, СКФ и диуреза.

Важно дифференцировать ОПП от ХБП, раннее вмешательство улучшает прогноз. Эффективное предотвращение развития и лечение ОПП возможно, если диагноз поставлен в самый ранний период – еще до роста креатинина сыворотки. Нужно учесть и то обстоятельство, что ОПП является фактором риска для ряда внепочечных осложнений. Задержка в диагностике приводит к запаздыванию необходимых терапевтических вмешательств, таких как прекращение использования нестероидных противовоспалительных средств, уточнение доз лекарств, коррекция гемодинамического статуса и т.д.

Липокалин-2 (Л2), также известный как липокалин, ассоциированный с нейтрофильной желатиназой (NGAL), синтезируется эпителиальными клетками, в том числе в проксимальных канальцах почек при воспалении. Л2 секретируется в мочу толстой частью восходящей петли Генле и собирающими трубочками, где он выполняет функцию антимикробной и антиокислительной защиты хелатированием железа. Основной лиганд Л2 –

сидерофоры – молекулы, связывающие железо. В моче Л2 появляется только при повреждении проксимальных канальцев за счет роста синтеза Л2 *de novo* в дистальных отделах нефрона, что и происходит при ОПП. Л2 – прогностический маркер нефротоксичности с высокой предсказательной ценностью. В отличие от определения креатинина в сыворотке, единственное определение мЛ2 позволяет выявить ОПП у пациентов с разными механизмами повреждения, даже когда время повреждения неизвестно, надежно дифференцируя ОПП от преренальной азотемии и ХБП. Маркер помогает предсказать неблагоприятный исход. Л2 может быть использован в диагностике ОПП в момент первичного обследования пациента, даже когда изменения уровня креатинина сыворотки минимальны.

Хроническая почечная недостаточность. Важнейшим показателем хронической болезни почек (ХБП) считается значительное снижение скорости клубочковой фильтрации (СКФ) до 25% (<30 мл/мин). В развитии хронической почечной недостаточности (ХПН) наиболее важным моментом является постепенное и бессимптомное нарушение функции почек. Клинически выраженные признаки почечной недостаточности появляются при гибели 60-75% нефронов. Однако изменения, происходящие в организме при нарушении функциональной способности почек, хорошо известны. Это позволяет выявить скрытую стадию в группах высокого риска и предпринять профилактические и лечебные мероприятия на ранних стадиях патологии почек.

Ранние бессимптомные стадии заболевания почек можно выявить лабораторными методами: в настоящее время чаще всего определяют креатинин сыворотки и рассчитывают СКФ. Измерением экскреции альбумина с мочой можно выявить некоторых, но не всех, пациентов с почечной патологией. Многочисленные исследования подтверждают неадекватность используемых методов диагностики и лечения пациентов на ранних стадиях ХПН. В то же время доказана эффективность таких методов лечения как контроль гликемии при сахарном диабете, строгий контроль

артериального давления, применение ингибиторов ангиотензин-превращающего фермента (иАПФ) и блокаторов рецепторов ангиотензина, ограничение потребления белка. В рекомендациях по скринингу хронических болезней почек (ХБП) основное внимание, как правило, уделяется лицам с гипертензией. Другое важное обстоятельство, связанное с потребностью точной оценки почечной функции, заключается в том, что при дозировании большинства лекарств необходимо учитывать степень почечной недостаточности. Даже умеренное снижение почечной функции является фактором риска развития сердечно-сосудистых заболеваний.

4.4. Диагностика заболеваний женских половых органов

4.4.1. Исследование вагинального отделяемого

Микроскопическое исследование вагинального отделяемого.

Микроскопическое исследование отделяемого из мочеполовых органов является одним из основных методов в диагностике мочеполовых инфекций, по его результатам можно оценивать наличие или отсутствие воспалительного процесса в мочеполовых органах, степень его выраженности и определять ряд возбудителей инфекций

Основными показаниями к проведению микроскопического исследования являются вагинальные выделения.

Для получения полноценного мазка женщинам рекомендовано не спринцеваться. Материал забирается из влагалища, цервикального канала. В лаборатории мазки исследуемого материала в зависимости от задач окрашивают и микроскопируют (табл. 4.7). Отмечают проявления воспалительной реакции: наличие лейкоцитов, слизи, фибрина. При обнаружении микроорганизмов (табл. 4.8) отмечают степень обсемененности, отношение к окраске по Граму и морфологические особенности. В частности, при обнаружении грамотрицательных диплококков, особенно при внутриклеточном их расположении, следует провести дополнительное обследование на гонорею. Выявление в мазках

простейших (трихомонады), мицелия или бластоспор гриба может служить основанием для положительного результата об обнаружении этих микроорганизмов в исследуемом материале.

Таблица 4.7

Основные методы окраски мазков из отделяемого половых органов

Метод окраски	Характеристика
Нативный препарат	Используется для диагностики трихомониаза, урогенитального кандидоза, бактериального вагиноза, исследования секрета простаты.
Анилиновые красители	Растворы метиленового синего и бриллиантового зеленого. применяется ограниченно для экспресс-диагностики гонококковой инфекции, трихомониаза и определения лейкоцитарной реакции
Окраска по Граму *	В зависимости от химической структуры бактерии обладают способностью удерживать краситель кристаллический фиолетовый или обесцвечиваться в спирте. Грамположительные микробы окрашиваются в сине-фиолетовый цвет, грамотрицательные - в розовый и красный. Основной метод окрашивания при микроскопии. Применяется для диагностики гонококковой инфекции, бактериального вагиноза
Окраска по Романовскому	Окраска позволяет выявить ядерные элементы и гранулы бактериальной клетки за счет сродства к основным краскам. Ядерные элементы имеют красно-фиолетовый цвет, цитоплазма - слабо-розовый. Ограниченно применяется для диагностики хламидиоза и трихомониаза.
Окраска по Папаниколау **	Основан на на различной реакции структур клеток на кислые и основные красители. Основной метод диагностики предраковых и раковых заболеваний шейки матки

Таблица 4.8

Инфекционные агенты, которые можно определить с помощью мазка из влагалища

Признак	Заболевание	Методы окраски
Внутри и внеклеточные диплококки	<u>Гонококковая инфекция</u>	Анилиновые красители Окраска по Граму
Трихомонада вагинальная	<u>Трихомониаз</u>	Анилиновые красители

		Окраска по Романовскому Нативный препарат
Псевдомицелий	<u>Кандидоз</u>	Нативный препарат Анилиновые красители Окраска по Граму
Нити в виде точка-тире	<u>Лептотрикс</u>	Нативный препарат Анилиновые красители
Включения в эпителиальных клетках	<u>Хламидийная инфекция</u>	Окраска по Романовскому
Ключевые клетки	<u>Бактериальный вагиноз</u>	Анилиновые красители Окраска по Граму Нативный препарат
Лейкоциты*	Лейкоцитарная реакция при уретрите, вагините, цервиците, проктите, фарингите, конъюнктивите	Все методы окраски
Койлоцитоз	<u>Папилломавирусная инфекция</u>	<u>Окраска по Папаниколау</u>
Гигантские эпителиальные клетки	<u>Цитомегаловирусная инфекция</u>	<u>Окраска по Папаниколау</u>
Атипичные эпителиальные клетки	Предраковые и раковые заболевания шейки матки	<u>Окраска по Папаниколау</u>

Показатели нормального мазка из влагалища представлены в табл. 4.9.

Таблица 4.9

Микроскопическая характеристика нормального мазка из влагалища и цервикального канала

Показатель	Влагалище	Цервикальный канал
лейкоциты	0-10 в поле зрения	0-30 в поле зрения
эпителий	зависит от фазы менструального цикла	
слизь	умеренно	
гонококки	не обнаружены	
трихомонады	не обнаружены	
ключевые клетки	не обнаружены	
кандиды	не обнаружены	
микрофлора	грамположительные палочки в большом количестве*	отсутствует

4.4.2. Оценка гормонального профиля женщин

Главным симптомом гипогонадизма у женщин является аменорея – отсутствие менструаций более 6 мес. Аменорея может быть первичной (менструаций никогда не было) или вторичной (менструации были, затем произошло их нарушение вплоть до полного прекращения). Первичная аменорея может быть частью нейро-эндокринного или обменно-эндокринного синдрома (синдром Иценко–Кушинга, ожирение, врожденная гипоплазия коры надпочечников, надпочечниковая недостаточность, диффузный токсический зоб, гипотиреоз). Вторичная аменорея может быть яичниковой или гипоталамо-гипофизарной природы. Недостаточность яичников может быть обусловлена аутоиммунным процессом, облучением, синдромом резистентных или истощенных яичников, а также при опухолях яичников, секретирующих андрогены или поликистозе яичников.

Гипергонадотропная аменорея проявляется синдромом истощенных яичников или синдромом резистентных яичников. Гипергонадотропная аменорея или «ранний климакс» развивается у женщин моложе 40 лет, имевших до этого нормальную менструацию. Считается, что это состояние наследственно обусловлено и связано с уменьшением количества ооцитов в яичниках ниже 10-15 тыс., что недостаточно для поддержания их нормальной функции до 48-50 лет. Содержание фолликулостимулирующего гормона (ФСГ) и лютеонизирующего гормона (ЛГ) в сыворотке резко повышено, концентрация эстрогенов снижена, что обычно наблюдают при климактерическом периоде. Синдром резистентных яичников также характеризуется гипергонадотропной аменореей, при которой вторичная аменорея сочетается с повышенным уровнем гонадотропинов в сыворотке и нормальной секрецией эстрогенов. Это может быть обусловлено мутацией рецептора ФСГ или инактивирующими мутациями гена рецептора ЛГ.

Нормогонадотропная аменорея может быть причиной бесплодия при врожденных или приобретенных нарушениях матки и ее придатков. К таким

состояниям приводит наличие внутриматочного спаечного процесса как следствие воспалительных процессов (эндометрит, криминальный аборт и др.).

Гипогонадотропная аменорея может быть обусловлена нарушением секреции гипоталамических или гипофизарных гормонов при первичных или метастазирующих опухолях, травмах черепа, нарушениях кровоснабжения, инфекционных болезнях (менингит и другие заболевания), гиперпролактинемии, гранулематозных заболеваниях, нервной анорексии, состояниях после приема пероральных контрацептивов. Нарушение гипоталамо-гипофизарно-яичниковой системы бывает при острой и хронической психической травме, большой физической нагрузке (у спортсменов). В 30–50% случаев вторичная аменорея и бесплодие являются следствием гиперпролактинемии даже в отсутствии лактореи.

При дифференциальной диагностике гипер- и гипогонадотропного гипогонадизма следует определять содержание ФСГ в сыворотке крови. Повышение ФСГ, как правило, указывает на первичную недостаточность яичников. Вторичная аменорея, наблюдаемая после приема пероральных контрацептивов, у большинства больных связана с повышением секреции пролактина.

Для выяснения причин бесплодия надо провести тщательное обследование женщины, в том числе гормональное. Оценивают функцию щитовидной железы, определяют уровень пролактина, ФСГ. В зависимости от изменения этих гормонов определяют уровень ЛГ, прогестерона, эстрадиола в сыворотке крови в различные фазы цикла, экскрецию с мочой 17-кетостероидов, кортизола, дигидроэпиандростерона, тестостерона, эстрагенов.

Пролактин у женщин регулирует развитие грудных желез и лактацию. Эстрогены обычно увеличивают секрецию пролактина. Концентрация пролактина в крови увеличивается во время физических упражнений, раздражения сосков, гипогликемии, беременности, лактации, стресса

(особенно вызванного операционным вмешательством). Опухоли из пролактин-секретирующих клеток вызывают у женщин аменорею и галакторею. Гиперпролактинемия бывает причиной бесплодия и нарушений функции яичников, пролактин сдерживает секрецию стероидов в яичниках, созревание желтого тела и секрецию ФСГ и ЛГ. После менопаузы концентрация пролактина в крови снижается.

Чрезмерное образование ТТГ может привести к гиперпролактинемии. Поэтому следует критически относиться к заключению «пролактинома» при гипофункции щитовидной железы. Следует предварительно проверить функцию щитовидной железы и предпринять соответствующее лечение.

4.4.3. Выявление дисбиоза влагалища

Оценка диагностической значимости бактериоскопического исследования биоценоза влагалища представлена в табл. 4.10.

Бактериальный вагиноз или дисбиоз влагалища – нарушение состояния влагалищной микрофлоры, характеризующееся избыточным развитием ряда микроорганизмов (*Gardnerella vaginalis*, *Mobiluncus spp.*, *Prevotella spp.*, *Mycoplasma hominis*) и замещением ими лактобактерий. Развитию бактериального вагиноза могут способствовать изменение гормонального статуса, снижение иммунологической реактивности, предшествующая антибактериальная терапия, воспалительные заболевания мочеполового тракта.

Диагноз бактериального вагиноза ставят на основании совокупности клинико-лабораторных данных: обильные гомогенные выделения, рН влагалищного секрета более 4,5, рыбный запах вагинальных выделений, обнаружение ключевых клеток.

Таблица 4.10

Микроскопическая характеристика биоценоза влагалища

Состояние биоценоза	Описание признаков	Морфологические формы
---------------------	--------------------	-----------------------

Нормоценоз	преобладание лактобацилл, отсутствие грамотрицательных бактерий, спор, мицелия, псевдогифов, лейкоцитов, единичные «чистые» эпителиальные клетки	типичное состояние нормального биотопа влагалища
Промежуточный тип	умеренное или незначительное количество лактобацилл, наличие грамположительных кокков, грамотрицательных палочек, обнаружение лейкоцитов, макрофагов, эпителиальных клеток	часто наблюдается у здоровых женщин, редко сопровождается жалобами и клиническими проявлениями
Дисбиоз влагалища	незначительное количество или полное отсутствие лактобацилл, обильная, полиморфная грамотрицательная и грамположительная палочковая и кокковая микрофлора, обнаружение ключевых клеток, количество лейкоцитов варьиabelно, отсутствие или незавершенность фагоцитоза, полимикробная картина мазка	бактериальный вагиноз
Вагинит	большое количество лейкоцитов, макрофагов, эпителиальных клеток, выраженный фагоцитоз	неспецифический вагинит
	обнаружение <i>N. gonorrhoeae</i>	гонорея
	обнаружение <i>Trichomonas vaginalis</i>	трихомониаз
	обнаружение мицелия, псевдогифов, спор	микотический вагинит

Выявление патогенной бактериальной флоры, признаков вирусной инфекции, микозов в отделяемом влагалища. Факт обнаружения в материале из влагалища *Gardnerella vaginalis* с помощью бактериологического метода или ПЦР не является основанием для постановки диагноза бактериального вагиноза или гарднереллеза, так как данный микроорганизм входит в состав нормальной микрофлоры влагалища. Обнаружение *N. gonorrhoeae* при бактериоскопическом исследовании влагалищных мазков осложняется отсутствием ключевого признака – внутриклеточного расположения грамотрицательных диплококков. Поэтому для подтверждения диагноза предпочтительно использование ПЦР и бактериологического метода. У девочек (до наступления менархе) и женщин (в менопаузе) диагноз гонореи устанавливают только на основании бактериологического исследования. Трихомониазный вагинит может быть

диагностирован с помощью микроскопического метода (предпочтительна микроскопия нативного неокрашенного препарата), культурального метода и ПЦР. Наиболее высокой чувствительностью обладает культуральный метод, однако его использование затруднено при одновременном присутствии во влагалищной слизи трихомонад и *Candida spp.* Диагностически значимо обнаружение *Candida spp.* в количестве не менее 10 000 КОЕ/мл. В связи с этим информативность качественных модификаций ПЦР сомнительна.

Наиболее частая причина кандидозного вагинита – *C. albicans*, реже – *C. glabrata*, еще реже – *C. tropicalis*. Прочие виды *Candida spp.* (*C. crusei*, *C. parapsilosis*) вызывают вагинит очень редко. В подавляющем большинстве случаев для диагностики кандидозного вагинита достаточно бактериоскопического исследования (микроскопия нативного неокрашенного препарата или мазка, окрашенного по Граму). *Candida spp.* входят в состав нормальной микрофлоры влагалища и обнаружение отдельных клеток при отсутствии клинической симптоматики не является основанием для назначения этиотропного лечения. К культуральному исследованию прибегают для подтверждения диагноза при отрицательном результате микроскопии и наличии симптомов заболевания, а также для видовой идентификации возбудителя при подозрении на нетипичную этиологию кандидоза.

4.5. Диагностика заболеваний мужских половых органов

4.5.1. Исследование семенной жидкости (эякулята)

Основной целью исследования спермы в КДЛ является: определение способности эякулята к оплодотворению и выявление симптомов поражения эякулята вследствие различных заболеваний и/или патологических процессов.

Референтные значения эякулята указаны в Руководстве ВОЗ по лабораторному исследованию эякулята человека и взаимодействия сперматозоидов с цервикальной слизью (табл. 4.11.). Эти данные не являются

минимально необходимыми для наступления зачатия. Мужчины с более низкими показателями эякулята также могут быть фертильны. Более того, стандартный параметр «количество сперматозоидов в 1 мл эякулята» считается собирательным от функционирования двух систем – выработки «концентрата» сперматозоидов (яички) и выработки жидкой части эякулята (придаточные половые железы). Поэтому данный параметр не может быть использован как критерий оценки сперматогенеза и его нарушений (в расчет идут только выраженные отклонения от нормы).

Таблица 4.11

Референтные значения эякулята

Объем	2-6 мл
Разжижение	Должно произойти в течение 60 мин
pH	7,2-8,0 ед
Концентрация сперматозоидов	20×10^6 сперматозоидов/мл и более
Общее количество сперматозоидов в эякуляте	40×10^6 сперматозоидов и более
Подвижность	50 % и более подвижных (категория a + b) или 25 % и более с поступательным движением (категория a) в течение 60 мин после эякуляции
Морфология	≥ 30 % нормальных сперматозоидов
Жизнеспособность	≥ 75 % живых сперматозоидов, то есть сперматозоиды которые не окрасилась в тесте с суправитальной окраской ≥ 30 % сперматозоидов сохраняет жизнеспособность в течение 24 часов
Агглютинация	Не выявляется
Лейкоциты	$< 1 \times 10^6$ лейкоцитов/мл

Уровень и объем проведения лабораторного исследования эякулята должен зависеть от конкретной задачи, поставленной лечащим врачом. Например, если эякулят получен для исключения воспалительных заболеваний простато-везикулярного комплекса, тогда может быть достаточным только морфологическое исследование клеточного состава с определением количества и концентрации лейкоцитов в эякуляте. При этом отклонения от нормальных показателей вне основной цели исследования (случайные находки) должны быть обязательно зафиксированы и доведены до сведения врача-клинициста.

Исследование физических и химических свойств:

Разжижение. Сперма, полученная при эякуляции, густая и вязкая. Первоначальная коагуляция спермы в момент эякуляции, по-видимому, препятствует потере сперматозоидов во влагалище, а последующее ее разжижение обеспечивает их продвижение через шейку матки. Разжижение эякулята при комнатной температуре должно наступить в течение 60 мин, обычно наступает через 10-30 мин. В некоторых случаях разжижения эякулята не происходит за 60 мин, этот факт необходимо отметить в бланке. Если эякулят длительное время остается вязким, полувязким или вообще не разжижается, можно думать о воспалении предстательной железы. Вязкая консистенция спермы препятствует движению сперматозоидов, которые или не двигаются или быстро теряют подвижность.

Вязкость. Вязкость определяется через 1 час после получения эякулята (после разжижения). Вязкая консистенция разжиженного эякулята препятствует движению сперматозоидов, при этом сперматозоиды или вообще не двигаются или быстро теряют подвижность. Повышенная вязкость наблюдается достаточно часто (по некоторым данным у 30-50% обследуемых) и может быть одним из факторов, препятствующих оплодотворяющей способности спермы, снижая подвижность сперматозоидов.

Объем. Объем эякулята измеряют сразу после его разжижения. Олигоспермия – уменьшение объема эякулята ниже 2 мл, аспермия - полное отсутствие эякулята. Олигоспермия и аспермия наблюдаются при окклюзии семявыносящих протоков, ретроградной эякуляции, хроническом воспалении предстательной железы и/или семявыносящих протоков, дефиците гонадотропных гормонов, врожденном отсутствии vas deferens, предстательной железы или иногда – семенных пузырьков. К уменьшению объема спермы приводит снижение секреции предстательной железы и семенных пузырьков. Снижение объема эякулята характерно для азооспермии – отсутствие сперматозоидов в эякуляте, которое наблюдается

при атрофии яичек или облитерации обоих семявыбрасывающих протоков. Полиспермия – увеличение объема эякулята более 6 мл. Полиспермия не влияет на фертильность. В то же время фертильность снижается, а иногда и отсутствует, при сочетании полиспермии и олигозооспермии.

Реакция (pH). Реакция спермы в норме слабощелочная или щелочная, pH 7,2-8,0. Определяется pH сразу после разжижения спермы. Щелочную реакцию сперме придает секрет бульбо-уретральных желез. Слабощелочная реакция среды обеспечивает активную подвижность сперматозоидов и частично компенсирует кислую среду влагалища (pH 4,0-4,2) до их проникновения в цервикальную слизь. Резко щелочная реакция спермы (pH 9,0-10,0) свидетельствует о патологии предстательной железы. Низкие значения pH (ниже 7,2) являются, как правило, косвенным признаком различных состояний или патологий (длительная мастурбация, хронические воспалительные процессы в простато-везикулярном комплексе). Кислая реакция спермы (pH 6,0 - 6,8) на фоне азооспермии отмечается при закупорке семявыносящих протоков обоих семенных пузырьков или двустороннего врожденного отсутствия семявыносящих протоков.

Биохимическое исследование спермы. Поддержание функциональной активности сперматозоидов осуществляется спермоплазмой, в которой содержатся белки и ферменты, микроэлементы, фруктоза, лимонная кислота, карнитин и другие метаболиты. Спермоплазма представляет собой смесь секретов добавочных половых желез. Нормальная деятельность этих желез обеспечивается андрогенными гормонами. Тестостерон стимулирует накопление фруктозы в семенных пузырьках, лимонной кислоты и микроэлементов в предстательной железе, карнитина в придатках яичка, поэтому уровень этих метаболитов в спермоплазме может косвенно свидетельствовать об андрогенной насыщенности организма и функциональном состоянии желез мужской половой системы.

Секреция фруктозы считается наиболее важной функцией семенных пузырьков, так как это вещество обеспечивает поддержание обмена веществ

и подвижности сперматозоидов. Нормальная концентрация фруктозы в спермоплазме: 10-60 ммоль/л. Снижение жизнеспособности сперматозоидов сопровождается повышением уровня фруктозы в спермоплазме.

Концентрация лимонной кислоты отражает функциональное состояние предстательной железы и эндокринной функции яичек. В норме ее более 20 ммоль/л.

Существенное влияние на подвижность сперматозоидов и оплодотворяющие свойства эякулята оказывают такие микроэлементы, как Fe, Mg, Mn, Zn. Их секреция осуществляется в основном предстательной железой.

Спермоплазма содержит большое количество белков, которые секретируются в основном предстательной железой и семенными пузырьками. В норме концентрация общего белка составляет 40-45 г/л. Ключевые ферменты процесса оплодотворения – сериновая протеиназа (акрозин) и гиалуронидаза, участвующие в акросомальной реакции. Их активность находится в прямой зависимости от концентрации сперматозоидов. Исследование активности акрозина используется для оценки фертильности при подготовке к искусственному оплодотворению. Содержание гиалуронидазы находится в прямой зависимости от количества сперматозоидов. С увеличением числа сперматозоидов ее концентрация в эякуляте возрастает.

Микроскопическое исследование спермы. Микроскопическое исследование эякулята следует проводить в 2 этапа. На 1 этапе на неокрашенных мазках оценивается концентрация, подвижность и агглютинация сперматозоидов, а также наличие других клеточных элементов. На 2 этапе исследование проводится на окрашенных препаратах, оценивается жизнеспособность сперматозоидов, определяется их концентрация, проводится морфологическая классификация сперматозоидов и выявляется наличие антиспермальных антител.

Концентрация сперматозоидов:

Нормозооспермия. У здорового мужчины в эякуляте в 1 мл содержится более 20 млн сперматозоидов. Общее количество сперматозоидов в эякуляте > 40 млн

Полизооспермия. Количества сперматозоидов в 1 мл эякулята превышает 150 млн.

Олигозооспермия. В 1 мл эякулята содержится менее 20 млн сперматозоидов. Количество сперматозоидов между 10 и 20 млн/мл обозначается как *олигозооспермия I степени*, количество сперматозоидов менее 10 млн/мл – как *олигозооспермия II степени*.

Азооспермия – сперматозоиды при микроскопическом исследовании в нативном препарате и в осадке эякулята, полученного после его центрифугирования, не обнаружены. Могут присутствовать клетки сперматогенеза.

Аспермия – нет эякулята

Для определения при олигозооспермии истинного числа сперматозоидов необходимо произвести 2-3 контрольных подсчета с интервалом 3-4 недели.

Транзиторная и старческая олигоспермия. У одного и того же мужчины число сперматозоидов подвержено большим физиологическим колебаниям. У стариков олигозооспермия связана с процессом инволюции половых желез.

Истинная олигозооспермия – причины:

Обструкция семявыносящих путей – разделяется на врожденную и приобретенную. Предположить наличие обструкции можно, если после центрифугирования спермы в осадке отсутствуют не только сперматозоиды, но и клетки сперматогенеза. К приобретенной обструкции семявыносящих путей приводят хронические воспалительные процессы в верхних отделах мочеполового тракта, вызванные гонококками, хламидиями, микобактериями туберкулеза.

Муковисцедоз – у таких больных сперма может не содержать сперматозоидов и клеток сперматогенеза, а рН - ниже 7,0 (кислая реакция). Патология связана с нарушением функции семявыносящих путей, причем у этих пациентов также может быть обнаружена атрезия эпидидимиса и семенных пузырьков.

Тестикулярная дисфункция может привести к нарушению сперматогенеза. При непосредственном поражении яичек возникает первичный гипогонадизм. При нарушении гипоталамо-гипофизарной регуляции сперматогенеза развивается вторичный гипогонадизм.

Приобретенный первичный гипогонадизм развивается при травматических или инфекционных орхитах, синдроме сдавления, варикоцеле, новообразованиях половых органов, лейкемии, злокачественной лимфоме, повреждении спинного мозга, при печеночной и почечной недостаточности, после облучения, при действии токсических препаратов, психологических стрессов и у людей пожилого возраста. Диагностика приобретенного гипогонадизма складывается из изучения анамнестических данных, гормонального статуса и общеклинических исследований.

Вторичный гипогонадизм вызывается нарушением регуляторной функции гипоталамо-гипофизарной системы. В крови у этих пациентов снижено содержание гонадотропных гормонов (гипогонадотропный гипогонадизм). Дефицит гонадотропинов может быть вызван как первичной патологией гипофиза, так и нарушением секреции гонадотропин-рилизин-факторов гипоталамуса (GnRH). У этих пациентов снижен в крови уровень тестостерона (идиопатический гипогонадизм).

Кинезиограмма. Оценка подвижности сперматозоидов и разделение их по группам – субъективный фактор. Подвижность каждого сперматозоида классифицируется по категориям «а», «b», «с» и «d», при этом используются следующие критерии:

«а» – быстрое поступательное движение (т.е. ≥ 25 мкм/сек при 37°C и ≥ 20 мкм/сек при 20°C . 25 мкм приблизительно соответствуют длине 5 головок или половине длины хвоста нормального сперматозоида);

«b» – медленное, вялое поступательное движение;

«с» – непоступательное (колебательное или маятникообразное, манежное), скорость движения менее 5 мкм/сек;

«d» – неподвижные сперматозоиды.

Нормальная подвижность сперматозоидов считается если:

≥ 50 % сперматозоидов относится по подвижности к категории а + b или ≥ 25 % сперматозоидов относится по подвижности к быстрым с поступательным движением (категория а)

Дискинезия – маятникообразное или манежное движение сперматозоидов – в норме составляет 2 %.

При комнатной температуре сперматозоиды сохраняют подвижность 12-24 часа, при этом в первые 2 часа подвижность не снижается, к концу 5 часа уменьшается примерно в 2 раза.

Астенозооспермия – снижение подвижности сперматозоидов ниже нормы. Астенозооспермия отмечается примерно у 50% пациентов с нарушением фертильности. Заключение о *незначительной степени астенозооспермии* можно делать, если количество активно- и малоподвижных сперматозоидов с поступательным движением в сумме составляют менее 50%, но более 30%.

Причины астенозооспермии – генетические нарушения строения жгутика, хронические воспалительные заболевания, бактериоспермия, экзогенные токсические факторы.

Агглютинация и агрегация. Агглютинация – это склеивание подвижных сперматозоидов между собой головками, хвостами или головок с хвостами. В норме агглютинации сперматозоидов нет. Агглютинация позволяет

предположить наличие иммунологического фактора бесплодия, однако ее нельзя считать доказательством последнего.

Агрегация (псевдоагглютинация) – хаотическое скопление неподвижных сперматозоидов, нагромождение их на комочки или тяжи слизи, клеточные элементы и детрит. Агрегация и агглютинация оцениваются как отдельные показатели.

Спермограмма. Спермограмма - совокупность количественного и качественного исследования морфологии сперматозоидов в окрашенных препаратах. При выполнении спермограммы проводят последовательный подсчет, по крайней мере, 200 сперматозоидов.

Нормальные зрелые сперматозоиды человека имеют овальную головку, шейку и хвост. Длина головки сперматозоида составляет 4,0-5,5 мкм, ширина 2,5-3,5 мкм. Большую часть головки занимает ядро, прикрытое акросомой. *Акросома или ядерная шапочка* на переднем конце ядра головки сперматозоида – это просветление в верхней части головки, занимающее 40-70% ее площади. Акросома имеет наружную и внутреннюю мембраны, между которыми находятся протеаза акрозин и гиалуронидаза. Ферменты акросомы способствуют проникновению сперматозоидов через оболочку яйцеклетки. Шейка и тело сперматозоида, должны быть тонкими, менее 1 мкм в ширину, составлять 1,5 длины головки сперматозоида и прикрепляться к головке вдоль ее оси. Хвост должен быть прямым, одинаковой толщины на всем протяжении и несколько уже в средней части, не закрученным и иметь длину около 45 мкм. Только полноценные сперматозоиды проникают в верхний отдел цервикального канала женщины. В то же время даже у здоровых мужчин сперматозоиды обладают выраженной гетерогенностью и отличаются размерами и строением головки, шейки и хвоста (жгутика).

Нормальной считается спермограмма, в которой ≥ 30 % нормальных сперматозоидов. В руководстве ВОЗ указывается, что *in vitro* со снижением

частоты оплодотворения ассоциируется с снижением морфологически нормальных сперматозоидов ниже 15 %.

Тератозооспермия – увеличение количества патологических форм сперматозоидов выше референтных значений. Выраженная тератозооспермия резко снижает шансы оплодотворения и увеличивает вероятность пороков развития у плода, если оплодотворение произошло. Тератозооспермия обычно сочетается с олигозооспермией и астенозооспермией.

Сперматозоиды, у которых головка заключена в *цитоплазматическую каплю* (космонавты) и те, у которых *цитоплазматическая капля* расположена на шейке в виде шарфа, и по отношению к размеру головки составляет более 1/2, выделяются как **незрелые** или **юные**. В нормальной спермограмме они составляют около 1%. Увеличение содержания незрелых сперматозоидов указывает на частые половые акты и отмечается при варикоцеле.

Увеличение относительного количества сперматозоидов с двумя головками и двумя хвостами связывают с поражением сперматозоидов вирусом. Удлиненные головки и макроголовки и множественные хвосты обнаруживаются у мужчин, у которых статистически достоверно повышено количество полиплоидных и анеуплоидных сперматозоидов.

Иммунологическое исследование спермы:

Антитела к сперматозоидам. Антитела к сперматозоидам относятся почти исключительно к двум классам иммуноглобулинов: IgA и IgG. Исходя из того, что IgA функционируют в большей степени на поверхности, определяя барьерный иммунитет, а сперматоциты в тестикулах отделены от остального организма гемато-тестикулярным барьером, считается, что антитела класса IgA имеют большее клиническое значение, чем антитела класса IgG. Антитела класса IgM в эякуляте выявляют очень редко из-за большого размера их молекул.

Скрининг на наличие антител. Определение наличия антител к сперматозоидам проводят в нативном эякуляте. При этом используют либо тест с иммунными шариками, либо тест на смешанную антиглобулиновую

реакцию (МАР-тест). Результаты этих тестов имеют силу только при подсчете, по крайней мере, 200 подвижных сперматозоидов. Результаты теста с иммунными шариками и МАР-теста не всегда согласуются. Если результаты этих тестов положительны, для подтверждения диагноза необходимо провести дополнительные исследования, в частности тест на взаимодействие сперматозоидов с цервикальной слизью.

Считается, что не менее 50% подвижных сперматозоидов должны быть покрыты антителами, чтобы существенно нарушились пенетрация сперматозоидами цервикальной слизи и оплодотворение *in vivo*. На основании этого, как минимум 50% подвижных сперматозоидов должны быть связаны с иммунными шариками или должны образовывать агглютинаты с частичками латекса. Однако диагноз «иммунологическое бесплодие» должен быть подтвержден тестами на взаимодействие сперматозоидов с цервикальной слизью.

Бактериоскопическое исследование спермы:

Trichomonas urogenitalis. Трихомонады – простейшее из класса жгутиковых грушевидной формы длиной 10-20 мкм, шириной 7-10 мкм. Форма тела поддерживается скелетным образованием – аксостилем. В переднем конце тела клетки расположено ядро и пучок из 4 жгутиков, пятый жгутик, возвратный, идет по краю ундулирующей мембраны (складки цитоплазмы). Движение простейшего поступательно-колебательное, осуществляется в результате постоянного движения жгутиков, ундулирующая мембрана совершает волнообразное движение, препятствующее вращению клетки. Трихомонады достаточно легко распознаются в нативном препарате спермы, несмотря на активное движение сперматозоидов. Это достаточно крупные клетки, их диаметр в 1,5-3 раза больше диаметра нейтрофила. Более четко строение трихомонад можно определить в препаратах окрашенных азур-эозином. Это клетки неправильной округлой формы. В переднем конце тела клетки расположено вытянутое, в виде косточки сливы ядро с четкой хроматиновой структурой,

коричневато-вишневого цвета. Цитоплазма клетки окрашивается в серовато-голубоватый цвет и может содержать мелкие вакуоли. Иногда у трихомонад окрашиваются в малиновый цвет жгутики.

При бактериоскопическом исследовании эякулята может быть выявлена смешанная флора: элементы гриба рода *Candida* (псевдомицелий), диплококки, не позволяющие исключить L-форму *N. Gonorrhoeae*, морфологические формы простейших, *Entamoeba histolytica*, что свидетельствует о выраженном дисбиозе эякулята. В клетках плоского эпителия из эякулята могут быть морфологические изменения, характерные для вирусной инфекции: ВПЧ/койлоциты, ЦМВ/клетки «совиный глаз», дегенеративно измененный эпителий. Эффективность бактериоскопического исследования существенно повышается при обогащении эякулята методом центрифугирования.

4.5.2. Исследование секрета предстательной железы

Материал из простаты. Непосредственное взятие материала из простаты возможно лишь при хирургической операции, что, как правило, неприемлемо. Именно поэтому для диагностики бактериальных простатитов и выявления их этиологии, как правило, используют сбор 1-й и 2-й порций мочи, получение секрета простаты с помощью массажа и затем сбор 3-й порции мочи. Именно эту схему, как правило, используют при проведении клинических испытаний препаратов, предназначенных для лечения простатитов.

Оценка диагностической значимости результатов. Первая проба мочи характеризует состояние микрофлоры уретры, вторая – мочевого пузыря, третья – простаты. В пользу хронического бактериального простатита свидетельствуют следующие данные:

- обнаружение лейкоцитов в моче после массажа простаты в количестве более 10 в 1 мл и в соке простаты – более 10 в поле зрения;

- увеличение количества бактерий в 3-й пробе мочи более чем в 10 раз по сравнению со 2-й пробой;
- обнаружение в 3-й пробе микроорганизмов, отсутствовавших в 1-й и 2-й пробах.

Наиболее вероятная причина хронических бактериальных простатитов – грамотрицательные уропатогенные бактерии (*E. coli*, *Klebsiella spp.*, *Pseudomonas spp.*), менее вероятная – грамположительные бактерии (*E. faecalis*, *Staphylococcus spp.*). Вероятной причиной простатитов может быть хламидийная инфекция. Также в качестве возможных кандидатов на роль этиологических агентов упоминаются облигатно-анаэробные бактерии, уреаплазмы, пропионобактерии, хеликобактеры и даже лактобактерии.

4.5.3. Оценка репродуктивной функции

Удельный вес мужского фактора в общем бесплодных браков достигает 50 процентов и продолжает расти, поэтому исследование репродуктивной функции мужчины – актуальная задача. Основными причинами мужского бесплодия являются:

- варикоцеле;
- инфекционно-воспалительные заболевания половых органов;
- иммунологические нарушения;
- врожденные аномалии (крипторхизм, монорхизм, гипоспадия, эписпадия и т.д.);
- системные заболевания (туберкулез, сахарный диабет, заболевания щитовидной железы);
- хирургические вмешательства по поводу паховой грыжи, гидроцеле, стриктуры уретры, операции на мочевом пузыре;
- лучевая терапия, гормональная, химиотерапия, применение некоторых психотропных средств, препаратов нитрофуранового ряда;
- сексуально-эякуляторные нарушения;

- обструктивная азооспермия;
- некрозооспермия;
- эндокринные заболевания и расстройства (гипогонадизм, гиперпролактинемия, тестостерондефицитные состояния).

К дополнительным причинам мужского бесплодия относятся:

- привычные интоксикации (злоупотребление алкоголем и никотином);
- профессиональные вредности (воздействие ионизирующей радиации, контакт с органическими и неорганическими веществами);
- тепловой фактор (длительный период лихорадки с повышением температуры тела выше 38⁰С, работа в условиях высоких и низких температур);
- травмы мошонки.

Высокая частота и разнообразие причин мужского бесплодия требуют тщательного сбора анамнеза, клинического обследования и проведения лабораторных исследований.

Доказано, что на фертильность влияют такие системные заболевания, как сахарный диабет и нервно-психические заболевания, приводящие к импотенции и нарушениям эякуляции, туберкулез, вызывающий эпидидимит и простатит. В этом случае наблюдается неподвижность сперматозоидов, вызванная патологией жгутика и/или нарушением пассажа спермы через придаток. Аналогичные нарушения подвижности могут быть ассоциированы с цистифиброзом поджелудочной железы. Следует обращать внимание на оперативные вмешательства, произведенные на мочевом пузыре и по поводу варикоцеле, крипторхизма, паховой грыжи, гидроцеле, стриктуры уретры, симпатэктомии, которые могут приводить к ретроградной эякуляции или экскреторной азооспермии, осложненной выработкой антиспермальных антител. Любая операция, особенно с применением общего наркоза, может приводить к временному нарушению фертильности. Патогенез бесплодия у

мужчин крайне сложен из-за того, что в патологический процесс вовлекаются не только центральная нервная система, гонады, периферические органы-мишени, но и другие эндокринные железы (щитовидная, надпочечники), иммунная, симпато-адреналовая и другие системы.

4.5.4. Оценка воспалительного процесса

Инфекционно-воспалительные заболевания половых органов – одна из наиболее распространенных причин нарушения мужской фертильности. Особого внимания заслуживают инфекции, передаваемые половым путем, последствием которых может быть обструктивная азооспермия, образование антиспермальных антител, эякуляторные нарушения. При подозрении на инфекции мочеполового тракта прежде всего делается мазок из уретры. Бланк микроскопического исследования мазка из передней уретры представлен в табл. 4.12.

Таблица 4.12

Показатели в норме мазка с уретры мужчин

Показатель	Норма (передняя уретра)
лейкоциты	0-5 в поле зрения
эпителий	до 5-10 в п.з.
слизь	умеренно
гонококки	не обнаружены
трихомонады	не обнаружены
ключевые клетки	не обнаружены
кандиды	не обнаружены
микрофлора	единичные кокки

В последнее время активно развивается исследование инфекционных агентов методами молекулярной диагностики. Практически рутинными стали

исследования в соскобе с уретры методом ДНК *Chlamydia trachomatis*, ДНК *Mycoplasma Hominis*, ДНК *Mycoplasma genitalium*, ДНК *U.urealyticum/U.parvium*, ДНК *Gardnerella vaginalis*, ДНК *Treponema pallidum*, ДНК *Neisseria gonorrhoeae*, ДНК *Candida albicans*, ДНК *Trichomonas vaginalis*, ДНК ВПЧ высокого риска.

Хронические воспалительные заболевания половых органов являются патогенетическими факторами нарушения фертильности. Подвижными сперматозоиды становятся в процессе созревания в придатке яичка. Их подвижность меняется по мере продвижения вдоль эпидидимиса. Созревание сперматозоидов обусловлено андроген-зависимыми факторами, которые вырабатывает эпителий эпидидимиса. Эпидидимиты различной этиологии вызывают снижение подвижности сперматозоидов. Астенозооспермия возникает, по-видимому, в результате нарушения секреторной функции эпителия эпидидимиса. В период между эякуляциями каудальный отдел эпидидимиса является местом хранения зрелых сперматозоидов, при его воспалении интоксикация повреждает сперматозоиды и приводит к астенозооспермии и увеличению количества мертвых клеток.

Некоторые микроорганизмы приводят к снижению подвижности сперматозоидов, вызывая их агглютинацию и/или адгезию. Этот процесс зависит от концентрации бактерий в сперме. Так *in vitro* *E. coli* значительно снижает подвижность сперматозоидов в концентрации 10^4 /мл.

Подвижность сперматозоидов снижается при действии электромагнитных полей, солей тяжелых металлов, свинца, наркотиков, накоплении в сперме кадмия. У сперматозоидов, помещенных в магнитное поле, снижается подвижность из-за изменения формы жгутика. По-видимому, действие экзогенных факторов неспецифическое и прямо или косвенно влияет на структуру компонентов жгутиков. Так у наркоманов были обнаружены значительные изменения микротрубочек аксономы

жгутиков, напоминающие подобные при синдроме Картагенера (сперматозоиды живые, но неподвижные).

4.6. Диагностика заболеваний центральной нервной системы

4.6.1. Исследования ликвора

Спинно-мозговая жидкость (СМЖ, ликвор) необходима для правильного функционирования мозговой ткани. СМЖ образуется преимущественно за счет ультрафильтрации плазмы крови и секреции некоторых компонентов в сосудистых сплетениях головного мозга. Она является питательной и экскреторной жидкостью мозга. СМЖ – место выделения и удаления некоторых конечных продуктов метаболизма мозговой ткани. Мозг не имеет лимфатической системы, продукты его метаболизма удаляются двумя путями: через капиллярный кровоток и через СМЖ, а оттуда через сосудистые сплетения и всасывается мелкими венами твердой мозговой оболочки.

Гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) связан с поверхностью, отделяющей мозг и СМЖ от крови, и обеспечивающий двунаправленный селективный обмен различных молекул между кровью, СМЖ и мозгом. Уплотненные контакты эндотелия мозговых капилляров, эпителиальные клетки сосудистых сплетений и арахноидальных мембран служат морфологической базой барьера. В гипоталамусе, в передней спайке мозга и под сводом такой эндотелиальный барьер отсутствует, что позволяет компонентам плазмы непосредственно проникать к осмо- и хеморецепторам. Термин «барьер» указывает на состояние непроницаемости для молекул определенного критического размера. Низкомолекулярные компоненты плазмы крови, такие как глюкоза, кетоновые тела, мочевины и креатинин свободно поступают из плазмы в СМЖ, тогда как белки проходят пассивной диффузией через стенку сосудистого сплетения, между плазмой и СМЖ имеется значительный градиент, зависящий от молекулярной массы белков. Иммуноглобулины не проходят сквозь ГЭБ, поэтому ткань нервной системы

чужеродна для иммунной системы. Нарушение ГЭБ сопровождается деградацией нервных волокон за счет аутоиммунных реакций.

У здорового человека в течение суток образуется от 350 до 1150 мл СМЖ непрерывно со скоростью 0,2-0,8 мл/мин, что зависит от внутричерепного давления: чем давление ниже, тем быстрее происходит образование СМЖ. Обновляется СМЖ полностью от 1 до 6 раз в сутки в зависимости от потребности организма. У взрослого человека одновременно в субарахноидальных пространствах и в желудочках мозга циркулирует 110-160 мл ликвора.

Исследование физических и химических свойств спинномозговой жидкости:

Относительная плотность. Относительная плотность (удельный вес) люмбальной СМЖ составляет 1,005-1,009, субокципитальной – 1,003-1,007, вентрикулярной – 1,002-1,004 г/мл. Повышение относительной плотности СМЖ наблюдается при менингитах, уремии, сахарном диабете, снижение — при гидроцефалии.

Прозрачность. Нормальная СМЖ бесцветна, прозрачна, как дистиллированная вода, состоит на 98,9-99,0% из воды и 1,0-1,1% сухого остатка. Помутнение СМЖ зависит от существенного увеличения количества клеточных элементов, бактерий, грибов и повышения содержания белка. Помутнение, вызванное клетками и грибами, уменьшается или исчезает после центрифугирования. Помутнение, обусловленное бактериями, после центрифугирования не исчезает.

При повышении содержания фибриногена в СМЖ появляется легкая опалесценция, пленка на стенках пробирки, мешочек, содержащий клеточные элементы или желеобразный сгусток на дне пробирки. Фибриновая пленка может образоваться сразу после получения СМЖ или через некоторое время. Если фибриновая пленка не образовалась в течение рабочего дня, пробирку с СМЖ, не встряхивая, оставляют при комнатной температуре или в холодильнике до следующего дня. Образовавшуюся фибриновую пленку и

препараты из свернувшейся пленки окрашивают по Цилю–Нильсену и микроскопируют для выявления микобактерий туберкулеза.

Образование фибринозной пленки наблюдается при гнойных и серозных менингитах, опухолях ЦНС, мозговом кровоизлиянии, компрессии головного мозга. Если СМЖ содержит эритроциты, фибринозная плетка обычно не образуется, за исключением тех случаев, когда их количество превышает 1×10^{12} /л. При высоком содержании общего белка, фибриногена и выраженном плеоцитозе в пробирке со СМЖ в течение 24 ч при комнатной температуре или в холодильнике образуется осадок, который также исследуется на туберкулез после окраски по Цилю–Нильсену.

При полной блокаде ликворного пространства при опухолях спинного мозга, абсцессах, туберкулах, арахноидитах и костных компрессиях фибринозная пленка образуется сразу же при извлечении СМЖ. Содержание в СМЖ общего белка при данном синдроме составляет более 15 г/л.

Эритроархия. Различают «путевую» (артефактную) и истинную эритроархию. «Путевая» эритроархия вызывается попаданием крови в СМЖ при ранении во время пункции. Истинная эритроцитархия возникает при кровоизлияниях в ликворные пространства при разрыве кровеносных сосудов при геморрагическом инсульте, опухолях головного мозга, черепно-мозговых травмах. При сборе СМЖ в 3 пробирки о присутствии «путевой» крови свидетельствует наличие крови только в первой пробирке.

При субарахноидальном кровоизлиянии примесь крови в СМЖ – ведущий симптом. Субарахноидальное кровоизлияние может произойти без повреждения кровеносных сосудов в результате паралича вазомоторных нервов и сопровождается расширением сосудов, стазом крови в капиллярах и диапедезом эритроцитов. Эритроархия возникает также при внутричерепном кровотечении в результате разрыва аневризмы сосуда головного мозга, геморрагическом инсульте, кровоизлиянии в ткань головного мозга, геморрагическом энцефалите, черепно-мозговой травме.

В динамике независимо от этиологии и степени кровоизлияния на 2-е сутки из СМЖ удаляется 25-50% эритроцитов, а на 3-4-е сутки – 52-97% эритроцитов. Эритроциты полностью исчезают из СМЖ при легкой черепно-мозговой травме и исключении кровотечения на 5-10-е сутки, при геморрагическом инсульте и тяжелой черепно-мозговой травме – на 10-20-е сутки. При разрыве аневризмы сосуда головного мозга эритроциты исчезают из СМЖ на 40-80-е сутки, что связано с длительным выпотеванием эритроцитов через стенку измененных сосудов головного мозга.

Ксантохромия. Ксантохромия – розовая, оранжевая, желтая или бурая окраска СМЖ, обусловленная продуктами распада крови – гемоглобином и билирубином. Оксигемоглобин, высвободившийся из лизированных эритроцитов, обуславливает розовую окраску СМЖ. При этом реакция на кровь резко положительна, а реакция на билирубин отрицательная. Появление билирубина, образовавшегося из оксигемоглобина под действием гемоксидазы, находящейся в клетках сосудистого сплетения, коры и паутинной оболочки головного мозга, проявляется оранжевой окраской СМЖ. Активность этого фермента при патологии в ЦНС увеличивается до 4 раз. Переход гемоглобина в билирубин продолжается до 12 ч. Билирубин в сочетании с гемоглобином определяется в СМЖ через 2 ч с момента кровоизлияния, через 12 ч в СМЖ преобладает билирубин, а реакция на гемоглобин слабоположительна. Оранжевая окраска СМЖ исчезает через 4-8 сут. Метгемоглобин и метальбумин имеют коричневую окраску, такой цвет СМЖ часто наблюдается при инкапсулированных гематомах и геморрагиях.

Билирубинархия при содержании белка в СМЖ ниже 1,5 г/л и при отсутствии желтухи и гиперкаротинемии – следствие предшествующей черепно-мозговой травмы, кровоизлияния в головной или спинной мозг. При геморрагическом инсульте, разрыве аневризмы сосуда головного мозга или черепно-мозговой травме с массивным кровоизлиянием билирубинархия появляется в 1-е сутки, при субарахноидальном кровоизлиянии ее

интенсивность нарастает обычно на 2-4-е сутки. При разрыве аневризмы билирубинархия сохраняется в течение 1-1,5 мес, а при инсультах и черепно-мозговых травмах, не сопровождающихся кровотечением – в течение 10-14 сут.

Зеленый цвет СМЖ придает примесь гноя, в этом случае СМЖ мутная, что наблюдается при гнойных менингитах, прорыве абсцесса головного мозга в субарахноидальное пространство или в полость желудочков мозга.

Биохимическое исследование спинномозговой жидкости:

Протеинархия. Содержание белка в норме в люмбальной СМЖ составляет 0,22-0,33 г/л, желудочковой СМЖ – 0,12-0,20 г/л, цистернальной СМЖ – 0,10-0,22 г/л. При этом концентрация белка 0,33 г/л рассматривается как величина, граничащая с патологией, а концентрация белка 0,22 г/л – как признак гидроцефальной люмбальной СМЖ. Гипопротеинархия встречается редко у больных с доброкачественной внутричерепной гипертензией, гипертиреозом и при некоторых лейкозах. Повышение белка в СМЖ при патологических процессах (воспаление, травма, опухоль) зависит от нарушения гемодинамики в сосудах головного мозга. Субарахноидальные кровоизлияния различной этиологии всегда сопровождаются гиперпротеинархией, как в результате непосредственного поступления крови в ликворные пространства, так и нарушения проницаемости сосудистой стенки. При ишемических инсультах гиперпротеинархия наблюдается редко, при геморрагических инсультах отмечается значительная гиперпротеинархия – до 8,4 г/л. Опухоли головного мозга сопровождаются гиперпротеинархией, которая зависит от структуры опухоли. При глиомах больших полушарий вне зависимости от их расположения примерно в 70% случаев отмечается повышение содержания белка в СМЖ. Практически все сосудистые опухоли сопровождаются гиперпротеинархией.

При цистицеркозе головного мозга, который практически всегда сопровождается хроническим арахноидитом, примерно у 80% пациентов

уровень белка в СМЖ повышен до 0,5-2,0 г/л независимо от локализации цистецеркозных пузырей. У больных с черепно-мозговой травмой альбумин-глобулиновый коэффициент повышается за счет альбумина. Поскольку осмотическое давление альбумина выше, чем глобулинов, перераспределение белковых фракций – один из защитных механизмов, предотвращающих отек головного мозга. В плазме крови больных в этот период содержание альбумина снижено.

У здоровых взрослых людей примерно 80% белков СМЖ поступает из плазмы крови, а 20% белков имеет интратекальное происхождение. Количество белка в СМЖ существенно меньше и распределение его фракций и отдельных белков значительно отличается от тех же показателей плазмы крови вследствие наличия ГЭБ. Если установлено, что фракция сывороточных белков в СМЖ составляет менее 1%, можно с уверенностью утверждать, что ГЭБ не нарушен.

Основную массу общего белка СМЖ составляет альбумин, который происходит исключительно из альбумина плазмы крови. Альбумин — важнейший показатель, который позволяет доказать нарушение функции ГЭБ и рассматривается как неспецифический признак патологии. Почти всякое нарушение ГЭБ ведет к увеличению абсолютной концентрации альбумина в СМЖ и повышению отношения концентрации альбумина СМЖ и альбумина плазмы (табл. 4.13).

Таблица 4.13

**Степень дисфункции гематоэнцефалического барьера при патологии
головного мозга**

Степень дисфункции	Отношение альбумин СМЖ/альбумин плазмы крови	Возможная причина
Норма	менее 7×10^{-3}	Примерно половина ткани головного мозга, особенно кора, не контактируют с СМЖ, поэтому патология этих областей не будет отражаться на составе СМЖ

Слабая	до 10×10^{-3}	Рассеянный склероз Хронический ВИЧ-ассоциированный энцефалит Алкогольная полинейропатия Амиотрофический латеральный склероз
Умеренная	до 20×10^{-3}	Вирусный менингит Диабетическая полинейропатия Инфаркт головного мозга
Тяжелая	более 20×10^{-3}	Туберкулезный менингит Менингополиневрит

Нормальное содержание общего белка в СМЖ еще не свидетельствует об отсутствии патологии ЦНС, на ее органическое поражение указывает изменение соотношений белковых фракций. Белки СМЖ, синтезируемые тканями головного мозга и мозговых оболочек (интратекально), представлены в табл. 4.14.

Таблица 4.14

Белки СМЖ, синтезирующиеся интратекально тканями головного мозга и мозговых оболочек

Название белка	Молекулярная масса, кДа	Содержание в СМЖ	Содержание в плазме крови	Соотношение СМЖ/плазма крови	Интратекальный синтез в%
Транстеритин (преальбумин)	55	17 мг/л	250 мг/л	0,068	93
Цистатин С	13	6 мг/л	1,0 мг/л	□5	>99
α_2 -микроглобулин	12	1 мг/л	5,8 мг/л	0,59	99
Нейрон специфическая енолаза	78	5 мкг/л	5,8 мкг/л	0,8733	>99
Ферритин	473	6 мкг/л	120 мкг/л	0,05	97
S100 белок	21	2 мкг/л	□0,3 мкг/л		
Основной миелиновый белок	19	0,5 мкг/л	□0,5 мкг/л		
Нейрональная ацетилхолинэстераза	290	13 Ед/л	3 Ед/л	4,3	>99

При инсульте содержание в СМЖ нейрон специфической енолазы (НСЕ, NSE) повышается до 10 мкг/л и более, максимальная концентрация наблюдается на 3-5-е сутки. При болезни Кляйнфельтера количество нейрон специфической енолазы повышается до 30 мкг/л и выше, что является

важным диагностическим критерием данной патологии, которую трудно отличить от других заболеваний коры головного мозга, особенно на ранних стадиях. При болезни Альцгеймера содержание нейрон специфической енолазы в СМЖ, как правило, остается в пределах нормы. При опухолях головного мозга маркерные белки опухолей редко достигают концентрации более 100 мкг/л.

Гликоархия. Определение концентрации глюкозы в СМЖ желательно проводить одновременно с измерением ее концентрации в плазме крови через 4-6 ч после приема пищи. При нормальном уровне глюкозы в плазме крови в люмбальной СМЖ концентрация глюкозы составляет примерно 60% ее плазменного уровня. При гипергликемии разница между СМЖ и кровью значительно возрастает – концентрация глюкозы в люмбальной СМЖ составляет только 30-35% ее плазменного уровня.

Гипогликоархия – уменьшение уровня глюкозы в СМЖ ниже 2,2 ммоль/л или снижение коэффициента глюкоза плазмы крови/глюкоза СМЖ менее 0,3. Гипогликоархия наблюдается при бактериальном туберкулезном или грибковом менингитах. При сифилитических менингитах снижения глюкозы в СМЖ не наблюдается. При цистицеркозе и трихинелезе у 50% больных отмечается гипогликоархия. Вирусные менингиты также сопровождаются гипогликоархией, однако снижение уровня глюкозы невыраженное и часто не достигает критических значений.

При первичных и метастатических опухолях мозговых оболочек отмечается выраженная гипогликоархия, достигающая практически полного исчезновения глюкозы из СМЖ (глиомы, саркомы, лимфомы, нейролейкемии, меланомы, метастатические карциномы из легких, желудка). Основная причина гипогликоархии в данном случае – интенсивная утилизация глюкозы клетками опухолей при нарушенной проницаемости ГЭБ.

Гипергликоархия отмечается у больных с ишемическими нарушениями мозгового кровообращения – самое высокое увеличение концентрации

глюкозы наблюдается при геморрагическом инсульте, менее выраженное – при ишемическом инсульте и незначительное – при преходящих нарушениях мозгового кровообращения.

Микроскопическое исследование клеточного состава спинномозговой жидкости. Микроскопическое исследование СМЖ производится с целью определения цитоза – общего количества клеточных элементов – с последующей дифференциацией клеточных элементов (ликворная формула), а в некоторых случаях – подсчетом количества эритроцитов.

Из-за низкого содержания белка в СМЖ происходит быстрое разрушение эритроцитов, лейкоцитов и тканевых клеточных элементов, поэтому для получения точного результата необходимо подсчитать общее количество клеток в СМЖ не позднее чем через 30 мин после ее получения. Во избежание примеси «путевой» крови для цитологического исследования рекомендуется брать вторую или третью пробирку полученной СМЖ.

Общее количество клеток в люмбальной СМЖ (нормоцитоз) в зависимости от возраста представлено в табл. 4.15.

Клеточный состав СМЖ представлен в табл. 4.16.

Таблица 4.15

Нормоцитоз в зависимости от возраста

Возраст	Количество клеток в люмбальной СМЖ
От 0 до 3 мес	20–25×10 ⁶ /л
От 3 мес до 1 года	14–15×10 ⁶ /л
От 1 года до 5 лет	10–14×10 ⁶ /л
От 5 лет до 10 лет	8–10×10 ⁶ /л
Старше 10 лет	4–6×10 ⁶ /л
Взрослые	3–5×10 ⁶ /л

Таблица 4.16

Ликворная формула, полученная по препаратам, приготовленным на цитоцентрифуге

Тип клеток	Взрослые,%	Новорожденные,%
------------	------------	-----------------

Лимфоциты	62±43	20±18
Моноциты	36±20	72±22
Нейтрофилы	2±5	3±5
Эозинофилы	редко	редко
Гистиоциты (макрофаги)	редко	5±4
Эпендимальный клетки	редко	редко

Ликворная формула здоровых людей представлена в основном лимфоцитами (70%) и моноцитами (30%). В СМЖ здоровых доношенных и недоношенных новорожденных присутствуют еще нейтрофильные гранулоциты, содержание которых колеблется от 6 до 50%. В нормальной СМЖ содержится 60% Т-лимфоцитов и 40% В-лимфоцитов.

Клиническое значение химико-микроскопических лабораторных исследований. Увеличение количества клеток в СМЖ (плеоцитоз) рассматривают как признак органического поражения ЦНС (табл. 4.17), хотя некоторые заболевания ЦНС сопровождаются нормальным количеством клеток (нормоцитозом).

Таблица 4.17

Плеоцитоз при различных заболеваниях ЦНС

Заболевания	Количество клеток в 1 л СМЖ
Острый бактериальный менингит	более $3,0 \times 10^9$ /л
Актиномикоз ЦНС	около $3,0 \times 10^9$ /л
Вирусный менингоэнцефалит (вирус Коксаки, аденовирус)	$1,0-3,0 \times 10^9$ /л
Туберкулезный менингит (острая стадия)	$0,3-3,0 \times 10^9$ /л
Абсцесс головного мозга	$1,0-2,0 \times 10^9$ /л
Энцефалиты	$0,03-0,3 \times 10^9$ /л
Рассеянный склероз	$3,0-50,0 \times 10^6$ /л
Нейросифилис, различные формы	$0,05-0,5 \times 10^9$ /л
Опухоли до операции	$10,0-60,0 \times 10^6$ /л
Опухоли после операции	выраженный плеоцитоз, быстро снижается
Ишемический инсульт	В первые 24 ч выраженный плеоцитоз, макс. на 2-7-е сутки. Количество лейкоцитов от 0 до $1,4 \times 10^9$ /л
Геморрагический инсульт	Выраженный плеоцитоз, в среднем $30-130 \times 10^9$ /л, макс. на 8-21-е сутки

Субарахноидальное кровоизлияние	В первые 24 ч плеоцитоз умеренный, на 2-7-е сутки – выраженный ($130-300 \times 10^6/\text{л}$), через 3-4 нед снижается до нормальных значений
---------------------------------	---

Изменения в ликворной формуле – признаки патологического процесса в ЦНС. Изменение соотношения клеточных элементов в СМЖ в процессе воспаления соответствуют трем фазам клеточной защиты:

✓ нейтрофильная или защитная фаза, может быть от нескольких часов до нескольких дней;

✓ фагоцитарная фаза – с участием мононуклеарных клеток фагоцитарной системы, продолжительность данной фазы больше защитной;

✓ лимфоцитарная фаза – количество клеточных элементов (плеоцитоз) снижается, в СМЖ появляются спокойные, малые лимфоциты, данная фаза может длиться несколько месяцев.

При воспалении и других заболеваниях ЦНС происходят количественные и качественные изменения лимфоцитов, характеризующиеся появлением активированных лимфоцитов. Они отличаются большими размерами, более рыхлым строением ядерного хроматина, выраженной базофилией цитоплазмы. Особенно ярко данные изменения проявляются в СМЖ при вирусных менингоэнцефалитах, туберкулезном менингите, рассеянном склерозе, нейросифилисе, полиневритах и некоторых опухолях головного мозга. Изменяется соотношение между Т- и В-лимфоцитами. При остром воспалительном процессе отмечается нейтрофильный плеоцитоз, при хроническом – лимфоидный плеоцитоз. Характерно увеличение содержания макрофагов при субарахноидальных кровоизлияниях и других заболеваниях сосудов головного мозга. Наличие эритрофагов и гематоидинофагов в кровянистой, кровавой или бесцветной СМЖ свидетельствует о кровоизлиянии в головной мозг. Наличие даже одной злокачественной клетки в СМЖ указывает на опухоль головного мозга. Присутствие в ликворной формуле нескольких бластов – признак нейрорлейкемии.

4.6.2. Исследование выпотных жидкостей

4.6.2.1. Серозные оболочки и серозная жидкость

К серозным оболочкам относят:

- плевру (висцеральная оболочка покрывает каждое лёгкое, париетальная – рёбра);
- брюшину (висцеральная выстилает внутренние органы брюшной полости, париетальная – стенки таза);
- эпикард (*epicardium* – висцеральный листок серозной оболочки сердца);
- перикард (*pericardium* – её париетальный листок).

В серозных полостях находится строго определённое количество серозной жидкости. В перикардиальной полости – около 2 мл чистой перикардиальной серозной жидкости, в плевральной – около 10 мл плевральной жидкости, в брюшной полости – около 50 мл перитонеальной жидкости. Серозная жидкость – это ультрафильтрат плазмы крови, транссудат, который постоянно продуцируется и реабсорбируется обеспечивает скольжение органов при дыхании, сердечных и перистальтических сокращениях.

Общие закономерности формирования серозной жидкости рассмотрим на примере плевральной жидкости. Гидростатическое давление в париетальной плевре выше, чем в висцеральной. Основные лимфатические сосуды расположены в висцеральной плевре, из них формируется плевральная жидкость, попадают в неё белок и клетки. В течение суток объём плеврального фильтрата превышает 1 л, при этом постоянно происходит фильтрация жидкости в плевральное пространство и реабсорбция её обратно в лимфатические сосуды. Низкомолекулярные соединения присутствуют в плевральной жидкости в такой же концентрации, как в сыворотке крови, а концентрация высокомолекулярных соединений ниже, чем в сыворотке. Референтные диапазоны для наиболее часто исследуемых

показателей в серозной жидкости плевральной полости представлены в табл. 4.18.

Таблица 4.18

Референтные значения лабораторных показателей для плевральной жидкости

Показатель	Референтный интервал
Общий белок	10-20 г/л, из которых 50-70% приходится на альбумин
Клеточный состав, количество мезотелиальные клетки	1000-5000/мкл
моноциты	3-70%
гранулоциты	30-75%
лимфоциты	до 10%
Глюкоза	2-30%
Активность ЛДГ	Концентрация такая же, как в плазме крови
рН	Менее 50% сывороточной активности
Объём	Больше, чем плазмы крови
	0,1-0,2 мл/кг массы тела

В клинической практике жидкости серозных полостей, образующиеся при патологических процессах, принято называть выпотными жидкостями.

Патогенез возникновения трансудатов и экссудатов. Трансудат – жидкость, скапливающаяся в полостях тела, образуется в результате влияния системных факторов на образование жидкости и её резорбцию. При трансудативном выпоте листки серозных оболочек не вовлечены в первичный патологический процесс. Трансудат возникает в случаях, когда гидростатическое или коллоид-осмотическое давление изменяется в такой мере, что жидкость, фильтрующаяся в серозную полость, превышает объём реабсорбции. Это бывает чаще всего в результате:

- нарушения общего и местного кровообращения, например при хроническом венозном полнокровии (сердечно-сосудистая, почечная недостаточность, портальная гипертензия);
- снижения онкотического давления в сосудах при гипопроотеинемии;
- нарушения обмена электролитов.

Трансудат, скапливающийся в плевральных полостях, называют *гидротораксом*, в брюшной полости – *асцитом*, в полости перикарда – *гидроперикардом*.

Транссудат обычно бывает прозрачным, почти бесцветным или с желтоватым оттенком, реже мутноватым из-за примеси слущенного эпителия, лимфоцитов, липоцитов; удельный вес не превышает 1,015 г/мл.

Экссудат образуется в результате поражения серозных оболочек, чаще всего из-за повышения проницаемости капилляров оболочек, но может возникнуть и при нарушении лимфатического оттока из серозной полости. При инфекциях, некоторых системных заболеваниях (ревматоидный артрит, системная красная волчанка) экссудат формируется в результате нарушения проницаемости капилляров, при опухолевом росте причиной его формирования бывает блокада лимфатической системы из-за набухания мезотелиальных клеток или накопления клеточного детрита, фибрина и коллагена, блокирующих лимфатический дренаж.

Дифференциацию серозного выпота на транссудат и экссудат проводят, как правило, на основании учёта содержания белка в жидкости. Однако использование только этого критерия в 10% случаев может давать ошибочные результаты.

Если выпот представляет собой транссудат, то дальнейших диагностических исследований не требуется, лечение может быть направлено на лежащую в основе выпота основную патологию (застойную сердечную недостаточность, цирроз печени). И, наоборот, если выпот окажется экссудатом, то для выявления причин его образования необходимы дальнейшие диагностические исследования.

4.6.2.2. Исследование физических и химических свойств выпотных жидкостей

Физические свойства выпотных жидкостей. Серозный выпот (транссудат или экссудат) может быть прозрачным или мутным, обычно окрашенным в желтоватые тона различной интенсивности. Иногда серозная жидкость оказывается резко мутной, при этом в ней просматриваются крупные зернистые включения, быстро оседающие на дно сосуда. Такой

характер может иметь выпот при воспалительных процессах, туберкулёзе, сифилисе, ревматизме.

Серозно-гнойный и гнойный экссудат – мутная, желтовато-зелёная жидкость с обильным рыхлым осадком. Гнойный экссудат встречается при эмпиеме плевры, перитоните.

Гнилостный экссудат – мутная жидкость серо-зелёного цвета с резким гнилостным запахом; характерна для гангрены лёгкого и других процессов, сопровождающихся распадом ткани.

Геморрагический экссудат – прозрачная или мутная жидкость красновато- или буровато-коричневого цвета. Количество эритроцитов может быть различным: от небольшой примеси, когда жидкость имеет слабо-розовую окраску, до обильного содержания, когда она сходна с цельной кровью. Наиболее частой причиной данного выпота является новообразование, однако геморрагический характер жидкости большого диагностического значения не имеет, поскольку наблюдается также при ряде неопухолевых заболеваний (травма, инфаркт лёгкого, плеврит, геморрагический диатез). В то же время при злокачественных процессах с обширной диссеминацией опухоли по серозной оболочке может иметь место серозный, прозрачный выпот.

Хилёзный экссудат – мутная жидкость молочного цвета, содержащая во взвешенном состоянии мельчайшие жировые капли. Такой выпот обусловлен попаданием лимфы из разрушенных крупных лимфатических сосудов или грудного лимфатического протока в серозную полость, встречается при травмах лимфатических сосудов, абсцессах, инфильтрации сосудов опухолью, филяриозе, лимфоме.

Холестериновый экссудат – густая желтоватая или буроватая с перламутровым оттенком жидкость с блестящими хлопьями, состоящими из скоплений кристаллов холестерина. Примесь разрушенных эритроцитов может придавать выпоту шоколадный оттенок. Такой характер имеет осумковавшийся выпот, который длительно существует (иногда несколько

лет) в серозной полости. При определённых условиях – обратном всасывании из серозной полости воды и некоторых минеральных компонентов экссудата, а также при отсутствии притока жидкости в замкнутую полость – экссудат любой этиологии может приобрести характер холестеринового. Холестериновый экссудат встречается при туберкулёзе, злокачественных новообразованиях, разрыве кисты.

Слизистый экссудат – содержит значительное количество муцина и псевдомуцина, может встречаться при мезотелиоме, муцинозной опухоли яичника, псевдомиксоме.

Ни один из перечисленных видов экссудата не является патогномоничным для злокачественной опухоли, так как может иметь место и при неопухолевых процессах. При злокачественных новообразованиях с вовлечением серозных оболочек наиболее часто встречается геморрагический экссудат.

Биохимические показатели серозной жидкости. Биохимическими критериями отличия трансудата от экссудата являются градиенты белка и активности ЛДГ между выпотом и сывороткой (табл. 4.19). Особенно важно выяснить тип выпота при дифференциальной диагностике злокачественной опухоли, при диссеминации которой обычно бывает экссудат, с сердечной недостаточностью, при которой определяется трансудат.

Таблица 4.19

Лабораторные критерии для дифференцировки трансудата и экссудата

Показатель	Трансудат	Экссудат
Внешний вид	Серозная жидкость светло-жёлтая или зеленоватая, главным образом прозрачная и чистая	Серозная жидкость мутная, с наличием фибриновых сгустков, следов крови, гноя, хилёзная
Общий белок, г/л	<30	>30
выпот/сыворотка	<0,5	>0,5
ЛДГ, МЕ/л	<2/3 верхней границы референтного диапазона для сыворотки	>2/3 верхнего референтного значения для сыворотки
выпот/сыворотка	<0,6	>0,6

Общий белок, отношение «белок_{плевральная жидкость}/белок_{сыворотка}».

Концентрация общего белка <30 г/л указывает на трансудат, тогда как >30 г/л указывает на экссудат. Отношение «белок_{плевральная жидкость}/белок_{сыворотка}» $>0,5$ указывает на экссудат. Самое низкое содержание белка в плевральном выпоте бывает у больных с нефротическим синдромом, и самое высокое – при туберкулёзе. При выпоте, вызванном туберкулёзом, концентрация общего белка в выпотной жидкости находится обычно в диапазоне 35-65 г/л, при пневмонии и злокачественных опухолях – 20-60 г/л.

Глюкоза в концентрации $>5,3$ ммоль/л присутствует в трансудате в 97% случаев. Уровень глюкозы $>8,3$ ммоль/л встречается примерно в 6% случаев плевральных выпотов, особенно часто при лимфоме, циррозе печени, опухолях почек, гипопроотеинемии и сахарном диабете.

Концентрация глюкозы в плевральной жидкости $< 2,8$ ммоль/л считается сниженной. Такая низкая концентрация в плевральном выпоте характерна для рака лёгкого и печени, системной красной волчанки, ревматоидного артрита, туберкулёза. Концентрация глюкозы в плевральной жидкости $<1,7$ ммоль/л сочетается с хроническим полиартритом, злокачественными опухолями и эритремией. При выпоте, вызванном злокачественной опухолью, уровень снижения концентрации глюкозы отражает активность опухолевого процесса, очень низкие значения ($<0,56$ ммоль/л) свидетельствуют о плохом прогнозе заболевания.

Лактат в плевральной жидкости и в плевральном выпоте, не связанном с бактериальной инвазией (цирроз печени, нефроз, травма или системная красная волчанка), составляет 0,67-5,20 ммоль/л (6-47 мг/дл). Концентрация лактата в интервале 5-22 ммоль/л (45-200 мг/дл) указывает на бактериальную инфекцию. Очень высокие значения лактата в плевральном выпоте выявлены при метастазах.

4.6.2.3. Микроскопическое исследование клеточного состава выпотных жидкостей при инфекционных заболеваниях, воспалении и злокачественных новообразованиях

Основными морфологическими элементами, которые можно обнаружить в выпотах из серозных полостей, являются:

- клетки крови и рыхлой соединительной ткани (эритроциты, лейкоциты, в том числе нейтрофилы, эозинофилы, лимфоциты, плазматические клетки, гистиоидные элементы);
- мезотелий;
- клетки злокачественных новообразований;
- клеточный детрит (мелкозернистая масса из разрушенных клеток – гнойные процессы, опухоли).

Из неклеточных элементов можно выявить:

- капли жира (разного размера, хорошо преломляют свет – экссудаты с клеточным распадом);
- кристаллы холестерина (тонкие, бесцветные таблички с обломанным углом – туберкулёз, опухоли, старые осумкованные выпоты);
- кристаллы гематоидина (золотисто-желтые иглы, иногда в виде ромба, звезды, метёлочки – показатель наличия «старой» крови);
- кристаллы Шарко-Лейдена (в виде бесцветных игл, «стрелок компаса» — аллергические процессы).

Клеточный состав серозной жидкости отличается значительным разнообразием. В ней присутствуют в разных количествах мезотелиальные клетки, гистиоидные элементы, макрофаги, лимфоциты, реже эозинофилы, тучные клетки и нейтрофильные лейкоциты. В патологических условиях при нарастании экссудации количество слущенных мезотелиальных клеток увеличивается, а соотношение их с другими видами клеточных элементов зависит от характера патологического процесса, стадии его развития и реактивности организма.

Эритроциты выявляются в серозной жидкости в разном количестве в зависимости от причины, вызвавшей их появление (травма, злокачественное новообразование, инфекция). В серозном трансудате их наличие связано с травмой сосудов при пункции.

Нейтрофилы входят в состав клеток плевральной жидкости в количестве до 10%. Преобладание нейтрофилов говорит о фоновой пневмонии и парапневмоническом выпоте, который обычно бывает стерильным. Увеличение числа нейтрофилов наблюдается при инфаркте лёгкого и панкреатите. Содержание нейтрофилов в плевральной жидкости может повышаться при заболеваниях, напрямую не затрагивающих плевральную полость, в частности при травме пищевода, субдиафрагмальном абсцессе, неспецифической эмпиеме. Нейтрофильные лейкоциты преобладают в гнойном экссудате любой этиологии. Наличие нейтрофильных лейкоцитов в стадии дегенеративного распада на фоне детрита и обильной микрофлоры свидетельствует о тяжести процесса. При выраженных дегенеративных процессах вместо лейкоцитов могут оставаться лишь «клетки-тени».

Эозинофильные лейкоциты – преимущественно бисегментированные клетки с оранжевой гранулярной зернистостью. Эозинофильная инвазия отмечается, если число эозинофилов превышает 10% клеточного состава плевральной жидкости. Эозинофилы могут появляться в серозном экссудате при туберкулёзном плеврите, опухолях, травмах, паразитарных, грибковых заболеваниях, аллергических реакциях. Наиболее распространенной причиной эозинофилии плевральной жидкости является попадание воздуха в плевральную полость. Второй распространенной причиной эозинофилии в плевральной жидкости может быть попадание крови в плевральную полость. После травматического гемоторакса число эозинофилов в плевральной жидкости значительно увеличивается со второй недели. Плевральный выпот, вызванный эмболией сосудов лёгких, также часто связан с попаданием крови в плевральную полость, в результате число эозинофилов в нем значительно

увеличивается. Возможен эозинофильный выпот на начальных стадиях диссеминации злокачественной опухоли по серозной оболочке.

Лимфоциты более стойкие, чем нейтрофилы, и в меньшей степени подвергаются дегенеративным изменениям в выпотной жидкости. При выпоте, вызванном туберкулёзом или злокачественной опухолью, наблюдается лимфоцитоз с преобладанием молодых форм лимфоцитов. Наличие множества мелких зрелых лимфоцитов, особенно в сочетании с мезотелиальными клетками, свидетельствует о туберкулёзе. Лимфоциты в плевральной жидкости повышаются также при хроническом воспалении, вирусных и микоплазменных инфекциях.

Плазматические клетки выпотной жидкости морфологически не отличаются от плазматических клеток крови. При затяжном характере воспалительного процесса в серозной полости их можно выявить в значительном количестве.

Мононуклеарные фагоциты разнообразны по форме и окраске. Макрофагами называют гистиоциты с признаками фагоцитоза, в зависимости от серозных полостей их обозначают как плевральные, перитонеальные и т.д. Нередко макрофаги содержат включения в виде остатков ядер лейкоцитов и других клеток, эритроцитов, капель жира, гемосидерина и т.д.

Мезотелий – это однослойный плоский эпителий, выстилающий серозные оболочки плевральной, перикардальной и брюшной полости и попадающий в выпотную жидкость в результате слущивания. Пласты из клеток неизмененного мезотелия можно обнаружить в препаратах, полученных при эндоскопическом исследовании. При пролиферации мезотелия под действием различных факторов (инфекции, травмы, лекарственные средства, диссеминация злокачественного процесса) увеличивается общее количество и размеры клеток.

При острых воспалительных процессах клетки мезотелия могут приобретать выраженные признаки атипии, их становится трудно отличить от клеток рака. Резко выраженная пролиферация клеток мезотелия с атипией

наблюдается при механическом и химическом повреждении серозного покрова (оперативное вмешательство, травма, случайное попадание контрастной массы в серозную полость и т.д.).

В случае подозрения на инфекционную причину выпота необходимо взять пробу выпотной жидкости для бактериологического посева до начала лечения антибиотиками. Инфицирование перикардального выпота может сочетаться с инфекцией лёгких, плевры, средостения. Инфекционный перикардальный выпот составляет примерно 10% всех перикардальных выпотов, чаще других он бывает вызван бактериями (1-2%), микоплазмами (3%) и микобактериями (5%). Коксакивирусы – это семейство энтеровирусов, которые могут вызвать генерализованную инфекционную патологию и перикардит. Примерно в 4% случаев после энтеровирусной инфекции развиваются такие осложнения как нарушения ритма сердца, сердечная недостаточность и дилатация левого желудочка. В связи с этим выдвигаются предложения о постановке исследований на энтеровирусную инфекцию при острых миокардитах и хронической дилатации сердца, при этом на анализ берут биопсию эндокарда, перикардальную жидкость и кровь.

У новорожденных и младенцев инфекция вирусом Коксаки В вызывает миокардит, для которого характерна высокая детская смертность. У взрослых вирусы подгрупп А и В приводят к развитию острого инфаркта миокарда или миоперикардита. До 5% всех случаев инфицирования вирусом Коксаки осложняется патологией со стороны сердца.

При *хронической сердечной и почечной недостаточности* в выпотном материале преобладают округлые клетки небольшого и среднего размера, расположенные разрозненно, в виде небольших пластов и скоплений; могут встречаться единичные структуры, сходные с железистоподобными. Большая часть клеток находится в состоянии дистрофии, дегенерации. Резко выраженных признаков пролиферации с атипией не наблюдается.

В жидкости из *Дугласова пространства*, пункцию которого чаще всего выполняют при доброкачественных опухолях матки и яичника, клетки мезотелия расположены, как правило, в виде обширных однослойных пластов, границы между клетками могут быть чёткими, либо смазанными и улавливаться лишь по более светлomu ободку цитоплазмы. В некоторых пластах тесное взаимное расположение клеток может нарушаться, пласт как бы разрыхляется.

При *системной красной волчанке* выпот может быть обнаружен в любой из серозных полостей, чаще в плевральной или перикардиальной, реже – в перитонеальной. Иногда выпот является первым проявлением заболевания. LE-клетки (Lupus Erythematosus Cells) – это фагоциты (чаще нейтрофильные), содержащие гомогенизированный ядерный материал из других клеток («гематоксилиновое тельце»), он заполняет почти всю цитоплазму нейтрофила, оттесняя ядро к периферии. В мазках обнаруживают элементы воспаления, клетки мезотелия, клетки с дегенеративными изменениями, ядерный детрит.

При подозрении на *злокачественное новообразование* основное значение имеет цитологическое исследование. Для постановки верного цитологического заключения, помимо данных микроскопического анализа, нужны сведения о предшествующем лечении (лучевом, химиотерапевтическом и т.д.), вызывающем деструктивно-дистрофические изменения клеточных элементов, а также данные о различных вмешательствах, травмирующих мезотелиальный покров.

Задачи цитологического исследования:

- определить характер патологического процесса (неопухолевый или опухолевый);
- при неопухоловом процессе идентифицировать клеточный состав (клетки мезотелия, лимфоциты, эозинофильные, нейтрофильные лейкоциты, лимфоциты, плазматические клетки);

- в случае опухолевого поражения определить его первичный или метастатический характер;
- по возможности определить первичный очаг и/или гистологическую форму опухоли (плоскоклеточный, железистый, мелкоклеточный и другие формы рака, неэпителиальные опухоли).

4.6.2.4. Клиническое значение химико-микроскопических лабораторных исследований

Важнейшей задачей лабораторного исследования выпотных жидкостей – дифференциальная диагностика опухолевых поражений. Ряд лабораторных показателей выпотных жидкостей, в том числе биохимических, обнаружение опухолевых маркеров в концентрациях выше порогового значения, позволяет предположить наличие опухолевого поражения плевры. Однако для уверенного суждения о характере процесса необходима морфологическая верификация процесса с помощью цитологического или гистологического исследования. Дополнительными методами для выявления опухолевого процесса, служат цитохимические, иммуногистохимические и иммуноцитохимические исследования, определение хромосомных aberrаций, генетический анализ, проточная цитофлуориметрия.

Опухолевые маркеры. Исследование опухолевых маркеров позволяет получить крайне важную диагностическую информацию, позволяющую предположить наличие злокачественной опухоли и выбрать правильный алгоритм обследования пациента. Отрицательный результат при определении опухолевых маркеров нельзя считать доказательством отсутствия злокачественного поражения, в то время как присутствие опухолевого маркера в значениях, превышающих пороговое, является признаком, указывающим на неопластический процесс, и требует крайне тщательного обследования больного.

Раково-эмбриональный антиген (РЭА) используется для мониторинга течения заболевания и эффективности терапии рака толстого кишечника,

молочной железы, легкого. Особенно высокий уровень обнаруживается у больных с метастазами в серозные полости.

Пороговое значение РЭА в плевральном выпоте, равное 3 мкг/л, имеет диагностическую чувствительность для выявления злокачественной опухоли 48-57%, диагностическую специфичность 78-99%. Дополнительное исследование СА 19-9 с установленным пороговым значением 30 Ед/мл увеличивает диагностическую чувствительность выявления опухоли примерно на 10%, специфичность на 15%. РЭА обычно выше при метастатическом поражении, чем при мезотелиоме плевры. Повышенная концентрация РЭА в серозном выпоте определяется при ряде доброкачественных заболеваний, в частности, при аденоме бронха, послеоперационном фиброзе легкого, туберкулезном или вирусном плеврите, сепсисе, циррозе, сердечной недостаточности, лечении радиоактивным облучением. В этих случаях в среднем концентрация РЭА в плевральной жидкости составляет 1,5 мкг/л, колебания от 0,4 до 3,0 мкг/л. При выпоте, вызванном злокачественными опухолями, концентрация РЭА в плевральной жидкости определена на уровне свыше 100 мкг/л с колебаниями от 0,6 до > 3200 мкг/л.

Раковый антиген 15.3 (СА 15.3) имеет пороговое значение в плевральном выпоте, равное 25 Ед/мл, Превышение этого порога имеет диагностическую чувствительность для выявления злокачественной опухоли 48 %, диагностическую специфичность 97 %.

Фрагмент цитокератина 19 (CYFRA 21-1) имеет пороговое значение 50 мкг/л. При превышении этого порога диагностическая чувствительность выявления злокачественной опухоли составляет 38 %, специфичность 82 %.

Цитологическое исследование. У мужчин наиболее часто **опухолевые клетки** в плевральном выпоте обнаруживаются при раке легкого, при лимфоме и лейкозе, опухолях желудочно-кишечного тракта. У женщин опухолевые клетки в плевральном выпоте чаще обнаруживаются при

опухолях молочной железы. Примерно в 60 % случаев опухоль относится к аденокарциноме.

Примерно в 14% случаев исследование клеточного состава плеврального выпота является первым диагностическим признаком опухоли. Иногда лабораторное обнаружение опухолевых клеток в асцитической жидкости предшествует клинической манифестации опухоли на 3 и более года. Далеко не во всех случаях плеврального выпота, вызванного злокачественной опухолью, в выпотной жидкости обнаруживаются опухолевые клетки, но цитологическое исследование необходимо выполнять всегда, особенно если есть данные за злокачественный процесс.

Злокачественные опухоли серозных оболочек могут быть первичными (мезотелиома) и вторичными, т.е. метастатическими. В большинстве случаев при опухолях серозных оболочек появляется экссудат, в котором обнаруживаются атипичные клетки. Следует учитывать, что в жидкой среде все клетки, как опухолевые, так и неопухолевые, имеют тенденцию округляться, их специфические черты сглаживаются, они становятся похожими друг на друга. В то же время дифференциальная диагностика реактивных изменений мезотелия и злокачественных поражений является непременным условием цитологического исследования экссудата. Наиболее часто встречающиеся метастазы злокачественных опухолей по серозным оболочкам у женщин, мужчин и детей представлены в табл. 4.20.

Таблица 4.20

Часто встречающиеся метастазы злокачественных опухолей по серозным оболочкам

Метастазы злокачественных новообразований	Женщины	Мужчины	Дети
Плевральный выпот	Рак молочной железы, яичника, ЖКТ, лёгкого; лимфома, прочие.	Рак лёгкого, ЖКТ; лимфома, прочие.	Лейкозы/лимфома
Выпот в брюшной полости	Рак яичника, молочной железы, ЖКТ; лимфома, прочие.	Рак ЖКТ; лимфома, прочие.	Мелкие круглоклеточные опухоли (нейробластома, нефробластома, рабдомиосаркома, саркома Юинга)

Если нет полной уверенности в характере патологического процесса, могут помочь повторные исследования, поскольку мезотелиальные клетки с выраженными признаками атипии реактивно-воспалительной природы в процессе лечения быстро исчезают, к тому же соотношение различных видов сопутствующих клеток значительно меняется. Большую помощь в определении характера поражения мезотелия способны оказать иммуноцитохимические исследования.

Асцитическая жидкость. Нормальная серозная жидкость брюшной полости прозрачная и светло-желтая, объем менее 50 мл. Асцит – брюшная водянка, водянка живота, значительное скопление свободной жидкости (чаще трансудата) в брюшной полости. Асцит может возникнуть внезапно (например, при тромбозе воротной вены) или развиваться постепенно, в течение нескольких месяцев, сопровождаясь метеоризмом, который вначале может доминировать в клинической картине. Иногда в полости брюшины накапливается от 8 до 30 л асцитической жидкости. При физическом обследовании больного асцит может быть распознан при наличии в полости брюшины не менее 1 л жидкости.

Основными задачами лабораторного анализа асцитической жидкости являются:

- установление доброкачественного или злокачественного характера выпота;
- дифференцировка неинфицированности / инфицированности жидкости.

Асцит при портальной гипертензии, при гепато-целлюлярном раке и метастазах в печень без распространения их по брюшине является трансудатом. Асцит при заболеваниях печени, в случаях панкреатита, перитонеального туберкулёза, и при злокачественных опухолях с метастазами по брюшине является, как правило, результатом экссудата.

Разработаны соответствующие лабораторные критерии для дифференциальной диагностики портального и злокачественного (метастазы по брюшине) типов асцита (табл. 4.21).

Основными лабораторными показателями разделения асцита на экссудат и транссудат при отсутствии злокачественных клеток являются содержание альбумина, уровень холестерина и фибронектина. Для транссудата характерен высокий градиент альбумина между сывороткой и асцитической жидкостью (> 11 г/л), для экссудата наоборот – в асцитической жидкости содержится большое количество альбумина и градиент для альбумина между асцитической жидкостью и сывороткой незначительный (< 11 г/л). Содержание холестерина и фибронектина низкое в транссудате и высокое в экссудате.

Таблица 4.21

Принципы дифференциальной диагностики асцита, обусловленного портальной гипертензией и опухолью с метастазами по брюшине

Лабораторные показатели	Портальный асцит	Злокачественный асцит
Холестерин	$< 1,15$ ммоль/л	$> 1,15$ ммоль/л
РЭА	$< 2,5$ мкг/л	$> 2,5$ мкг/л
Альбумин _{сыворотка} /альбумин _{асцит}	> 11 г/л	< 11 г/л
ЛДГ	> 11 г/л верхней границы нормы для сыворотки	$> 2/3$ верхней границы нормы для сыворотки
Общий белок	< 30 г/л	> 30 г/л
Нейтрофилы (количество)	< 250 мкл	> 250 /мкл
Опухолевые клетки	Отсутствуют (отр.)	Отрицат. при воспалении (бактериальный перитонит, туберкулёзный перитонит (35% случаев с содержанием лейкоцитов/мкл < 250), панкреатит), положит. при перитонеальных метастазах, опухолях ЖКТ, опухолях половых органов, раке лёгкого, раке молочной железы

4.7. Контрольные материалы к главе 4

Контрольные вопросы:

1. Какие клетки присутствуют в мокроте, их клинико-диагностическое значение?
2. Какие неклеточные элементы присутствуют в мокроте, их клинико-диагностическое значение?
3. Охарактеризуйте простейших, которые могут быть этиологическим фактором бронхопневмоний.
4. Какова специфика заболеваний легких и изменений мокроты при микозах?
5. Какая направленность диагностики при исследовании мокроты в нативном препарате, окрашенном по Граму, Цилю-Нильсену?
6. Каково диагностическое значение микроскопии, культуральных и молекулярно-биологических исследований при туберкулезе?
7. Каковы морфологические особенности мокроты при бронхиальной астме?
8. Каковы при анализе кала диагностические признаки поражений разных отделов пищеварительного тракта?
9. Какие заболевания и их признаки выявляются при исследовании дуоденального содержимого?
10. Как выполняется химическое исследование кишечного отделяемого и что оно выявляет?
11. Каковы особенности копрограммы при заболеваниях печени, поджелудочной железы, кишечника?
12. Методические особенности и диагностические возможности определения крови и ее компонентов в кале?
13. Какие патологические процессы диагностируются в разовой порции мочи и в суточной моче?
14. Каково диагностическое значение физических и химических характеристик мочи?
15. Диагностические критерии нефротического синдрома?
16. Каковы типы и особенности протеинурии?
17. Каково диагностическое значение микроальбуминурии?
18. Какие диагностические возможности имеет анализ мочи при сахарном диабете?
19. Какие клеточные элементы присутствуют в моче, их диагностическое значение?
20. Какие неклеточные элементы присутствуют в моче, их диагностическое значение?
21. Лабораторно-диагностические критерии нефрита?
22. Диагностические критерии урогенитальных инфекций у мужчин и женщин?
23. Микроскопическая характеристика патологии влагалища и цервикального канала?
24. Эндокринные признаки бесплодия мужчин и женщин?

25. Морфологические признаки вирусной инфекции, микозов в отделяемом влагалища?
26. Диагностические характеристики физических свойств эякулята?
27. Каковы возможные причины олигооспермии?
28. Каковы основные показатели спермограммы, их диагностическое значение?
29. Каковы лабораторные показатели нарушения мужской фертильности?
30. Диагностическое значение цитоза ликвора.
31. Диагностическое значение биохимических показателей ликвора.
32. Каккие критерии и диагностическое значение экссудата и трансудата серозного выпота?
33. Каково диагностическое значение морфологического исследования выпота?
34. Какие опухолевые маркеры определяются в выпоте, их диагностическое значение?

ТЕСТЫ

Инструкция: Выбрать один правильный ответ

04.01. Типичным признаком мокроты является наличие:

- А) альвеолярных макрофагов
- Б) фибрина
- В) нейтрофилов
- Г) спиралей Куршамана
- Д) эластических волокон

04.02. При крупозной пневмонии в мокроте можно обнаружить :

- А) эпителиоидные клетки
- Б) актиномицеты
- В) слизь с лейкоцитами, эритроцитами и альвеолярными макрофагами
- Г) пробки Дитриха
- Д) казеозный детрит

04.03. Кристаллы гематоидина в мокроте обнаруживают при:

- А) бронхопневмонии
- Б) бронхите
- Г) бронхоэктатической болезни
- В) бронхиальной астме
- Д) гангрене легкого

04.04. В мокроте при бронхиальной астме характерно присутствие :

- А) альвеолярных макрофагов
- Б) обызвествленных эластических волокон
- В) пробок Дитриха
- Г) скоплений эозинофилов
- Д) коралловидных эластических волокон

- 04.05. Основное отличие метаплазии от гиперплазии клеток бронхоальвеолярной системы:
- А) увеличение количества клеточных элементов в препарате
 - Б) появление многоядерных клеток
 - В) появление соединительно-тканых элементов
 - Г) нарушение ядерно-цитоплазматического соотношения
 - Д) увеличение количества апоптозов
- 04.06. Кристаллы холестерина в мокроте обнаруживают при :
- А) бронхите
 - Б) крупозной пневмонии
 - В) бронхиальной астме
 - Г) распаде первичного туберкулезного очага
 - Д) раке
- 04.07. При бронхиальной астме характерно обнаружение в мокроте:
- А) коралловидных эластических волокон
 - Б) альвеолярных макрофагов с жировой инфильтрацией
 - В) спиралей Куршмана
 - Г) лейкоцитов
 - Д) обызвествленных эластических волокон
- 04.08. Окрашенная кровью мокрота характерная для:
- А) новообразований в легких
 - Б) острого респираторного заболевания (ОРЗ)
 - В) бронхиальной астмы
 - Г) пневмонии
 - Д) аскаридоза легких
- 04.09. Слюнные железы выделяют :
- А) мальтазу
 - Б) энтерокиназу
 - В) липазу
 - Г) амилазу
 - Д) пепсин
- 04.10. Непрямой метод диагностики инфицированности слизистой оболочки желудка *Helicobacter pylori*:
- А) гистологический
 - Б) цитологический
 - В) дыхательный
 - Г) бактериологический
 - Д) культуральный
- 04.11. Значительное снижение кислотности желудочного сока характерно для :
- А) язвенной болезни двенадцатиперстной кишки
 - Б) раздраженного желудка
 - В) хронического поверхностного гастрита
 - Г) хронического атрофического гастрита
 - Д) язвенной болезни желудка

04.12. Желтуху гемолитическую от обтурационной на высоте болезни можно дифференцировать с помощью определения :

- А) фракций билирубина
- Б) количества ретикулоцитов
- В) сывороточного железа
- Г) аминотрансфераз
- Д) активности кислой фосфатазы

04.13. Наиболее информативным признаком при первичном скрининге гепатоцеллюлярного рака является:

- А) увеличение уровня α -фетопротеина в сыворотке крови
- Б) гепатомегалия
- В) гепатоспленомегалия
- Г) увеличение уровня АЛТ
- Д) наличие очагового образования в печени

04.14. Жировой гепатоз развивается при :

- А) алкоголизме
- Б) гломерулонефрите
- В) голодании
- Г) гипотиреозе
- Д) вирусном гепатите

04.15. Кислую реакцию кала обуславливает :

- А) быстрая эвакуация пищи по кишечнику
- Б) колит
- В) нарушение расщепления углеводов
- Г) преобладание белковой пищи
- Д) преобладание жиров

04.16. Ренальные протеинурии обусловлены :

- А) нарушением фильтрации и реабсорбции белков
- Б) диспротеинемией
- В) попаданием экссудата при воспалении мочеточников
- Г) почечными камнями
- Д) гипофункцией ренин-ангиотензиновой системы

04.17. Пострэнальная протеинурия обусловлена :

- А) прохождением через неповрежденный почечный фильтр белков низкой молекулярной массы
- Б) фильтрацией нормальных плазменных белков через поврежденный почечный фильтр
- В) нарушением реабсорбции белка в проксимальных канальцах
- Г) попаданием воспалительного экссудата в мочу при заболевании мочевыводящих путей
- Д) образованием белка Бенс-Джонса

04.18. Отсутствие уробилина в моче указывает на :

- А) гемолитическую желтуху
- Б) обтурационную желтуху
- В) паренхиматозную желтуху в период продрома
- Г) болезнь Жильбера

Д) дисбактериоз кишечника

04.19. В моче больных острым гломерулонефритом наблюдается :

- А) лейкоцитурия
- Б) переходный эпителий
- В) много солей мочевой кислоты
- Г) глюкозурия
- Д) гематурия

04.20. Определение клиренса эндогенного креатинина применимо для :

- А) оценки секреторной функции канальцев почек
- Б) определения концентрирующей функции почек
- В) оценки количества функционирующих нефронов
- Г) определения величины почечной фильтрации
- Д) диагностики цистита

04.21. Ранним признаком диабетической нефропатии является :

- А) глюкозурия
- Б) нарушение глюкозо-толерантного теста
- В) гипергликемия
- Г) микроальбуминурия
- Д) протеинурия

04.22. Изменение морфологии сперматозоидов обозначают термином :

- А) некрозооспермия
- Б) астенозооспермия
- В) полиспермия
- Г) олигоспермия
- Д) тератозооспермия

04.23. Пиоспермия означает наличие в эякуляте :

- А) большого количества эритроцитов
- Б) большого количества нейтрофилов
- В) кристаллов спермина
- Г) макрофагов
- Д) большого количества лимфоцитов

04.24. При раке предстательной железы преимущественно повышается сывороточная активность :

- А) альфа-амилазы
- Б) креатинкиназы
- В) щелочной фосфатазы
- Г) кислой фосфатазы
- Д) АЛТ

04.25. Причиной увеличения белка в ликворе является:

- А) экссудация при воспалении менингеальных оболочек
- Б) формирование глиальной опухоли
- В) расширение ликворных пространств
- Г) формирование фибринозной пленки
- Д) аутоиммунная нейропатия

04.26. Нарушение гематоэнцефалического барьера ведет к:

- А) снижению холестерина в ликворе
- Б) увеличению абсолютной концентрации альбумина в ликворе и увеличению отношения концентрации альбумина ликвора/альбумина сыворотки
- В) появлению глиальных элементов в сыворотке
- Г) снижению образования ликвора
- Д) снижению плотности ликвора

04.27. Уровень глюкозы в ликворе снижается при :

- А) опухолях мозга
- Б) травмах мозга
- В) менингитах
- Г) гемморагических инсультах
- Д) ишемических инсультах

04.28. Проба Ривальда предназначена для:

- А) выявления гликогена
- Б) обнаружения молекул средней массы
- В) установления происхождения выпотной жидкости -транссудат или экссудат
- Г) выявления клеток в выпотной жидкости
- Д) определения гемоглобина в выпотной жидкости

Ответы

04.01	04.02	04.03	04.04	04.05	04.06	04.07	04.08	04.09	04.10
А	В	Д	Г	Г	Г	В	А	Г	В

04.11	04.12	04.13	04.14	04.15	04.16	04.17	04.18	04.19	04.20
Г	А	А	А	В	А	Г	Б	Д	Г

04.21	04.22	04.23	04.24	04.25	04.26	04.27	04.28
Г	Д	Б	Г	А	Б	В	В

ГЛАВА 5. БИОХИМИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

5.1. Биохимия и патобиохимия белков и аминокислот

5.1.2. Функции белков

Белки присутствуют во всех жидкостях организма. Практически все физиологические и патофизиологические реакции в организме происходят при непосредственном участии белков.

С клинической и патобиохимической точки зрения удобно разделять белки по их функции (табл.5.1).

Таблица 5.1

Белки плазмы крови

Функциональные группы белков	Пример
Транспортные белки	Альбумин, трансферрин, тироксин-связывающий белок, секс-связывающий глобулин, витамин D-связывающий белок, ретинол-связывающий белок, церолоплазмин
Белки острой фазы	С-реактивный белок, фибриноген, амилоидный белок сыворотки крови А, гаптоглобин
Белки системы комплемента	С3, С4
Факторы свертывания	Протромбин, фактор VIII, фибриноген
Ферменты	Амилаза, липаза, аминотрансферазы
Ингибиторы протеиназ	α 1-Антитрипсин, α 2-макроглобулин
Белковые гормоны	Инсулин, глюкагон, вазопрессин
Иммуноглобулины	IgG, IgM, IgA
Белки, поддерживающие онкотическое давление	Все белки, особенно альбумин
Белки, поддерживающие буферную емкость плазмы	Все белки

Клиническое значение определения индивидуальных белков плазмы крови связано с тем, что большое количество заболеваний, как врожденных, так и приобретенных, сопровождается изменениями в составе спектра белков плазмы. Анализ количественных и качественных изменений белков плазмы используют для диагностики, мониторинга и прогноза заболеваний. Примеры качественных изменений белков, используемых для диагностики: обнаружение в плазме крови миоглобина при остром инфаркте миокарда или эмбриональных (α -фетопротеин) белков при опухолях. Наиболее яркий пример количественных изменений – острофазный ответ при воспалении. Чаще всего в целях диагностики, мониторинга и прогноза заболеваний проводят определение содержания белков в плазме или сыворотке крови.

Материалом для исследования может также являться моча, ликвор, выпотные жидкости, в редких случаях – слюна, сперма, дуоденальное содержимое и др.

Транспортные белки. Основным транспортным белком является альбумин. Альбумин обеспечивает перенос в плазме жидких кислот, билирубина и других гидрофобных соединений. Транспорт в связанном виде с альбумином практически неспецифичный. Альбумин связывает билирубин, в результате билирубин не фильтруется в клубочках почек и не вызывает токсического эффекта за счет проникновения в липидные слои клеточных мембран. Соединенный с альбумином билирубин обозначается как неконъюгированный (непрямой), его концентрация возрастает при внутрисосудистом гемолизе. В то же время при измерении сначала проводят диссоциацию неконъюгированного билирубина от альбумина обработкой детергентом, а затем уже ставят реакцию азосочетания. Альбумин связывает до половины ионов Са в сыворотке, удаляя его из активного метаболизма. В результате возможно измерение общего Са и ионизированного Са²⁺. Разница в концентрации значительная и меняется в зависимости от содержания белка в сыворотке.

Специфические транспортные белки, такие как трансферрин, тироксин-связывающий белок, секс-связывающий глобулин, как правило, функционируют по принципу антиген-антитело и обеспечивают защиту связанных лигандов. До 99,99% тироксина связано с транспортными белками, в результате тироксин циркулирует в плазме до 7 дней, а активной молекулой является свободная молекула – свободный Т4. В системе свертывания фактор Виллебранда несет на себе фактор VIII. При болезни Виллебранда, при которой отсутствует фактор Виллебранда, клинические проявления схожи с гемофилией А, так как незащищенный фактор VIII быстро разрушается протеолитическими системами крови. В клинических исследованиях причиной ряда патологий может быть нарушение в системе транспортных белков, особенно при заболеваниях печени, так как гепатоциты являются основным местом синтеза транспортных белков.

Структурные белки. Белки, белковые комплексы с липидами (липопротеиды) и углеводами (гликопротеиды) являются основой структуры всех клеточных мембран. Они обеспечивают не только барьерную функцию, но и перенос веществ через клеточные мембраны внутрь клетки, выделение производных клеточного метаболизма из клеток, формирование специфических каналов для ионов и некоторых метаболитов, формирование рецепторных полей, обеспечивают состояние микровязкости мембран. Появление в системе циркуляции мембранных белков используется в лабораторной диагностике для идентификации интенсивности и локализации патологического процесса. Например, самым ранним маркером инфаркта миокарда является увеличение концентрации в сыворотке сердечного белка, связывающего жирные кислоты. Этот белок входит в состав мембраны кардиомиоцитов, при ишемическом повреждении высвобождается из разрушающихся мембран и является маркером некроза кардиомиоцитов.

Белки и пептиды как биологически активные вещества. Белковыми гормонами являются тропные гормоны гипофиза (СТГ, АКТГ, ТТГ, ХГЧ, ФСГ, ЛГ), пролактин, инсулин, глюкагон, вазопрессин и другие. Белковые гормоны высокоспецифичны и обеспечивают регулируемый гормональный контроль. В лабораторных исследованиях определение гормонов – один из самых эффективных подходов к диагностике заболеваний. Например, тестирование на врожденный гипотиреоз в рамках Федеральной программы проводится у всех новорожденных по всей стране. Увеличение концентрации ТТГ является сигналом для исследования уровня тиреоидных гормонов, значительное повышение ТТГ в крови новорожденных – достаточное основание для немедленного назначения заместительной терапии с целью предупреждения кретинизма.

Пептидами обычно называют белки, имеющие в составе менее 50 аминокислотных остатков. Эндогенными пептидными медиаторами межклеточного взаимодействия выступают в организме цитокины. Они участвуют в регуляции эмбрионального развития, некоторых

физиологических функций организма, развитии опухолей, формировании аллергических, аутоиммунных и иных иммунопатологических процессов, в восстановлении поврежденных тканей. В табл. 5.2 представлены отличительные признаки гормонов и цитокинов.

Таблица 5.2

Отличительные признаки гормонов и цитокинов

Характеристика	Гормоны	Цитокины
Клетки-продуценты	Специализированные	Различные типы клеток
Эффекты	Характерные для каждого гормона	Структурно различные цитокины обладают сходными биологическим эффектами
Клетки-мишени	Строго определенные	Для одного цитокина различные типы клеток
Радиус действия	Большой (эндокринный тип действия)	Короткий (аутокринный или паракринный тип действия)

Изучение системы цитокинов проводится в зависимости от конкретных задач в основном иммунохимическими и молекулярно-биологическими методами и включает следующие основные подходы:

- Определение концентрации цитокинов в биологических жидкостях.
- Изучение синтеза цитокинов в тканях, на уровне отдельных клеток.
- Анализ полиморфизма генов цитокинов.
- Изучение экспрессии генов цитокинов.

Иммунные свойства белка. Белки вовлечены в систему взаимодействия антиген-антитело, которая является основой обмена белков, их свойств, функциональных и патологических изменений. Иммуногенность – потенциальная способность вызывать иммунный ответ, появляется у белков, как высокомолекулярных соединений, с появлением α -спиральной структуры. На степень иммуногенности вещества влияют следующие факторы:

- Природа антигена. Высокой иммуногенностью обладают белки и углеводы. Нуклеиновые кислоты, липиды и другие органические вещества

слабоиммуногенны и могут выступать в роли эффективных антигенов только в составе комплексных соединений.

- Размер молекулы вещества. С повышением молекулярной массы растёт иммуногенность. Молекулярная масса антигена влияет не только на формирование определённой вторичной структуры белка, но и на количество эпитопов и их разнообразие, что повышает валентность антигена и также влияет на степень его иммуногенности.
- Жёсткость структуры молекулы антигена, то есть способность сохранять определённую конфигурацию, увеличивает иммуногенность.
- Принадлежность антигенов к классам полимеров, свойственным высшим животным, увеличивает их иммуногенность.

5.1.3. Особенности метаболизма отдельных аминокислот

Образование и обезвреживание аммиака. Самое большое количество аммиака образуется в кишечнике под воздействием бактерий. Азотистые соединения, такие как аминокислоты, мочевая кислота, мочевины в присутствии бактериальных ферментов (протеазы, уреазы, аминокислотоксидазы) метаболизируются до аммиака. Аммиак образуется также в клетках слизистой оболочки кишечника из глутамина. Реакция катализируется ферментом глутаминазой. Этот же фермент участвует в образовании аммиака в митохондриях почки. Метаболизм аммиака до мочевины происходит в печени в ходе орнитинового цикла. Выводимый с мочой аммиак образуется в клетках почечных канальцев из глутамина в ходе реакции, катализируемой глутаминазой (около 60%), а также в результате дезаминирования других аминокислот в почке. Хранение мочи приводит к росту концентрации аммиака в результате бактериального разложения мочевины.

Референтные значения содержания аммиака в сыворотке крови:

- Новорожденные 64-107 мкмоль азота/л, (90-150 мкг N/дл), младенцы 21-50 мкмоль N/л (29-70 мкг N/дл), взрослые 15-45 мкмоль N/л (11-32 мкг N/дл);

Увеличение концентрации:

- острая печеночная недостаточность: (некротическая, токсическая, вирусная, синдром Рея);

- жировая дистрофия печени;

- острая почечная недостаточность;

- кишечный дисбактериоз; №

- наследственные энзимопатии в орнитиновом цикле.

Референтные значения содержания аммиака в моче:

- 20-25 ммоль азота/сутки;

- *Физиологическое увеличение выделения:*рацион питания, богатый мясом, пища с низким содержанием углеводов, голодание (катаболизм белка организма);

- Увеличение выделения;

- Метаболический ацидоз (понос, обезвоживание, сахарный диабет, голодание);

- Дыхательный ацидоз

- Недостаток кали;

- Недостаток натрия

- Синдром Франкони

- Первичный гиперальдостеронизм

Образование мочевины. Мочевина – синтезируемый в печени конечный продукт детоксикации эндогенного аммиака, образующегося при распаде белков и других азотсодержащих соединений. Около 90% мочевины выводится с мочой; мочевина фильтруется в клубочках, частично пассивно реабсорбируется и секретруется в канальцах. Концентрация мочевины в сыворотке крови отражает соотношение скорости её образования и

выведения с мочой. Скорость синтеза мочевины возрастает при потреблении обогащенной белком пищи, усиленном эндогенном катаболизме в условиях голодания или повреждения тканей. Существенное возрастание концентрации мочевины ведёт к увеличению осмолярности плазмы крови, что может влиять на гидратацию клеток.

Исследование экскреции мочевины с мочой используется для оценки баланса между процессами синтеза и распада белков в организме – азотистого баланса. Отрицательный азотистый баланс проявляется задержкой роста детей, снижением массы тела, скорости заживления ран, нарушениями, обусловленными снижением скорости пролиферации клеток быстро обновляемых тканей и синтеза короткоживущих белков (гипоальбуминемия, анемия, мальабсорбция, интеркуррентные инфекции в связи с недостаточностью иммунной системы).

Референтные значения содержания мочевины в сыворотке крови: дети <14 лет 1,8-6,4 ммоль/л взрослые 2,5-6,4 ммоль/л, пожилые 2,9-7,5 ммоль/л

Увеличение концентрации:

- острые или хронические заболевания почек, обтурация мочевых путей;
- снижение почечной перфузии (застойная сердечная недостаточность, шок);
- изоосмотическая дегидратация при рвоте, поносе, повышенном диурезе или потоотделении;
- увеличение синтеза мочевины при повышенном катаболизме белка (желудочно-кишечное кровотечение, ожоги, инфекции, послеоперационное состояние и др.).

Уменьшение концентрации:

- повышенная скорость клубочковой фильтрации, обусловленная беременностью, неадекватной секрецией антидиуретического гормона;

- снижение синтеза мочевины при функциональной недостаточности печени (печёночная кома, гепатит, цирроз, острая гепатодистрофия, отравление мышьяком);

- мальабсорбция и/или недостаточность белка в рационе (в связи со снижением продукции аммиака и, соответственно, синтеза мочевины)

Образование креатинина. Креатинин – конечный продукт неферментативного распада креатинфосфата и креатина, участвующих в энергообеспечении мышечного сокращения. На уровень креатинина сыворотки влияет скорость его продукции в мышцах (мышечная масса). Повышение креатинина в сыворотке показательно при заболеваниях скелетных мышц. Креатинин выводится из крови почками путём фильтрации. Увеличение концентрации креатинина в сыворотке крови отражает снижение скорости клубочковой фильтрации. Креатинин не является чувствительным показателем нарушений фильтрационной способности почек в ранних стадиях, может оставаться в референтных пределах при поражении значительной части нефронов. Для оценки скорости клубочковой фильтрации полезен расчёт по клиренсу эндогенного креатинина.

Референтные значения креатинина в сыворотке крови: дети 1-14 лет 27-62 мкмоль/л, женщины 50-100 мкмоль/л, мужчины 60-115 мкмоль/л

Увеличение концентрации креатинина в сыворотке наблюдается при:

- снижении клубочковой фильтрации при дисфункции почек любой этиологии (снижение почечной перфузии, заболевания почек, обтурация мочевых путей);

- эндокринных нарушениях, сопровождающихся изменением метаболизма скелетных мышц (акромегалия и гигантизм, гипертиреоз);

- некрозе скелетных мышц, воспалительных и метаболических заболеваниях с вовлечением мышц;

- голодании со снижением мышечной массы.

Клиническое значение определения креатинина и мочевины.

Клиренс креатинина. Существенное увеличение содержания мочевины в сыворотке крови, как правило, указывает на нарушение функции почек. Это заключение почти однозначно при содержании мочевины в плазме крови, превышающем 15ммоль/л. Вероятность нарушения функций почек возрастает, если при соответствующих данных анамнеза выявлены отклонения в общем анализе мочи (обнаружение белка, цилиндров, клеток крови), диурезе и/или повышенном уровне креатинина.

Коецентрация креатинина медленнее, чем мочевины, меняется у больных с почечной недостаточностью. Именно поэтому этот тест обычно используют одновременно с определением мочевины, её сывороточная концентрация более чувствительна к изменениям функции почек. Креатинин поступает в мочу путём фильтрации, он относится к беспороговым веществам, которые не реабсорбируются и не секретируются в канальцах. Увеличение концентрации креатинина в сыворотке крови отражает снижение скорости клубочковой фильтрации. В свою очередь, для оценки скорости клубочковой фильтрации (СКФ) определяют клиренс эндогенного креатинина. Количество креатинина, выводимого с мочой за определённое время, равно количеству креатинина, поступившего в первичную мочу. Измерив концентрацию креатинина в сыворотке крови и моче, а также объём мочи, выделяемой за определённое время (обычно сутки), можно рассчитать клиренс креатинина по формуле:

$$\text{Клиренс креатинина, мл / мин} = \frac{\text{концентрация креатинина в моче} \times \text{диурез, мл}}{\text{концентрация в сыворотке} \times \text{время сбора мочи, мин}}$$

Фильтрация в почках зависит от роста и массы тела, поэтому клиренс креатинина рассчитывают на стандартную среднюю поверхность тела, равную 1,73 м². Для этого в направлении на исследование кроме объёма мочи, собранной за сутки, указывают рост и массу тела.

Референтные пределы клиренса креатинина представлены в табл. 5.3.

Таблица 5.3

Референтные пределы клиренса креатинина

Возраст, годы	мл/мин/1,73м ²	
	Мужской пол	Женский пол
<1	65–100	65–100
1–30	88–146	81–134
30–40	82–140	75–128
40–50	75–133	69–122
50–60	68–126	64–116
60–70	61–120	58–110
>70	55–113	52–105

Увеличение клиренса креатинина:

- начальный период сахарного диабета;
- гипертоническая болезнь;
- нефротический синдром.

Уменьшение:

- до 30 мл/мин/1,73м² – умеренное снижение функции почек (самостоятельного значения не имеет);
- от 30 до 15 мл/мин/1,73м² – почечная недостаточность компенсированная, субкомпенсированная;
- менее 15 мл/мин/1,73м² – декомпенсированная почечная недостаточность.

При выраженной почечной недостаточности СКФ, оценённая пробой Реберга, может быть завышена (при значительно повышенном уровне креатинина плазмы крови он может поступать в мочу путём секреции в почечных канальцах). В этой ситуации сывороточный уровень креатинина может быть более чувствительным индикатором изменения функции клубочков.

Образование мочевой кислоты. Гиперурикемия при подагре. Мочевая кислота – низкомолекулярное азотсодержащее вещество, конечный продукт распада пуриновых азотистых оснований – аденина и гуанина, входящих в состав свободных нуклеотидов и нуклеиновых кислот. Мочевая кислота выводится из организма с мочой. Повышенному образованию мочевой

кислоты способствуют врожденная недостаточность участвующих в обмене пуринов ферментов, усиленный катаболизм нуклеиновых кислот при массивном разрушении тканей, повышенном потреблении животной пищи богатой пуринами. При повышенном образовании мочевой кислоты в тканях и связанном с этим увеличением её концентрации в плазме крови могут образовываться кристаллы натриевых солей мочевой кислоты – уратов, что лежит в основе патогенеза подагры. Клинические проявления подагры (артриты, мочекаменная болезнь, уратная нефропатия) обусловлены отложением кристаллов уратов в суставной жидкости, окружающих суставы тканях, в паренхиме или в канальцах почек. Риск подагры нарастает по мере увеличения гиперурикемии, но клинические проявления подагры не всегда тесно коррелируют с её уровнем. Гиперурикемия ассоциируется с метаболическим синдромом.

Референтные значения содержания мочевой кислоты в сыворотке:
мужчины 210-420 мкмоль/л, женщины 150-350 мкмоль/л

Увеличение концентрации:

- подагра;
- токсикозы беременных;
- псориаз;
- синдром Дауна;
- поликистоз почек, свинцовая нефропатия, почечная недостаточность.

Нарушения обмена отдельных аминокислот. Фенилаланин – незаменимая аминокислота. Генетически обусловленное нарушение обмена фенилаланина – фенилкетонурия (пировиноградная олигофрения), является одной из наиболее распространенных ферментопатий (1:10000). При этой патологии недостаточность фермента фенилаланингидроксилазы, которая катализирует превращение фенилаланина в тирозин, ведет к накоплению фенилаланина в крови и усилению экскреции с мочой продуктов дезаминирования аланина – фенилпировиноградной кислоты (фенилкетона). Наиболее тяжелые проявления фенилкетонурии – нарушения умственного и

физического развития. В России и других странах проводится скрининг новорожденных на фенилкетонурию.

Референтные пределы:

	Фенилаланин, мкмоль/л
Новорожденные, доношенные с нормальным весом	73-206
Новорожденные с низким весом или недоношенные	121-454
Новорожденные с фенилкетонурией, 2-3 сутки после рождения	> 272
Новорожденные с фенилкетонурией, 10 суток после рождения	907-1815
Взрослые	48-109

Увеличение концентрации:

- фенилкетонурия
- транзиторная гиперфенилаланинемия новорожденных (обусловлена задержкой постнатального становления биосинтеза фенилаланин-гидроксилазы);
- сепсис;
- тяжелые ожоги;
- печеночная энцефалопатия.

Цистин – алифатическая серусодержащая аминокислота, представляющая собой продукт окислительной димеризации цистеина. В организме находится в основном в составе белков. Аминокислота плохо растворима, при накоплении образуются бесцветные кристаллы.

Цистиноз – аутосомно-рецессивная болезнь лизосомального накопления цистина, обусловленная нарушением белка цистинозина, обеспечивающего транспорт цистина из лизосом. Возможно, также имеется энзиматический блок на пути его превращения, результатом которого является накопление цистиновых кристаллов в лизосомах. Частота – 1:100000. Происходит отложение цистиновых кристаллов в ретикулярных клетках костного мозга, в клетках печени, почек, селезенки, слизистой оболочки прямой кишки, в лимфатических узлах и лейкоцитах, в клетках роговицы и конъюнктивы, в островковых клетках поджелудочной железы, аорте, атрофических яичниках и мозге. Первыми симптомами являются

полиурия, полидипсия, лихорадка неизвестного происхождения. При исследовании мочи выявляется щелочной рН, глюкозурия и протеинурия, что свидетельствует о синдроме нарушения функции почечных канальцев – синдроме Фанкони. Если больного не лечить, то наблюдается ранняя терминальная почечная недостаточность, тиреоидная недостаточность и мультиорганная дисфункция. Введение цистеамина, который способен связывать сульфгидрильные группы и комбинироваться с молекулой цистина, облегчает выход цистина из лизосом и значительно облегчает течение заболевания. Постоянное применение цистеамина замедляет повреждение почек и других органов.

Цистинурия – довольно распространенное наследственное заболевание. Метаболический дефект выражается в выделении с мочой в 50 раз больше нормы количества четырех аминокислот: цистина, лизина, аргинина и орнитина. Уровень цистина в крови обычно не выше нормальных величин. Люди, страдающие цистинурией, вполне здоровы, за исключением тенденции к образованию в организме камней. Нарушений в промежуточном обмене аминокислот при этом не выявлено.

Алкаптонурия – аутосомно-рецессивная энзимопатия. В основе заболевания лежит снижение активности печеночного фермента гомогентизат-оксидазы, в результате в организме накапливается гомогентизиновая кислота. Гомогентизат окисляется и полимеризуется в меланиноподобное соединение, поэтому наиболее частым симптомом является **темная моча**. В детском возрасте болезнь не проявляется, кроме как темно-коричневых пятен на пеленке и нижнем белье остаются. С возрастом гомогентизиновая кислота накапливается в соединительной ткани, препятствуя синтезу **коллагена**, что делает хрупкими хрящевые образования. К пожилому возрасту наступает **дегенеративный артроз** позвоночника и крупных суставов, межпозвонковые пространства сужены.

Гомоцистеин – непротеиногенная аминокислота, образующаяся во многих тканях в процессе деметилирования аминокислоты метионин.

Некоторое количество гомоцистеина необратимо превращается в цистеин, однако, большая его часть вновь превращается в метионин при участии ферментов, коферментами которых являются производные витаминов В₆, В₉ (фолиевая кислота), В₁₂. Нарушения превращений гомоцистеина вследствие генетически обусловленных или приобретенных дефектов ферментов его обмена, а также при дефиците указанных витаминов ведут к его накоплению в клетках и, вследствие этого, в плазме крови. Гипергомоцистеинемия ассоциируется с развитием дисфункции и повреждения эндотелия, что обусловлено цитотоксическим эффектом гомоцистеина. Гипергомоцистеинемия является независимым фактором риска сердечно-сосудистых заболеваний: повышение уровня гомоцистеина плазмы крови на 5 мкмоль/л увеличивает риск атеросклеротического поражения сосудов на 80% у женщин и на 60% у мужчин, общий риск смерти в 1,3-1,7 раза.

Референтные значения: мужчины 6,3-5,0 мкмоль/л, женщины 4,6-12,5 мкмоль/л.

5.1.4. Белки плазмы крови

Состав и функции белков плазмы крови. Количественный и качественный состав белков в крови отражает состояние белкового обмена в целом, при этом белки плазмы наиболее широко используются для диагностических целей. Изменения концентрации индивидуальных белков имеют место при многих как физиологических, так и патологических состояниях. Большинство белков плазмы представлены гликопротеинами, обычно с содержанием углеводов от 10 до 25%. Физиологическая функция белков плазмы состоит в поддержании коллоидно-осмотического давления, буферной емкости плазмы, осуществлении транспорта и, в некоторых случаях, депонировании (хранении) молекул липидов, продуктов метаболизма, гормонов, лекарственных веществ и микроэлементов. Белки плазмы выполняют ферментативную функцию. Иммуноглобулины осуществляют гуморальный иммунитет. Компоненты комплемента и СРБ

важны для неспецифического иммунитета, особенно в случае бактериальной инфекции. Равновесие между факторами и ингибиторами свертывания обеспечивает жидкое состояние крови в норме и быстрое свертывание при повреждении. Апо-белки липопротеидов обеспечивают перенос нерастворимых в водной фазе липидов в крови.

Общий белок. Под определением «общий белок» понимается большое количество белков плазмы крови, различающихся между собой по структуре, физико-химическим свойствам, функции. Концентрация белка в плазме зависит от скорости синтеза, скорости удаления и объема распределения. Альбумины, α -глобулины и часть β -глобулинов синтезируются в печени, γ -глобулины и часть β -глобулинов – в клетках лимфоидной ткани. Концентрация общего белка в плазме может быстро меняться: через 30 мин в положении стоя после длительного лежания она может увеличиться на 10-20 %, после венопункции может измениться в течение нескольких минут. В обоих случаях это связано с перераспределением жидкости между внутрисосудистым пространством и интерстицием. Факторы, влияющие на концентрацию белков в плазме, представлены в табл. 5.4.

Таблица 5.4

Факторы, влияющие на концентрацию белков плазмы крови

Физиологические факторы		
Возраст	Недоношенные Новорожденные Дети 1–2 года Дети 2–14 лет Взрослые	36-60 г/л 44-70 г/л 56-75 г/л 60-80 г/л 65 – 85 г/л
Пол	Мужские и женские половые гормоны влияют на концентрацию многих белков: α -фетопротеин, ферритин, IgM	
Лекарства	Влияние оказывают оральные контрацептивы, тестостерон, фенотиазины, эстрогены	
Физическая нагрузка	Активная физическая работа повышает концентрацию белка до 10 %	
Генетические факторы	Имеют значение фенотипы, связанные с расовыми различиями, наследственный дефицит отдельных белков	
Питание	Влияет на комплемент, преальбумин, ретинол-связывающий белок	
Беременность	Влияет на транспортные белки, существенно возрастает содержание α -фетопротеина	

Окружающая среда	У жителей тропиков уровень иммуноглобулинов выше, чем в зоне с холодным климатом
Патологические факторы	
Потери	Патологические потери через поврежденный орган, например, при нефротическом синдроме, клубочковой и канальцевой протеинурии, потери через кишечник
Синтез	Синтез белков плазмы нарушается при заболеваниях печени, возможна фенотипическая недостаточность
Изменение объема циркулирующей крови	Происходит в результате гипер-, гипогидратации или перераспределения между водными пространствами организма
Катаболизм	Усиливается при воспалении
Скорость утилизации	Меняется при воспалении, заболеваниях почек
Компенсаторные механизмы	Возрастание количества высокомолекулярных белков при нефротическом синдроме
Методические факторы	
Хранение	Стабильность аналитов в крови и в сыворотке разная, связана в первую очередь с активностью протеолитических ферментов
Метод исследования	Общая погрешность и аналитическую вариация, допустимые для приемлемости лабораторных показателей различны у разных методов, они должны учитываться при интерпретации результатов лабораторных исследований.
Способ получения крови	Жгут, наложенный до венепункции, и «работа рукой» через несколько минут повышают концентрацию белка в сыворотке
Сыворотка/плазма	В плазме крови содержание общего белка больше примерно на 2,5 г/л, чем в сыворотке из-за присутствия фибриногена

Как таковые только существенные изменения уровня альбумина и иммуноглобулинов оказывают значительный эффект на концентрацию общего белка в сыворотке. За исключением массивных кровотечений или внутривенного введения белков быстрое увеличение общего белка всегда связано со снижением объема распределения, быстрое снижение - с увеличением объема плазмы. Для анализа этой ситуации следует учитывать показатель гематокрита. Концентрация общего белка в плазме также быстро снижается при увеличении проницаемости капилляров из-за быстрого перехода его в интерстициальное пространство. Это может быть у больных с сепсисом или генерализованным воспалением. Причины увеличения и снижения общего белка в сыворотке представлены в табл. 5.5.

Таблица 5.5

Диагностическое значение изменений общего белка плазмы крови

Повышение концентрации	Снижение концентрации
-------------------------------	------------------------------

Дегидратация недостаточное питье избыточные потери воды при потоотделении, профузных поносах, болезни Аддисона, диабетическом кетоацидозе Увеличение одного или нескольких специфических белков острые и хронические инфекции аутоиммунные болезни парапротеинемические гемобластомы миеломная болезнь болезнь Вальденстрема болезнь тяжелых цепей лимфогранулематоз саркоидоз активный хронический гепатит цирроз печени без выраженной печеночноклеточной недостаточности	Пониженный синтез белка недостаток белка в пище, голодание мальабсорбция, энтериты, панкреатиты болезни печени (цирроз, атрофия и др.) длительное лечение кортикостероидами Увеличенные потери белка гломерулонефрит и др. патология почек сахарный диабет асцит, экссудаты и трансудаты ожоги кровотечения Повышенный распад белка тиреотоксикоз длительная физическая нагрузка длительная лихорадка травмы опухоли Гипергидратация
---	---

Альбумин. На долю альбумина приходится 55-60% белка сыворотки крови. Молекулярная масса альбумина около 70000 Да, он не содержит углеводного компонента, гетерогенен из-за наличия агрегированных с ним молекул. Основные функции альбумина: транспорт, поддержание постоянства коллоидно-осмотического давления и обеспечение клеток аминокислотами. Он вносит доминирующий вклад (80%) в онкотическое давление плазмы, поэтому при гипоальбуминемии из-за снижения онкотического давления плазмы жидкость не возвращается в кровяное русло из интерстиция. По такому механизму возникают, в частности, голодные отеки. Время полужизни альбумина в плазме 15-20 дней, в организме содержится 310-330г альбумина, из которых около 40% присутствует в кровяном русле. В острых ситуациях, в частности при остром гепатите, уменьшение количества альбумина в сыворотке крови связано с перераспределением жидкости, а не со снижением его синтеза. При хроническом гепатите гипоальбуминемия может быть результатом, как уменьшения синтеза, так и увеличения объема распределения из-за задержки жидкости в организме или возникновения асцита. Альбумин обладает высокой емкостью, но низким сродством при транспорте многих веществ

кровью. Велика роль альбумина в переносе гормонов щитовидной железы, Са, других катионов, билирубина, жирных кислот, лекарственных препаратов. Билирубин, соединенный с альбумином, теряет токсичность, приобретает свойства растворимого в воде соединения. При гипоальбуминемии содержание растворимой фракции билирубина уменьшается. Динамическое равновесие между ионизированным и связанным кальцием определяется уровнем альбумина в плазме. Альбумин пиноцитозом потребляется клетками, где деградирует до аминокислот, которые используются для синтеза клеточных белков.

Некоторые лекарственные препараты влияют на свойства альбумина: клофибрат уменьшает сродство альбумина и жирных кислот, тем самым снижается доставка жирных кислот в печень для синтеза липопротеидов. При гипоальбуминемии из-за снижения связывания лекарственных препаратов действующая их концентрация увеличивается, поэтому введение препаратов по обычной схеме может привести к интоксикации. Возможные причины гипоальбуминемии представлены в табл. 5.6.

Таблица 5.6

Альбумин плазмы крови – клинико-диагностическое значение

Функция	Концентрация альбумина		
	Норма	Повышенная	Сниженная
Связывание и транспорт катионов (Cu,Zn,Ca), малых и больших анионов, билирубина, жирных кислот, витамина С, лекарств, гормонов щитовидной железы. Поддерживает онкотическое (коллоид-осмотическое) давление. Резерв белка (аминокислот)	37-53 г/л	Острое обезвоживание Прием анаболических стероидов	<i>Пониженный синтез:</i> цирроз печени, недоедание, синдром мальабсорбции, анальбуминемия. <i>Повышенный катаболизм:</i> травма, инфекция, сепсис, лихорадка, опухоли, гипоксия, синдром Кушинга, гипертиреоз, гиперкортицизм. <i>Аномальные потери:</i> шок, кровотечение, энтероколиты, нефротический синдром. <i>Патологическое распределение:</i> после операционного вмешательства, при ожогах, токсикозе, асците, плеврите.

Известно более 20 генетических вариантов альбумина, что никак не связано со склонностью к заболеваниям. В клинической практике гипоальбуминемия чаще всего является следствием потери альбумина при нефротическом синдроме, гастроэнтерите, активации катаболизма. При ожоговой болезни гипоальбуминемия – следствие потери жидкости, изменения сосудистой проницаемости, угнетения синтеза. Выраженная гипоальбуминемия наблюдается при портальном циррозе и жировой дистрофии печени, амилоидозе, кахексии, тяжелых инфекциях, панкреатите, коллагенозах.

Гиперальбуминемия может быть либо артефактом (в частности, при взятии венозной крови в момент стаза), либо результатом чрезмерного внутривенного введения альбумина при инфузиях, либо связана с дегидратацией. При некоторых патологических состояниях синтез альбумина может быть увеличен, однако это, как правило, не приводит к гиперальбуминемии.

Гипопротеинемия, гиперпротеинемия, диспротеинемия, парапротеинемия. Причины развития. Гипопротеинемия – уменьшение концентрации белков в крови. Абсолютная гипопротеинемия возникает после увеличения выделения почками альбумина при их патологии или в результате нарушения синтеза. Гипоальбуминемия, как правило, основная причина гипопротеинемии. Недостаточный синтез альбумина в печени может быть связан с уменьшенным поступлением аминокислот или с повреждением гепатоцитов. Нарушение всасывания в кишечнике (синдром мальабсорбции) может быть результатом бактериальной или паразитарной (лямблиоз) инфекции, муковисцедоза, колита, дисахаридазной недостаточности, энтеропатии с потерей белков или демпинг-синдрома. Поражение гепатоцитов может быть при циррозе, токсикозе, атрофии, метастазировании или первичном раке печени. Относительная гипопротеинемия возникает, например, в результате избыточной инфузионной терапии или значительного уменьшения выделения мочи (олигурия, анурия).

Потеря белка возникает при:

- нефротическом синдроме при гломерулонефрите (80 %), диабете, системной красной волчанке и других аутоиммунных заболеваниях, амилоидозе, тромбозе почечных вен;
- энтеропатии в результате заболеваний желудка или кишечника, колита, полипов;
- поражениях кожи: ожоги, дерматоз;
- экссудатах и транссудатах: перитонит, плеврит, асцит;
- усиленном катаболизме: сепсис, лихорадки, злокачественные опухоли.

Гиперпротеинемия – повышение концентрации общего белка в крови. Может быть две основных причины повышения общего белка в сыворотке: уменьшение объема плазмы при дегидратации и повышение в плазме содержания одного или нескольких специфических белков. В связи с этим различают абсолютную гиперпротеинемию, например, повышение концентрации иммуноглобулинов (парапротеинемия), и относительную гиперпротеинемию при дегидратации. Гиперпротеинемия не может быть результатом усиленного синтеза альбумина, поэтому гиперальбуминемия указывает на дегидратацию или артефакты (стаз крови при венопункции).

Выраженное поликлональное увеличение иммуноглобулинов наблюдается при хроническом бактериальном воспалении, обострении вирусных инфекций (в частности, ВИЧ), хронических заболеваниях печени (хронический и подострый гепатит), аутоиммунных болезнях (ревматоидный артрит, дерматомиозит), саркоидозе.

Диспротеинемия проявляется количественными и качественными изменениями концентрации нормальных белков плазмы, например, при остром воспалении, циррозе печени, болезнях почек, парапротеинемии, опухолях. Диспротеинемия может быть обусловлена увеличением или уменьшением концентрации отдельных групп белков или продукцией новых белков,

которые до этого не выявлялись. Диспротеинемия выявляется при электрофорезе белков плазмы.

Парапротеинемии (моноклональные гаммапатии). Парапротеины – это иммуноглобулины или их фрагменты, вырабатываемые плазматическими клетками, образующимися из одной специфической клетки линии В лимфоцитов (моноклон). Парапротеины часто не способны выполнять функцию антител. Парапротеины обычно структурно однородны, то есть молекула состоит из тяжелых или легких цепей одного типа, иногда они состоят только из отдельных легких цепей (каппа или лямбда) или только из тяжелых цепей (фрагментов иммуноглобулинов). Класс и тип не меняется в течение болезни. Так как все молекулы идентичны, то парапротеины определяются при электрофорезе белков по наличию узкого пика (М-градиента), обычно в зоне γ -глобулинов (моноклональная гаммапатия). Тем не менее, достаточно часто полоса М-градиента может мигрировать от γ -глобулинов до альбумина. Миграция М-градиента может быть обусловлена присутствием фрагментов IgG или IgM, полимеризацией иммуноглобулинов или образованием комплексов иммуноглобулинов с другими белками плазмы. Парапротеины (обычно IgG или IgM) встречаются наиболее часто при множественной миеломе, при таких системных заболеваниях иммунной системы, как макроглобулинемия Вальденстрема, острый плазмобластный лейкоз, болезни тяжелых цепей, лимфомы с парапротеинемией.

Множественная миелома имеет место при злокачественной пролиферации клона В лимфоцитов на уровне плазматических клеток. Множественная миелома составляет около 1 % всех злокачественных новообразований. Плазматические клетки наиболее часто пролиферируют диффузно по костному мозгу, но иногда формируют солидную опухоль, называемую плазмацитомой. Из-за остеолитических повреждений развивается тромбоцитопения, анемия и лейкопения. Одновременно подавляется формирование нормальных плазматических клеток, поэтому не

образуются другие иммуноглобулины, развивается синдром возвратных инфекций.

При выявлении на электрофорезе сыворотки парапротеинов обязательным является электрофоретическое исследование мочи (табл. 5.7).

Примерно в 20% случаев миеломной болезни опухоль продуцирует только легкие цепи иммуноглобулинов, которые из-за низкой молекулярной массы быстро фильтруются в почках и могут не обнаруживаться в сыворотке, но будут присутствовать в моче. Для подтверждения диагноза в моче методом электрофореза определяют белок Бенс-Джонса, который располагается недалеко от старта соответственно М-градиенту в сыворотке, между γ - и β - глобулинами.

Таблица 5.7

Парапротеины при множественной миеломе

Белок	Встречаемость, %	Белок Бенс-Джонса в моче, %	Примечание
IgG	50	60	Пациенты устойчивы к иммунодефициту, парапротеинемия бывает очень высокой
IgA	25	70	Тенденция к гиперкальциемии и амилоидозу
IgD	2	100	Часты внекостные поражения, амилоидоз, почечная недостаточность, в половине случаев увеличены лимфоузлы, селезенка, печень. Плохой прогноз.
IgM	1	100	Часто увеличена вязкость крови
Только белок Бенс-Джонса	20	100	Часто развивается почечная недостаточность, амилоидоз, повреждения костей. Плохой прогноз

С целью количественного определения классов иммуноглобулинов и парапротеина используется метод иммунодиффузии с антисыворотками и иммунофиксацией. Если парапротеины относятся к IgM, то более вероятно, что это макроглобулинемия Вальденстрема, а не множественная миелома.

Электрофорез белков сыворотки крови. Электрофорез широко используется для полуколичественного определения белков сыворотки и для выявления парапротеинов. Электрофорез проводится с сывороткой, а не с

плазмой, так как присутствие фибриногена в плазме приводит к образованию выраженной β_2 -полосы, что может быть расценено как парапропротеинемия. Электрофорез на ацетате целлюлозы или геле агарозы разделяет белки на фракции альбумина, α_1 -, α_2 -, β - и γ -глобулины. Обычный состав фракций представлен на рисунке 5.1, количественный состав фракций – в табл. 5.8.

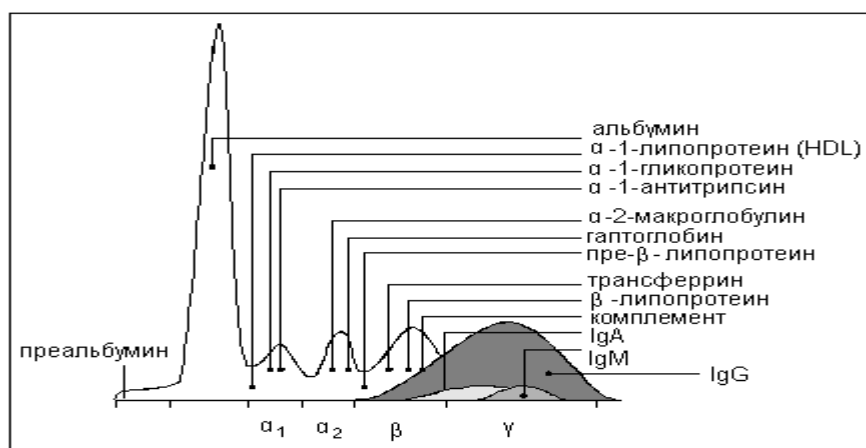


Рис. 5.1. Электрофоретическое разделение белков плазмы крови

Полоса преальбумина может проявиться в зависимости от использованного метода. α -Фетопропротеин при увеличении примерно в 100 раз (рак печени) может проявиться отдельной полосой между альбумином и α_1 -зоной. Выраженное повышение С-реактивного белка может дать резкую полосу в области γ -глобулинов. Парапротеины двигаются, как правило, отдельной полосой. Электрофоретическая подвижность белков, особенно альбумина, может меняться, когда белки связывают лекарственные препараты, билирубин и другие лиганды. В частности, подвижность альбумина повышается при связывании пенициллина, салицилатов, большого количества билирубина или жирных кислот. Подвижность α_1 -антитрипсина уменьшается при связывании тиоловых групп или белка Бенс-Джонса. Многие физиологически важные белки присутствуют в плазме в очень низких концентрациях. Значения фракций белков зависят от типа носителя (бумага, ацетат целлюлозы, агарозный гель), применяемого красителя,

способа денситометрии, поэтому электрофореграмма дает только качественное представление о распределении белковых фракций.

Белок-теряющие нефропатии приводят в первую очередь к интенсивной потере относительно низкомолекулярных белков, в результате возникает гипоальбуминемия/гипопротеинемия. Однако концентрация альбумина должна снизиться примерно на 1/3 нормального уровня, чтобы это было отчетливо видно на электрофореграмме. Неселективная стимуляция белкового синтеза в печени при белок-теряющих нефропатиях сопровождается увеличением в сыворотке α_2 -макроглобулина и β -липопротеидов (компенсаторная гиперхолестеринемия). При прогрессировании поражения базальной мембраны клубочков почек белки с большей молекулярной массой, включая IgG и IgA, также теряются с мочой, приводя к гипогаммаглобулинемии и неселективной протеинурии с потерей всех основных сывороточных белков. При дефектах иммунной системы со снижением IgG, основного компонента γ -глобулинов, может уменьшиться интенсивность полосы γ -глобулинов.

Таблица 5.8

**Белки плазмы крови, влияющие на размер электрофоретического
разделения на классы**

Электрофоретическое распределение белков				
Класс	% при разделении на ацетате целлюлозы	Основные белки фракции	Молекулярная масса	Концентрация в сыворотке, г/л
		преальбумин	54000	0,25
альбумин	48-61 %	альбумин	66000	44
α_1 -глобулин	2,5-5 %	α_1 -антитрипсин α_1 -кислый гликопротеин	55000 40000	2,9 1,0
α_2 -глобулин	8-11 %	гаптоглобин α_2 -макроглобулин церулоплазмин	85000 800000 16000	2,0 2,6 0,35
β -глобулин	11-15 %	трансферрин β -липопротеиды	77000 300000	3,0 1,0

		СЗ компонент	340000	1,0
γ-глобулины	16-25 %	IgG	160000	14,0
		IgA	170000	3,5
		IgM	900000	1,5

Основные типы протеинограмм.

Острофазный ответ – повышение α_1 - и α_2 -глобулинов в связи с усилением биосинтеза в печени белков острой фазы при воспалении любой этиологии (травма, хирургическое вмешательство, острый инфаркт миокарда, инфекция и др.).

Хроническое воспаление – увеличение γ -глобулинов (хронические гепатиты разной этиологии, ревматоидный артрит, некоторые хронические инфекции).

Цирроз печени – увеличение γ -глобулинов, слияние β - и γ -глобулинов вследствие мезенхимально-воспалительного синдрома, при развитии гепатодепрессивного синдрома возможно снижение альбумина.

Нефротический синдром – повышение α_2 -глобулинов в связи с усилением синтеза и повышением сывороточного уровня α_2 -макроглобулина, возможно снижение альбумина из-за его массивной потери с мочой.

Моноклональная гаммапатия – появление на электрофореграмме отдельной дискретной полосы в области глобулярных фракций (моноклональный белок, М-градиент, М-белок), состоящей из иммуноглобулинов или их фрагментов, синтезирующихся злокачественно трансформированными клонами В-лимфоцитов. Концентрации М-белка более 15 г/л с высокой вероятностью свидетельствует о миеломной болезни. При болезни лёгких цепей М-белок при электрофорезе сыворотки может не определяться, поскольку лёгкие цепи иммуноглобулинов (белок Бенс-Джонса) проходят через почечный фильтр и выводятся с мочой. Появление М-белка может наблюдаться при хронических гепатитах, циррозе печени, а также у некоторых пациентов престарелого возраста без клинических патологий, ассоциированных с моноклональной гаммапатией. Имитировать

М-белок могут высокие концентрации С-реактивного белка и некоторых других острофазных белков, а также фибриноген. При выявлении М-белка необходима его последующая иммунохимическая идентификация методом электрофореза с иммунофиксацией.

5.1.5. Специфические белки плазмы крови. Клиническое значение их определения

Белки острой фазы воспаления. В ответ на любое повреждение при физической травме, ожогах, хирургических операциях, инфекциях в организме развивается комплекс воспалительных реакций, направленных на локализацию очага повреждения и скорейшее восстановление нарушенных функций. Местные и системные изменения, возникающие непосредственно вслед за повреждением, в совокупности составляет понятие острой фазы воспаления. Развитие острой фазы воспалительного ответа инициируется и регулируется рядом медиаторов, среди которых цитокины, анафилотоксины, факторы роста и глюкокортикоиды. Некоторые из них выделяются непосредственно в очаге воспаления активированными макрофагами, лимфоцитами, фибробластами и другими клетками и могут оказать как местное, так и общее воздействие. Цитокины обеспечивают своего рода коммуникационную сеть. Регуляция синтеза белков острой фазы не является универсальной. Это сложный многофакторный механизм, отдельный для каждого белка. В общих чертах можно представить, что цитокины действуют как первичные стимуляторы генной экспрессии, глюкокортикоиды и факторы роста являются модуляторами действия цитокинов.

Как правило, концентрация белков острой фазы меняется в течение первых 24-48 часов. Классически острая фаза длится несколько дней, что указывает на защитное значение этого важного ответа. Однако цикл может быть пролонгирован при продолжении действия повреждающих факторов или при нарушении механизмов контроля и регуляции.

Особенностью большинства белков острой фазы является их неспецифичность и высокая корреляция концентраций в крови с активностью заболевания, стадией процесса. Это выгодно отличает белки острой фазы от таких показателей как СОЭ, подсчет количества лейкоцитов и сдвиг лейкоцитарной формулы. В связи с этим наиболее эффективно использовать тесты на белки острой фазы для мониторинга течения заболеваний, контроля лечения. В то же время диагностическая значимость этих тестов в силу их неспецифичности может быть весьма ограниченной.

Изменение концентрации разных белков в условиях повреждения и воспаления варьирует в широких пределах. Удобна для практического использования классификация белков острой фазы в зависимости от степени увеличения их концентрации при физической травме (табл. 5.9).

Таблица 5.9

Классификация белков острой фазы по степени увеличения их концентрации

Белки острой фазы		
Группа	Белок	Концентрация в сыворотке в норме (г/л)
«Главные» реактанты, увеличение в 20-1000 раз в течение 6-12 ч	С-реактивный белок (СРБ)	< 0,005
	Амилоидный белок А сыворотки (SAA)	0,001-0,03
Умеренное увеличение концентрации (в 2-5 раз) в течение 24ч	α_1 -Антитрипсин	1,4-3,2
	α_1 -Антихимотрипсин	0,3-0,6
	α_1 -Кислый гликопротеин	0,4-1,3
	Гаптоглобин	0,5-3,2
	Фибриноген	1,8-3,5
Незначительное увеличение концентрации (на 20-60%) в течение 48 ч	С3-компонент комплемента	0,5-0,9
	С4-компонент комплемента	0,1-0,4
	Церулоплазмин	0,2-0,5

К «главным» белкам острой фазы у человека относят С-реактивный белок (СРБ) и амилоидный А белок сыворотки крови. Уровень их возрастает при повреждении очень быстро (в первые 6-8 ч) и значительно (в 20-100 раз, в отдельных случаях в 1000 раз).

Вторую группу составляют белки, концентрация которых может увеличиваться существенно (в 2-5 раз). К острофазным относятся белки с

разной биологической функцией, однако все они выполняют важную роль в месте повреждения или на уровне организма и непосредственно участвуют в реакциях, направленных на удаление повреждающего фактора, локализацию очага повреждения, восстановления нарушенной структуры.

При острых воспалительных заболеваниях, сепсисе самым чувствительным и самым быстрым маркером повреждения является С-реактивный белок. Для определения и наблюдения за течением хронических процессов желательно следить за изменением концентрации сразу нескольких более медленно реагирующих белков – α_1 -кислого гликопротеина (орозомукоида), α_1 -антитрипсина. Использование только одного из маркеров воспаления рискованно, так как у разных больных возможен дисгармоничный острофазный ответ. В частности, для белков, обладающих антипротеазной активностью (α_1 -антитрипсин, α_1 -антихимотрипсин, α_2 -макроглобулин), характерно в начальной стадии острого воспаления снижение уровней из-за потребления, вслед за этим происходит повышение концентраций, связанное с увеличением синтеза этих белков. Снижение уровней ингибиторов протеиназ при септическом шоке или остром панкреатите является плохим прогностическим признаком. Повышенное потребление гаптоглобина, С3-компонента комплемента, фибриногена может указать на наличие сопутствующего патологического процесса помимо воспаления.

С-Реактивный белок. С-Реактивный белок (СРБ) – компонент иммунного ответа. Может связывать не только полисахариды, присутствующие на поверхности бактерий, грибов и паразитов, но и полианионы, поликатионы, нуклеиновые кислоты. Присоединенный к мембранам микроорганизмов и поврежденным клеткам, СРБ активирует каскад комплемента, способствует фагоцитозу. Важной функцией является распознавание потенциально токсических веществ, образующихся при

распаде собственных клеток организма, связывание их, детоксикация и удалении из крови.

Уровень СРБ повышается в течение 6-10 ч после заболевания, травмы, хирургического вмешательства. Применяется для оценки активности воспалительных процессов, наблюдения за их динамикой, дифференциальной диагностики бактериальных и вирусных инфекций, выбора адекватного лечения и контроля его эффективности. После травмы или операции при отсутствии осложнений концентрация СРБ возвращается к норме в следующие 5-7 сут. Плохой прогноз, если СРБ >200 мг/л более 10 сут или через 7-10 сут происходит только незначительное снижение СРБ. Персистенция СРБ указывает на сохраняющийся в организме воспалительный процесс, неадекватное лечение (табл. 5.10).

Таблица 5.10

**Оценка активности воспалительных процессов по уровню
С-реактивного белка**

СРБ – 10-50 мг/л	СРБ >50 мг/л
Местные бактериальные инфекции; Инфаркт миокарда (максимум после 2-х сут); Вирусные инфекции; Хронические инфекции (туберкулёз, сифилис); Саркоидоз; Ревматоидный артрит; Псориатический артрит, подагра; Заболевания соединительной ткани, такие как СКВ, дерматомиозит; Язвенный колит; Внутриутробная инфекция.	Тяжёлые бактериальные, в т.ч. послеоперационные инфекции (сепсис, пневмония, пиелонефрит); Активный ревматоидный артрит, крайне активный серонегативный спондилоартрит; Системные васкулиты; Активная болезнь Крона; Тромбоз глубоких вен; Острый панкреатит; Метастазирующие некротизирующие опухоли.

Высокочувствительный С-реактивный белок (hs-СРБ) – концентрация СРБ, которая стабильно выявляется у практически здоровых лиц или у пациентов при отсутствии острого воспалительного процесса или вне обострения заболевания. Уровень hsСРБ 3-10мг/л – признак вялотекущего воспалительного процесса в интиме сосудистой стенки, связан с высоким риском сердечнососудистых заболеваний и их осложнений (инфаркта

миокарда, мозгового инсульта), а также риском внезапной сердечной смерти у лиц, не страдающих сердечнососудистыми заболеваниями. Применяется для выделения пациентов, нуждающихся в профилактическом лечении, для оценки эффективности профилактики сердечнососудистых заболеваний и их осложнений. При отказе от курения, регулярной физической нагрузке, при лечении ожирения уровень hsCRP снижается. У больных нестабильной стенокардией и острым инфарктом миокарда риск летальности: hsCRP <1 мг/л – низкий; hsCRP 1-3 мг/л – средний; hsCRP >3 мг/л – высокий.

Белки системы комплемента. В состав комплемента входит большая группа глобулинов сыворотки крови. Белки комплемента синтезируются в печени, присутствуют в плазме в неактивной форме. Активация комплемента способна привести к необратимому нарушению структуры и функции биологических мембран и лизису клетки. Общая направленность действия системы комплемента состоит в том, что она вместе с антителами и специализированными клетками участвует в защите организма от инфекций. Активация комплемента происходит классическим или альтернативным путем (рис. 5.2).

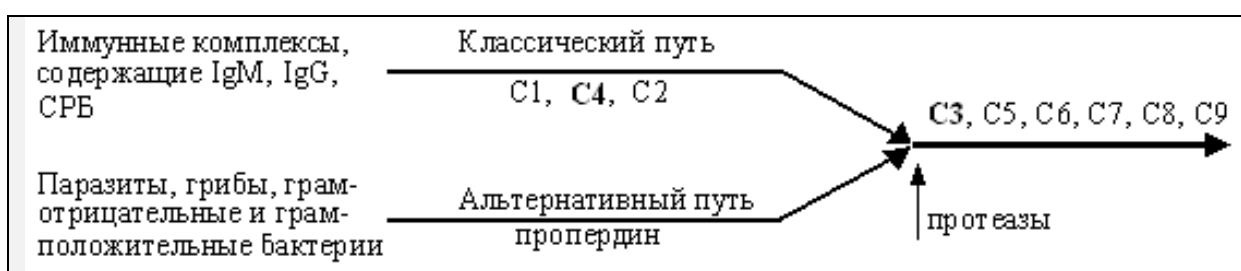


Рис. 5.2. Схема активации комплемента

Классический пути активации инициируется иммунным комплексом, содержащим антитела IgG, IgM или С-реактивный белок (CRP). После адгезии иммуноглобулинов на мембране чужеродной клетки образуется комплекс с фрагментами C1-компонента комплемента. Затем через этап активации формируется атакующая группа комплемента, которая способна

внедряться в гидрофобную часть мембраны бактерии и лизировать чужеродные клетки.

Альтернативный путь активации комплемента является быстрым, неспецифичным, не связанным с антителами. Альтернативный путь индуцируется действием системы пропердина. Пропердин активируется рядом соединений, в частности эндотоксином (бактериальным полисахаридом) и действует сразу на С3-компонент комплемента, минуя этап взаимодействия с иммуноглобулинами. При определении индивидуальных белков иммунохимическим методом определяют содержание С3- и С4-компоненты комплемента, в наибольших концентрациях присутствующих в плазме крови.

Генетически обусловленные состояния дефицита компонентов комплемента представлены в табл. 5.11.

Таблица 5.11

Генетически обусловленные состояния дефицита компонентов комплемента

Дефицит компонента	Клинические проявления
Дефицит С1	Обычно не вызывает клинически выраженных расстройств, т.к. есть возможность замещения по альтернативному пути активации; тенденция к развитию системных коллагенозов.
Дефицит С2	Протекает часто с развитием ювенильного ревматизма, системной красной волчанки, бронхиальной астмы и экземы
Дефицит С3	Аутоиммунные заболевания со значительным полиморфизмом, часто сопровождающиеся гломерулонефритом и системной красной волчанкой; возвратные инфекции
Дефицит С4	Увеличение частоты болезней иммунных комплексов: системная красная волчанка, болезнь Шенляйн-Геноха, полимиозит, гломерулонефрит
Дефицит С5	Отсутствует агрегация тромбоцитов; возвратные инфекции
Дефицит С6	Кровоточивость
Дефицит С7-С9	Возвратные инфекции, персистируют бактериальные инфекции
Дефицит С1-ингибитора	Врожденный ангионевротический отек

Вторичные изменения уровня компонентов комплемента могут быть как в сторону увеличения, так и снижения. Увеличение происходит в

реакциях острой фазы, снижение – при болезнях иммунных комплексов. Уровень С3 и С4 отражает баланс между этими состояниями – потребление в иммунных комплексах и синтез в острой фазе. Причины, вызывающие изменение концентрации С3 и/или С4 в сыворотке крови, представлены в табл. 5.12. Уровень С3 и С4 в сыворотке может быстро падать в результате ожогов или потери белка (энтеропатия).

Таблица 5.12

Причины, вызывающие изменение уровней С3 и /или С4 в сыворотке

С3	С4	Механизм	Заболевания
↑	↑	Острофазная реакция	Острое воспаление, травмы, инфекции и т.д.
↓	норма	Активация альтернативного пути	ДВС-синдром, мембранопролиферативный гломерулонефрит, инфицирование грам-отрицательными бактериями, укус змеи, криптококкоз, паразитарные инвазии, аллергические гранулематозные ангииты, инфицирование грибами.
		Активация протеолизиса	Шок при грам-отрицательном сепсисе, ревматоидный артрит, повреждение тканей, гепатит В, артефакты, привнесенные in vitro
↓	↓	Активация классического пути	Бактериальный эндокардит, острый постстрептококковый гломерулонефрит, болезнь иммунных комплексов, серповидноклеточная анемия, тяжелые хронические заболевания печени
		Активация обоих путей	Обострение системной красной волчанки, болезнь иммунных комплексов, гломерулонефрит
норма	↓		Смешанная криоглобулинемия, малярия vivax, врожденный ангионевротический отек, анафилактоидная пурпура, аллергические гранулематозные ангииты

При классическом пути активации С4 часто снижается более выражено, чем С3. Наследственная недостаточность С4 обычно связана с системной красной волчанкой. При наследственном ангионевротическом отеке С4 снижен, а С3 остается в пределах нормы, но основное значение имеет недостаток С1-ингибитора.

С1-ингибитор эстераз – α2-глобулин, белок острой фазы, тормозит активность компонентов комплемента С1 и С3, плазминогена, калликреина,

XII фактора свертывания крови. Его содержание в сыворотке в норме 150-350 мг/л. Дефицит этого белка вызывает ангионевротический отек (отек Квинке). Врожденный ангионевротический отек наследуется как аутосомное доминантное заболевание. Болезнь сопровождается приступообразным отеком бронхов, слизистой желудочно-кишечного тракта или подкожной клетчатки.

Транспортные белки. Трансферрин – металлсвязывающий транспортный белок плазмы крови, основной переносчик железа к клеткам. Связывание с трансферрином предупреждает токсический эффект железа. Каждая молекула трансферрина может связать максимум два иона Fe^{3+} , что эквивалентно 1,4 мг железа на 1 г трансферрина. В качестве сопутствующего аниона обычно связывается бикарбонат. Определение трансферрина используется для выявления функционального (скрытого) дефицита железа и перегрузки организма железом, дифференциальной диагностики анемий, мониторинга лечения железодефицитной анемии. У пациентов с уремией и находящихся на гемодиализе трансферрин не пригоден для определения недостатка железа.

Референтные значения концентрации в сыворотке: новорожденные до 7 дней – 1,3-3,6 г/л; Дети с 1 года и взрослые 2,0-3,6 г/л.

Увеличение содержания: железодефицитная анемия.

Снижение содержания: реакция острой фазы (снижается в первые 17-48 ч), неэффективный эритропоэз (талассемия, мегалобластные анемии), гемохроматоз, анемия при хронических инфекциях, опухоли.

Ферритин – растворимый в воде комплекс железа с белком апоферритином. Белок, обеспечивающий депонирование железа. Ферритин содержит примерно 15-20% от общего количества железа в организме взрослого человека. Каждая клетка тела и все жидкости организма содержат ферритин. Циркулирующий в кровотоке ферритин практически не содержит железа, но его количество находится в равновесии с резервным депо железа. Хотя в крови ферритин присутствует в небольших количествах, его

концентрация в плазме отражает запасы железа в организме. Снижение уровня ферритина – это первый показатель уменьшения запасов железа. Концентрация ферритина в сыворотке крови прямо коррелирует с количеством депонированного железа в организме, её измерение используется для диагностики и мониторинга дефицита или избытка железа, дифференциальной диагностики анемий, слежения за развитием опухолей. В отличие от железа, уровень ферритина не имеет суточного ритма, его концентрация не зависит от эстрогенов и синтеза в печени, однако, концентрация ферритина повышается в острой фазе воспаления. Особое значение имеет контроль лечения железом, так как перегрузка клеток железом приводит к их повреждению.

Референтные значения: в сыворотке (плазме) крови. 6 мес-15 лет – 15-120 мкг/л; мужчины – 30-300 мкг/л; женщины до 50 лет – 10-160 мкг/л, старше 50 лет – как у мужчин.

Увеличение содержания: гипохромная анемия с нормальным или увеличенным депо железа; повышение запасов железа в тканях, анемия вследствие инфекции или злокачественного новообразования (лимфогранулематоз, острый лейкоз); талассемия, сидеробластная анемия; избыток железа при гемохроматозе, неэффективный эритропоэз, гемотрансфузии, пероральное и парентеральное лечение препаратами железа, реакция острой фазы (воспаление, инфекции, злокачественные опухоли);

Снижение содержания (при дефиците железа): острая и хроническая (в частности меноррагии) кровопотеря, железодефицитная и гемолитическая анемия, воспалительные заболевания кишечника с нарушением всасывания железа, гемодиализ.

Для диагностики латентного недостатка железа, помимо ферритина, следует определить уровни трансферрина, железа и сделать гемограмму.

Церулоплазмин – белок плазмы крови, чья молекула содержит 6 или 7 ионов меди. Церулоплазмин транспортирует медь, связывая 90-95% меди плазмы крови. Участвует в обмене (окисляя Fe^{2+} до Fe^{3+}), транспорте и

утилизации железа. Играет важную роль в регулировании окислительно-восстановительного потенциала. Обладает антиоксидантной активностью: предупреждает окисление липидов в мембране клеток, способствует увеличению синтеза оксида азота эндотелием сосудов, тем самым контролирует NO-зависимую вазодилатацию. Церулоплазмин способен инактивировать свободные радикалы кислорода, предотвращая окисление полиненасыщенных жирных кислот, усиливает окисление аскорбиновой кислоты, катехоламинов, серотонина и соединений, содержащих сульфгидрильные группы, в частности гомоцистеина и цистеина.

Референтные значения в плазме (сыворотке) крови 0,2-0,6 г/л.

Увеличение содержания: острая фаза воспаления, первичный билиарный цирроз, лейкемия, хронический алкоголизм.

Снижение содержания: болезнь Вильсона–Коновалова (гепато-церебральная дистрофия), дефицит белка при нефротическом синдроме, гастроэнтеропатия с потерей белка, синдром мальабсорбции.

Глобулин, связывающий половые гормоны.

Глобулин, связывающий половые гормоны (ГСПГ) участвует в связывании и транспорте половых гормонов (связывает тестостерон и 5-дигидротестостерон с высоким сродством, эстрадиол несколько слабее). Защищает тестостерон и эстрадиол от метаболической инактивации во время их транспорта от места секреции к органу-мишени. Уровень синтеза ГСПГ в печени зависит от половых гормонов: эстрогены увеличивают, а андрогены снижают его продукцию. Снижение уровня ГСПГ бывает при гирсутизме, угрях обыкновенных и синдроме поликистозных яичников. Уровень ГСПГ на поздних стадиях беременности или после введения эстрогенов увеличен. После 60 лет содержание ГСПГ возрастает примерно на 1,2% в год.

Референтные значения в сыворотке крови у пациентов в возрасте старше 14 лет: женщины (до 50 лет) — 20–120 нмоль/л; мужчины — 13–71 нмоль/л.

Увеличение содержания:

- гиперэстрогемия, гипертиреоидное состояние;
- цирроз печени;
- хронический простатит, нарушение потенции.

Снижение содержания:

- гиперандрогенизм, гипотиреоз, гирсутизм, гиперпролактинемия;
- ожирение;
- синдром поликистозных яичников, аменорея, ановуляция;
- акромегалия, синдром Кушинга;

Иммуноглобулины. Иммуноглобулины сыворотки человека – это группа γ -глобулинов с идентичной базовой структурой, но отличающаяся по иммунологическим, биологическим и физическим свойствам. Синтезируются и секретируются лимфоцитами В-линии. При антигенной стимуляции В-лимфоциты продуцируют в основном IgM. При пролиферации В-лимфоциты превращаются в плазматические клетки, которые секретируют в кровь высокоспецифичные антитела класса IgG, способные связывать дополнительное количество антигенов.

Иммуноглобулины представляют собой гликопротеины с молекулярной массой от 150000 до 1000000 Да. В простейшем случае они состоят из 4 цепей: 2 одинаковых тяжелых цепей (H, мол. масса 50000) и 2 одинаковых легких цепей (L, мол. масса 25000). Каждая цепь в свою очередь состоит из доменов (мол. масса 12500), соединенных дисульфидными мостиками (рис.5.3).

Все 4 цепи образуют симметричную Y-образную структуру. N-концевые участки H- и L-цепей представляют собой антиген-связывающие фрагменты (Fab). Посредством гибкого участка - «шарнира» - они соединены с фрагментом Fc. Последний не участвует в связывании антигенов, но может реагировать с макрофагами, лимфоцитами и компонентами комплемента. В зависимости от структуры и функции иммуноглобулины относятся к одному из пяти классов: IgA, IgG, IgM, IgD и IgE.

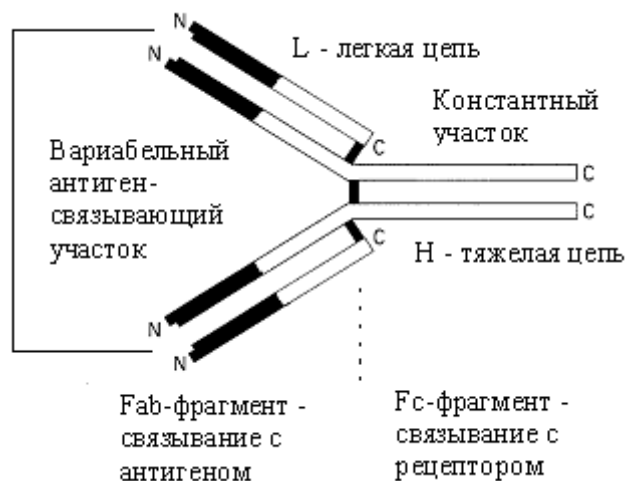


Рис. 5.3. Базовая структура молекулы иммуноглобулина. Молекула иммуноглобулина состоит из 2 тяжелых (H) и 2 легких (L) цепей, связанных дисульфидными мостиками. Молекула бифункциональна: Fab-фрагмент изменчив, он отвечает за связывание с антигеном; Fc-фрагмент определяет эффекторную функцию

Гипогаммаглобулинемия может быть физиологической или свидетельствовать о патологическом процессе в организме.

Физиологическая гипогаммаглобулинемия имеет место у новорожденных. Контакт новорожденных с антигенами стимулирует В-лимфоциты, которые начинают активно продуцировать IgM. После трансформации в плазматические клетки начинается синтез и секреция IgG и IgA. Этот процесс происходит с одновременным снижением материнских IgG, поэтому у детей уровень IgG минимален в возрасте 3 месяцев. Особенно сильно подвержены инфекциям недоношенные дети, так как у них меньше, чем у доношенных материнских IgG.

Патологическая гипогаммаглобулинемия как у детей, так и взрослых может быть как врожденной, так и приобретенной. Общим клиническим признаком для назначения лабораторного определения иммуноглобулинов в сыворотке у пациентов, особенно у детей, являются рецидивирующие инфекции. Инфекционные заболевания могут быть связаны с нарушением синтеза одного или нескольких иммуноглобулинов. Наиболее часто возникают острые респираторные заболевания. При врожденной

недостаточности заболевания возникают с самого раннего возраста, при приобретенной гипогаммаглобулинемии склонность к инфекциям не зависит от возраста.

Врожденные дефекты иммунной системы достаточно редки. Они могут затрагивать В и/или Т клетки, фагоциты или систему комплемента. Из них примерно 50-75 % приходится на нарушения образования иммуноглобулинов, 5-10 % на клеточные иммунодефициты, 10-25 % на комбинированные иммунодефициты и около 1-2 % на нарушения фагоцитоза и системы комплемента. Неверно ставить диагноз иммунодефицита только на основании определения уменьшения в сыворотке содержания IgG, IgA, IgM, необходимо провести сопоставление лабораторных и клинических данных, включая анализ частых, особенно инфекционных заболеваний. В то же время ранняя постановка диагноза необходима для лечения больных с иммунодефицитами, особенно детей.

Приобретенные иммунодефициты. Больных с приобретенными дефицитами иммунной системы значительно больше, чем с врожденными. При злокачественных лимфомах, болезни Ходжкина, хроническом лимфолейкозе, плазмацитоме и злокачественных опухолях нарушается гуморальный и клеточный иммунитет. Концентрация иммуноглобулинов в сыворотке может быть снижена в разной мере, а иногда увеличена. Лечение цитостатиками, стероидными гормонами, глюкокортикоидами, рентгеновское облучение, ионизирующая радиация влияют на образование иммуноглобулинов. Иммуносупрессоры могут уменьшать уровень иммуноглобулинов сыворотки.

Нарушения иммунитета с уменьшением иммуноглобулинов в сыворотке могут возникнуть после массивных потерь белка, в частности, при обширных ожогах, заболеваниях почек, белок-теряющих энтеропатиях. Тяжелые травмы, серьезные оперативные вмешательства, массивные трансфузии, недоедание, угнетения иммунореактивной ткани

токсикоинфекционным воздействием, злокачественные поражения лимфоплазмацитарной системы могут привести к иммунодефицитам.

Среди приобретенных иммунодефицитов особое место занимает СПИД. Агаммаглобулинемия возникает только у детей и схожа с некоторыми формами врожденного иммунодефицита. У взрослых при СПИД, как правило, имеет место гипергаммаглобулинемия с различными нарушениями иммунной системы.

Гипергаммаглобулинемия возможна при повышенном синтезе антител, как при острых, так и хронических инфекционных заболеваниях. Нарастают все классы Ig, но преобладают IgG. Иммуноглобулины увеличиваются при бактериальных инфекциях, сепсисе, хронических инфекциях, паразитарных заболеваниях. Предпочтительное повышение IgG имеет место при аутоиммунных заболеваниях, IgA – при инфекционных поражениях кожи, желудка, дыхательных путей, почек, IgM – при первичной вирусной инфекции и паразитарных инфекциях с накоплением паразита в крови (малярия). Изменение общих Ig, также как IgM не имеет четкого диагностического значения, однако специфические Ig, направленные против специфических антигенов, имеют важное диагностическое значение.

Апобелки липопротеидов. АпоА и апоВ-белки. Каждый липопротеин (ЛП) содержит белковые компоненты – аполипопротеины. Существует два класса апо-ЛП в зависимости от их роли в организации первичных частиц ЛП и их последующих превращениях. К одному относят апо-белки, которые формируют мицеллярную структуру ЛП комплексов. В эту группу входят апоВ (апоВ-100 и апоВ-48) и апоА (А-I и А-II), ответственные за осуществление афферентного и эфферентного транспорта липидов. К другому классу относятся апо-белки, основной ролью которых является регуляция метаболизма ЛП и липидов в сосудистом русле и процесса интернализации их клетками. Эти апо-протеины содержатся в ЛП в значительно меньших количествах и в процессе взаимопревращения ЛП

частиц в кровеносном русле перемещаются между ЛП разных классов в виде белок-липидных комплексов.

Все липопротеиды, несущие липиды к периферическим тканям, имеют в своей структуре АпоВ-белок. Рецепторы к АпоВ-белку имеются практически во всех клетках тканей, за исключением клеток нервной системы и эритроцитов. Транспорт холестерина из клеток периферических тканей в печень (обратный транспорт холестерина) осуществляется ЛПВП. Основными белковыми компонентами ЛПВП является АпоА-1 (65%) и АпоА-II (30%). Физиологическая функция АпоА-1 – активация фермента лецитинхолестеринацилтрансферазы (ЛХАТ) и удаление свободного холестерина из клеток периферических тканей. АпоА-II – структурный белок ЛПВП, который может активировать липазу гепатоцитов и ингибировать ЛХАТ.

Определение в крови АпоА и АпоВ имеет значение для выявления риска атеросклероза коронарных артерий в популяции, а отношение АпоВ/АпоА-1 превосходит прогностическое значение отдельных АпоЛП. Рекомендованное значение АпоВ/АпоА1 – менее 1,1. Чем больше в сыворотке АпоА1 и меньше АпоВ, тем ниже вероятность развития сердечно-сосудистой патологии. В таблице 5.13 представлены референтные значения уровня аполипопротеинов, установленные для здоровых взрослых лиц иммунотурбидиметрическим методом, и рекомендуемые значения этих показателей.

Таблица 5.13

Значения аполипопротеинов в сыворотке взрослых людей

Показатель	Референтные значения	Рекомендуемые величины
Апо А-1	муж. 1,04 - 2,02 г/л жен. 1,08 - 2,25 г/л	> 1,15 г/л
Апо В	муж. 0,66 - 1,33 г/л жен. 0,60 - 1,17 г/л	< 1,00 г/л
Апо А-1/Апо В		< 1,1

Липопротеин(а). Липопротеин (а) (Апо(а)) – обогащенная холестерином (ХС) и белком частица, содержит молекулу апо(а) в дополнение к молекуле апо В. Особый интерес представляет выявление сходства в аминокислотной последовательности апо(а) и плазминогена. Апо(а), тем не менее, не обладая ферментативной активностью сериновой протеазы, не способен превращаться в активный плазминоподобный фермент. Увеличение концентрации ЛП(а) в крови считают независимым фактором риска атеросклероза и инфаркта миокарда. Концентрация ЛП(а) выше 300 мг/л связана с 2-х кратным повышением риска ИБС, если же одновременно повышена концентрация ЛПНП, то риск ИБС повышается до 5 раз. Атерогенность ЛП(а) обусловлена высокой способностью ЛП(а) взаимодействовать с белками клеточного матрикса, такими как фибронектин и протеогликаны. Образующиеся комплексы активно поглощаются моноцитами, макрофагами и гладкомышечными клетками, в результате клетки трансформируются в пенистые. Скевенджер-рецепторы на макрофагах и моноцитах имеют высокое сродство к ЛП(а), что объясняет интенсивный захват этими клетками ЛП(а) и облегчает развитие атеросклероза. ЛП(а) блокирует рецептор плазминогена и тем самым может ингибировать фибринолиз, повышая риск развития тромбоза и атеросклероза.

5.1.6. Клиническое значение определения маркерных белков

Клиническое значение определения индивидуальных белков плазмы крови связано с тем, что большое количество заболеваний, как врожденных, так и приобретенных, сопровождается изменениями в белках плазмы. Анализ количественных и качественных изменений белков плазмы используют для диагностики, мониторинга и прогноза заболеваний. Примеры качественных изменений белков для диагностики: обнаружение в плазме крови тропонина и миоглобина при остром инфаркте миокарда, натрийуретического пептида для диагностики сердечной недостаточности, терминальных пептидов

коллагена – для диагностики метаболических заболеваний костной ткани, прокальцитонина и пресепсин – для диагностики сепсиса.

Миоглобин. Миоглобин (МГ) – гемсодержащий белок с молекулярной массой 17,3 кДа. МГ является одним из ключевых соединений, определяющих интенсивность окислительного метаболизма в скелетной мышце и, особенно, в миокарде. Основная его функция – транспорт кислорода от гемоглобина, а также поддержание оптимального кислородного градиента вблизи митохондрий. МГ локализуется в разных участках миоцитов. Благодаря мобильности, отсутствию прочных связей с внутриклеточными структурами, а также небольшой молекулярной массе, он быстро выходит из миоцита при его повреждении, попадает в кровь, а затем выводится почками с мочой. Уровень МГ в крови практически здоровых людей не превышает 95 нг/мл. В норме почками выводится не более 4 мкг/сутки МГ (в среднем 2-4 нг/мл).

При ОИМ разрушаются мембраны кардиомиоцитов, содержащее клетки, в том числе и белки, поступают в кровь. МГ появляется в кровотоке через 2-4 часа после появления боли при ОИМ, степень повышения зависит от площади поражения миокарда. Это самый «короткоживущий» маркер ОИМ, так как активно выводится почками – его уровень приходит к норме, как правило, за 24 часа. В этом заключается его уникальная диагностическая ценность. Если уровень МГ остается повышенным после острого приступа ИМ – это свидетельствует о расширении зоны инфаркта. Повторные повышения уровня МГ в крови на фоне уже начавшейся нормализации говорит об образовании новых некротических очагов. Таким образом, МГ важен для диагностики повторного ИМ. Существенным недостатком этого маркера является его низкая специфичность – он появляется в крови при повреждении скелетных мышц. При нарушении почечного кровотока и снижении фильтрации в почках уровень МГ в сыворотке крови может существенно повышаться.

Тропонины. Тропонины (Тн) – белки, участвующие в регуляции сокращения миофибрил. ТнI является ингибирующей субъединицей тропонинового комплекса, связывающей актин в период расслабления и тормозящей АТФ-азную активность актомиозина, предотвращая мышечное сокращение в отсутствие ионов кальция. ТнТ является регуляторной субъединицей, прикрепляющей тропониновый комплекс к тонким филаментам, тем самым он участвует в регулируемом Са акте сокращения. ТнI и ТнТ существуют в трех изоформах, уникальных по структуре для каждого типа поперечно-полосатых мышц (быстрых, медленных и сердечных). Кардиальная изоформа ТнI существенно отличается от ТнI, находящейся в скелетной мускулатуре: он содержит дополнительный N-терминальный полипептид, состоящий из тридцати одного аминокислотного остатка. Таким образом, ТнI – абсолютно специфичный миокардиальный протеин. Молекулярная масса ТнI – около 24 кДа.

В диагностике ОИМ используют сердечные изоформы как ТнI, так и ТнТ. Они могут быть выявлены среди аналогичных белков скелетных мышц иммунологически, с помощью моноклональных антител. Оба маркера (ТнI и ТнТ) могут быть обнаружены в крови пациента спустя 3-6 часов после начала боли в груди, достигая пикового уровня в течение 12-36 часов (а иногда и позже), удерживаясь на повышенном уровне в течение нескольких суток. Абсолютная специфичность для миокарда, быстрый подъем и длительная циркуляция в крови после ОИМ определили этот белок в качестве основного лабораторного маркера инфаркта миокарда.

Высокочувствительный тест на тропонин – новый уровень диагностики с использованием маркерных белков. Быстрый прогресс в исследованиях патогенеза заболеваний сердца и сосудов сопровождается сменой набора лабораторных тестов, особенно это касается инфаркта миокарда и предшествующих ему патологических изменений. После открытия сердечных тропонинов Т и I и создания диагностикумов для их определения казалось, что проблемы с лабораторными методами диагностики инфаркта

миокарда решены. Однако стремление получить лабораторное заключение как можно раньше и дифференцировать приступ стенокардии от инфаркта миокарда стало основанием для разработки тестов высокочувствительного определения тропонинов. Эти тесты, основанные на многократном усилении сигналов взаимодействия антител со специфичными эпитопами тропонинов, оказались настолько чувствительными, что традиционная схема иммунохимического анализа с использованием калибраторов контрольных сывороток и особенно наработкой референтных диапазонов оказалась негодной для этих тестов.

Для тестов высокочувствительного тропонина предложен новый алгоритм: оценка аналитических характеристик теста по способности определять содержание нанокочувствительных количеств аналита у здоровых людей и диагностика некроза миокарда по динамике изменения за несколько часов. Кроме того, оказалось, что этот тест способен дать информацию о степени повреждения сердечной мышцы, в том числе неишемической этиологии. Тест оказался широко востребованным для дифференциальной диагностики заболеваний сердца в кардиологической, хирургической, инфекционной и даже амбулаторно-поликлинической практике.

Высокочувствительные тесты измеряют нанокочувствительные количества циркулирующих тропонинов. С помощью этих методов установлено, что у здоровых людей существуют нормальные уровни тропонинов, которые составляют 1-5 нанограммов на литр.

Международные исследования показали, что измерение динамики повышения высокочувствительных тропонинов в течение 2-3 часов после поступления с признаками ОКС выявляет значительно большее количество случаев инфаркта миокарда, чем обычные тропониновые тесты. При этом высокочувствительные тропонины перекалифицируют большое количество случаев, ранее считавшихся нестабильной стенокардией, в диагноз инфаркт миокарда без подъема ST интервала (ИМБСТ) на ЭКГ. Это, в свою очередь, при проведении адекватных вмешательств снижает количество

неблагоприятных исходов (повторные ИМ, летальность) почти в два раза. Этот факт явился одной из причин сформулированного положения: Для всех пациентов, у которых подозревается ИМБСТ, обязательным является измерение биомаркеров повреждения кардиомиоцитов, предпочтительным является количественное измерение высокочувствительного тропонина.

Мозговой натрийуретический пептид. Мозговой (В-типа) натрийуретический пептид (BNP) и его аминотерминальный фрагмент (NTproBNP) являются основными лабораторными маркерами в клинической практике сердечной недостаточности (СН). Секретируется BNP миоцитами желудочков сердца в ответ на повышение напряжения миокарда при увеличении давления или объема крови в левом желудочке сердца, а также при механическом растяжении сердечной мышцы. Свое название BNP получил в связи с тем, что впервые был обнаружен в мозге свиньи и только впоследствии был выделен из сердца. В плазме крови BNP находится в виде нескольких форм про-гормонов (proBNP), имеющих различные свойства и биологическую активность, при расщеплении которых образуются активные пептиды. Для целей диагностики определение proBNP (физиологически неактивный терминальный участок гормона) оказалось более эффективным, чем определение BNP, так как proBNP имеет более продолжительный период полувыведения (proBNP 60-120 мин, BNP – 20 мин). Кроме того, proBNP обладает высокой стабильностью в сыворотке и плазме крови, его уровень не подвержен циркадным ритмам, не зависит от положения пациента при взятии и не требует специальной подготовки пробы.

Терминальные пептиды коллагена. Карбокси- и аминотерминальные телопептиды коллагена I типа (КТТКИ, АТТКИ) образуются в тканях, которые содержат коллаген I типа. Молекулярная масса телопептидов составляет от 9 до 20 кД, они эффективно выводятся с мочой. Концентрация КТТКИ и АТТКИ в сыворотке тесно коррелирует со скоростью резорбции кости. Для определения АТТКИ используют иммуноферментный анализ с моноклональными антителами против поперечносвязанных молекул

коллагена I типа (CrossLaps). CrossLaps можно использовать для определения теллопептидов коллагена как в сыворотке, так и в моче. В период менопаузы маркер CrossLaps увеличивается в сыворотке почти в 2 раза. Динамическое определение уровня теллопептидов имеет важное значение для прогнозирования восстановления минеральной плотности кости при проведении антирезорбционной терапии у женщин в постменопаузальный период, у пациентов с остеопенией и болезнью Педжета. Преимущество использования CrossLaps состоит в том, что данный маркер костной резорбции позволяет быстро оценить эффективность всех видов терапии остеопороза уже через 3 месяца после начала лечения. Увеличение CrossLaps от среднего значения нормы на 2SD ассоциируется с 2-х кратным повышением риска переломом шейки бедра.

Прокальцитонин. Прокальцитонин является прогормоном кальцитонина. При тяжелой системной инфекции прокальцитонин продуцируется тканями вне щитовидной железы. У пациентов, которые предварительно подверглись тотальной тиреоидэктомии, все равно продуцируются высокие уровни прокальцитонина при тяжелой инфекции. Предполагают, что прокальцитонин вносит вклад в нежелательные эффекты системной воспалительной реакции. У здоровых лиц концентрация ПКТ в плазме ниже 0,05 нг/мл, у пациентов с тяжелым сепсисом или септическим шоком она может вырасти до 1000 нг/мл.

Повышенный уровень ПКТ указывает на бактериальную инфекцию, сопровождающуюся системной воспалительной реакцией. Локализованная инфекция обычно не приводит к увеличению концентрации ПКТ в крови. Одно из главных преимуществ ПКТ состоит в его раннем и высокоспецифичном увеличении в ответ на тяжелые системные бактериальные инфекции и сепсис. При развитии сепсиса можно наблюдать увеличение уровней ПКТ через 3-6 часов после развития инфекции. Уровень ПКТ обычно остается низким при вирусных инфекциях, хронических воспалительных расстройствах или аутоиммунных процессах. ПКТ дает

возможность провести дифференциальную диагностику между упомянутыми выше клиническими состояниями и тяжелой бактериальной инфекцией (сепсисом). Низкое значение ПКТ автоматически не исключает бактериальной инфекции, т.к. может иметь место на ранней стадии течения инфекций, при локализованных инфекциях и при подостром эндокардите.

Пресепсин. Пресепсин (ПСП) — это фрагмент, образуемый из растворимой формы мембранного гликопротеина, который находится на поверхности моноцитов, макрофагов и нейтрофилов. Растворимый гликопротеиновый рецептор индуцирует активацию неспецифического иммунитета после взаимодействия с компонентами бактерий и грибов. При инфекции после отщепления от клеточной поверхности и активации фагоцитоза он расщепляется лизосомальными и бактериальными протеиназами с образованием N-терминального пептида с молекулярной массой 13 Кда, который и был назван пресепсином. При инфекции ПСП повышается через 2 ч после ее начала (раньше, чем ИЛ-6, ПКТ и СРБ), достигает пиковых концентраций через 3 ч и снижается через 4-8 ч. ПСП повышается при системных инфекциях, вызываемых бактериальными и грибковыми патогенами. При вирусных инфекциях ПСП не повышается.

5.2. Лабораторная энзимология

5.2.1. Структура и характеристика ферментов

Структура ферментов. Ферменты или энзимы – это белки, обладающие каталитической активностью и ускоряющие протекание реакций обмена веществ. Активный центр фермента представляет собой участок белковой молекулы, в образовании которого участвуют радикалы ряда аминокислот, определенным образом ориентированных в пространстве. Некоторые из них принимают участие в связывании субстрата, а другие - в химическом превращении субстрата в продукт реакции. В составе полипептидной цепи большинство этих радикалов удалены друг от друга, их пространственное сближение происходит благодаря скручиванию

полипептидной цепи. В активном центре различают каталитический участок, непосредственно вступающий в химическое взаимодействие с субстратом, и «контактную» (якорную) площадку, обеспечивающую связывание субстрата и формирование фермент-субстратного комплекса. В свою очередь молекула субстрата содержит различные участки и связи, подвергающиеся атаке со стороны фермента и несколько участков, избирательно связываемые ферментом. Помимо активного центра, в молекуле фермента может присутствовать еще один центр (центры), не выполняющий каталитическую функцию, но служащий для присоединения своего лиганда. Он назван аллостерическим.

Активность многих ферментов проявляется только в присутствии небелковых веществ, называемых кофакторами, например Ca^{2+} , Zn^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Fe^{2+} , Cu^{2+} , K^+ , Na^+ . Молекулярный комплекс белка и кофактора обладает максимальной каталитической активностью. Белковый компонент, лишенный кофактора, называется апоферментом; он подчас обладает низкой активностью, а часто вообще неактивен. Если кофактор представлен органическим компонентом, то его называют коферментом. Большая часть коферментов образуется из витаминов (B_1 , B_2 , B_6 , пантотеновая кислота) или представляет собой их производные.

Кинетика ферментативных реакций. Ферменты, как биокатализаторы, обладают уникально высокой каталитической активностью. Добавка незначительных количеств фермента приводит к ускорению реакции во много тысяч раз.

В основу теории действия ферментов и ферментативной кинетики положены представления Михаэлиса и Ментен о том, что фермент **E** реагирует с субстратом **S**, образуя фермент-субстратный комплекс **ES**, который распадается на свободный фермент и продукт реакции **P**. Реакция перехода субстрата в продукт (**S** → **P**) протекает потому, что некоторая доля молекул субстрата обладает энергией, которой достаточно для перехода в активированное состояние, в котором появляется возможность образования

новой химической связи, ведущей к образованию продукта. Количество энергии, необходимое для перехода 1 моля вещества в активированное состояние, называется энергией активации. Катализаторы, в том числе ферменты, не меняют суммарную реакцию, а ускоряют ее путем снижения свободной энергии активации за счет образования фермент-субстратного комплекса. Сорбция субстрата на ферменте, протекающая при участии функциональных групп белка и молекулы субстрата, обусловлена гидрофобными, полярными или ионными взаимодействиями. В реальных условиях ни субстрат, ни фермент не являются жесткими структурами, поэтому оба при связывании претерпевают конформационные изменения, что существенно снижает барьер свободной энергии активации последующей химической реакции.

Скорость химических, в том числе и ферментативных реакций, определяется рядом факторов:

- Химической природой реагирующих веществ (для ферментативной реакции имеет значение сродство фермента к субстрату). Для многих ферментов скорость реакции определяется природой субстрата.
- Концентрацией реагирующих веществ (для ферментативной реакции – концентрацией субстрата и фермента).
- Условиями протекания реакции – температурой, величиной pH, присутствием активаторов, ингибиторов и т.д.

Химические реакции можно классифицировать на основе кинетических характеристик, в частности, исходя из порядка реакции. Различают реакции нулевого, первого, второго и т.д. порядка в зависимости от того, как скорость реакции зависит от концентрации реагирующих веществ. Основное значение для клинической биохимии имеют типы реакций, катализируемых ферментами реакции нулевого и 1-го порядка. К реакциям нулевого порядка относят такие реакции, в которых скорость ферментативной реакции постоянна и не зависит от концентрации субстрата. Реакции первого порядка характеризуются тем, что скорость реакции в каждый момент времени

определяется концентрацией субстрата. В этом случае скорость реакции меняется в зависимости от истощения субстрата. В условиях насыщения фермента субстратом в начальные промежутки времени, когда превращению подверглась незначительная часть субстрата, реакцию можно отнести к реакции нулевого порядка. Общий подход к определению активности ферментов в клинической биохимии состоит в определении скорости реакции при достаточно высокой концентрации субстрата.

Специфичность действия ферментов. Важное свойство ферментов – избирательность (специфичность) в отношении структуры субстрата, что обеспечивает строгую упорядоченность и тесную взаимосвязь между отдельными ферментативными реакциями. Причина субстратной специфичности кроется в уникальной структуре фермента. Некоторые ферменты обладают абсолютной специфичностью, каждый такой фермент катализирует единственную реакцию. К таким ферментам относится уреаза, катализирующая расщепление мочевины до аммиака и оксида углерода. К ферментам с высокой субстратной специфичностью можно отнести глюкозооксидазу, катализирующую превращение D-глюкозы в глюконовую кислоту.

Однако многие ферменты обладают лишь относительной субстратной специфичностью. Они способны катализировать один тип реакции с более чем одним структурно-подобным субстратом. Существует группа ферментов, обладающих групповой специфичностью и способных к превращению ряда субстратов, в структуре которых присутствуют определенные группировки. В частности, пепсин гидролизует пептидные связи, образованные ароматическими аминокислотами. Ряд ферментов проявляет специфичность к определенным типам реакций, например к переносу различных групп, гидролизу.

Некоторые ферменты проявляют стереоспецифичность, катализируя превращения только одной стереохимической формы субстрата. В организме человека претерпевают превращения только L-формы аминокислот, D-

формы углеводов. Фермент лактатдегидрогеназа катализирует превращение L-молочной кислоты в пировиноградную.

Классификация ферментов. Типы катализируемых реакций. В основу классификации ферментов положен тип катализируемой химической реакции в сочетании с названием субстрата. Согласно этой классификации ферменты делят на шесть классов (табл. 5.14).

Таблица 5.14

Классификация ферментов

Класс	Тип катализируемой реакции, систематическое название	Схема реакции	Примеры
1.Оксидоредуктазы	Окислительно-восстановительные реакции.	$A_{red} + B_{ox} \rightarrow A_{ox} + B_{red}$	Дегидрогеназы, пероксидаза
2.Трансферазы	Межмолекулярный перенос различных групп атомов от молекулы донора на молекулу акцептор.	$A-B + C \rightarrow A + B-C$	Гексокиназа, трансаминазы
3. Гидролазы	Расщепление внутримолекулярных связей при участии молекулы воды.	$A-B + H_2O \rightarrow A-H + B-OH$	Щелочная фосфатаза, трипсин
4. Лиазы	Обратимые реакции отщепления различных групп от субстратов не гидролитическим путем с образованием двойной связи или присоединение по двойным связям	$A(XH)-B \rightarrow A-X + B-H$	Карбоангидразы, дегитратазы
5. Изомеразы	Взаимопревращение различных изомеров.	$A \leftrightarrow Iso-A$	Триозофосфатизомераза
6. Лигазы (синтетазы)	Реакции синтеза	$A + B + АТФ \rightarrow A-B + АДФ + P_i$	Гем-синтетаза

На основании данной системы Международная комиссия подготовила Классификацию ферментов (КФ) с включением списка ферментов. В списке для каждого фермента, помимо номера (шифра), приводятся систематическое (рациональное) название, рекомендуемое (рабочее) название. Кроме того, указана химическая реакция, которую катализирует данный фермент, а также примечания о специфичности действия.

Шифр каждого фермента содержит четыре цифры, разделенные точками, и составляется по следующему принципу. Первая цифра указывает номер одного из шести классов ферментов. Вторая цифра означает подкласс,

характеризующий основные виды субстратов, участвующих в данном типе химических превращений. Например, у трансфераз вторая цифра указывает на природу той группы, которая подвергается переносу. Эти подклассы в свою очередь делятся на более частные подгруппы (обозначаемые подподклассами), отличающиеся химической природой соединений (доноров или акцепторов). Цифра подподкласса ставится на третьем месте в шифре фермента. У гидролаз эта цифра уточняет тип гидролизуемой связи, а у лиаз - тип отщепляемой группы. Первые три цифры кода точно определяют тип фермента. Все ферменты, относящиеся к данному подподклассу, получают порядковый номер в алфавитном порядке, который ставится на четвертом месте в шифре. Использование данной классификации является обязательным требованием в тех случаях, когда необходима точная идентификация фермента, в частности в инструкциях к наборам реактивов, разного рода указателях, публикациях в научных журналах. Однако многие систематические названия громоздки, поэтому удобнее пользоваться тривиальными названиями. В табл. 5.15 приведены два примера соответствующих обозначений ферментов.

Таблица 5.15

Примеры обозначений ферментов по международной классификации и при тривиальном названии

Шифр фермента	Систематическое название	Тривиальное название	Обозначение, используемое в КДЛ
2.6.1.2.	L-аланин:2-оксоглутарат-аминотрансфераза	Аланинаминотрансфераза	АЛТ или АлАТ
2.7.1.1.	АТФ: D-гексоза-6-фосфотрансфераза	Гексокиназа	ГК

Органные особенности биосинтеза и локализации ферментов. В клетках человека содержится 10-40 тысяч различных белков, многие из которых обладают каталитической активностью. Большинство ферментов, представляющих интерес с точки зрения энзимодиагностики заболеваний, обладают молекулярной массой 90000 Да и выше, и не способны проникать

через интактные мембраны клеток. Активность большинства ферментов в клетках в норме значительно превышает их активность во внеклеточной жидкости. Уровень ферментативной активности в кровяном русле после повреждения ткани определяется в первую очередь содержанием фермента в этой ткани, а также стадией патологического процесса. Имеются ферменты, которые присутствуют только в определенной ткани или одной из тканей в высокой концентрации. При повреждении этой ткани в крови появляются органоспецифичные ферменты (таблица 5.16).

Таблица 5.16

Специфичность ферментов для диагностики патологических процессов

Фермент	Орган	Диагностическое значение
α -амилаза	Поджелудочная железа, слюнные железы	Острый панкреатит
АЛТ	Печень	Заболевания паренхимы печени
АСТ	Миокард, печень	Инфаркт миокарда, заболевания паренхимы печени, поражения скелетных мышц
ЩФ	Печень, костная ткань, кишечник, почки	Метаболические заболевания костной ткани, гепатобилиарная патология
КК	Скелетные мышцы, сердце, гладкие мышцы	Инфаркт миокарда, поражения мышечной ткани
Холинэстераза	Печень	Отравления фосфорорганическими соединениями, заболевания паренхимы печени
ГГТ	Печень	Патология желчевыводящих путей, алкоголизм
ЛДГ	Печень, сердце, скелетные мышцы, эритроциты, тромбоциты, лимфатические узлы	Заболевания паренхимы печени, инфаркт миокарда, гемолиз, неэффективный эритропоэз, лимфомы

Небольшие по размерам молекулы первыми покидают поврежденные клетки, позднее ее покидают большие по размерам молекулы – белки и ферменты, в конечном итоге все содержимое некротизированных клеток поступает во внеклеточную жидкость. Молекулы фермента, покинувшие клетку, мигрируют из интерстициальной жидкости в кровь. Выход ферментов непосредственно в кровь происходит только в хорошо васкуляризированных тканях, например, печени. В скелетной мышце

большая часть ферментов попадает в кровяное русло через лимфатические пути. При пассаже ферментов, вышедших из поврежденных кардиомиоцитов в кровотоки, имеет значение скорость лимфотока. Полагают, что насосная функция сердца поддерживает постоянный поток лимфы, обеспечивая постоянную скорость выхода ферментов в перикардальную жидкость.

Ферменты локализуются в разных клеточных компартментах, таких как цитозол, лизосомы, плазматическая мембрана или митохондрии. Появление определенной группы ферментов может свидетельствовать о степени и тяжести повреждения клеток. При обратимых дистрофических процессах, характеризующихся только увеличением проницаемости мембран, высвобождаются только ферменты из цитоплазмы. Появление в сыворотке как митохондриальных, так и цитоплазматических ферментов свидетельствует о некрозе клеток. На это в частности, может указывать тот факт, что значительные количества митохондриальной формы аспартатаминотрансферазы в сыворотке обнаруживаются только при тяжелой форме гепатита, после обширного инфаркта миокарда.

Изоферменты. Ферменты, катализирующие одну и ту же реакцию, но различающиеся величиной молекулярной массы, аминокислотным составом, электрофоретической подвижностью, термостабильностью, оптимумом pH, субстратной специфичностью, по действию на них активаторов и ингибиторов и иммунологическим характеристикам, называют *изоферментами*. Существует несколько механизмов их образования, основным из которых следует считать различия в четвертичной структуре их молекул. Например, КК является димером, состоящим из 2 типов субъединиц: В и М. Поэтому в организме представлены 3 изофермента креатинкиназы – ВВ, МВ и ММ. Синтез субъединиц находится под контролем соответствующих генов, активность которых определяет различия в распределении изоферментов в разных тканях. Анализ изоферментного спектра дает возможность существенно увеличить специфичность энзимодиагностики заболеваний разных органов и тканей. Изоферментный

анализ позволяет дифференцировать по спектру КК инфаркт миокарда от повреждений мышц, по спектру α -амилазы – панкреатит от повреждения слюнных желез, по изоферментам щелочной фосфатазы – заболевания печени от метастазов опухолей в костную ткань, по изоферментам кислой фосфатазы выделить простатит.

5.2.2. Клинико-диагностическое значение определения активности отдельных ферментов

Лактатдегидрогеназа и ее изоферменты. Лактатдегидрогеназа (ЛДГ) – фермент, катализирующий обратимую реакцию превращения пирувата в лактат. Содержится в цитоплазме клеток практически всех органов и тканей организма. Наибольшая активность представлена в миокарде, почках, скелетной мускулатуре, паренхиме печени, эритроцитах; меньшая — в лимфоцитах, лёгких, поджелудочной железе. ЛДГ является тетрамером, состоящим из двух типов субъединиц: Н и М. Поэтому ЛДГ в организме представлена пятью изоферментами: Н4-ЛДГ-1, Н3М1-ЛДГ-2, Н2М2-ЛДГ-3, Н1М3-ЛДГ-4, М4-ЛДГ-5. Изоферментный спектр ткани определяется характером углеводного обмена. В тканях с преимущественно аэробным путем обмена (сердце, головной мозг, почки) активность ЛДГ связана с изоферментами ЛДГ₁ и ЛДГ₂. В тканях с выраженной способностью к анаэробному обмену (печень, скелетная мускулатура) в изоферментном спектре преобладает ЛДГ₅. В ряде тканей (миокардий, надпочечники, селезенка, легкие, клетки крови) активность ЛДГ равномерно распределена между всеми изоферментами. На рис.5.4 представлен спектр изменения изоферментов лактатдегидрогеназы в норме и при некоторых заболеваниях

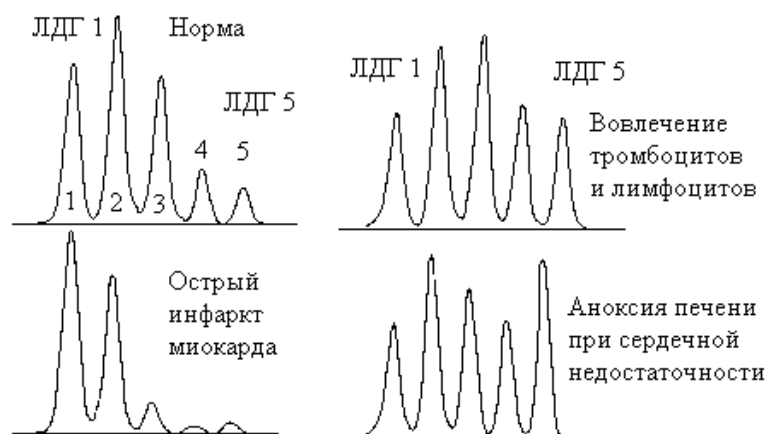


Рис. 5.4. Влияние типа патологии на каталитическую активность изоферментов лактатдегидрогеназы в сыворотке при некоторых патологических состояниях

Тест может использоваться для диагностики и мониторинга лечения заболеваний скелетных мышц (миопатии), некоторых злокачественных новообразований. Чувствительность и специфичность возрастают при исследовании изоферментов ЛДГ.

Референтные пределы: <250 Ед/л, <4,2 мккат/л.

Увеличением активности фермента сопровождаются:

- застойная сердечная недостаточность (при развитии гипоксии печени и др. органов);
- острые гепатиты (при вирусных гепатитах увеличение в течение первой недели желтушного периода в 2-3 и более раз, при типичном течении нормализация активности на 5-8 нед);
- хронические гепатиты различной этиологии (как правило, лишь в период обострения);
- токсические поражения паренхимы печени;
- миопатии различной этиологии, исключая дистрофию нейрогенного характера (более информативным ферментативным тестом является креатинкиназа);

- острый инфаркт миокарда (начало увеличения через 10-24 ч, максимальная активность через 36-72 ч, нормализация через 10-15 сут и более);

- инфекционный мононуклеоз;
- гемолитическая, мегалобластная анемия.

Аланинаминотрансфераза. Аланинаминотрансфераза (АСТ) относится к группе аминотрансфераз, содержащих в качестве кофермента производное витамина В₆ пиридоксальфосфат. АЛТ катализирует обратимую реакцию дезаминирования аминокислоты аланина. Продукт дезаминирования (пируват) метаболизируется во многих направлениях, включая распад с выделением энергии, синтез глюкозы и другие. Наиболее высокая активность фермента обнаруживается в печени (цитоплазме гепатоцитов), поджелудочной железе, сердце, скелетных мышцах, эритроцитах, почках.

Определение активности АЛТ используется для оценки выраженности цитолитического синдрома при диагностике и мониторинге заболеваний печени. Тест применяется вместе с определением АСТ. При острых вирусных гепатитах активность АЛТ повышается у больных за несколько суток до клинических симптомов или желтухи. Активность АЛТ достигает максимума (повышение в 5-10 раз и более) на 1-2-й неделе острого гепатита, что совпадает с максимальной клинической тяжестью болезни. При неосложненном течении заболевания активность аминотрансфераз приближается к нормальным значениям через 2-5 недель после появления желтухи. Удлинение периода гиперминотрансфераземии может свидетельствовать о переходе острого процесса в хронический, но судить об окончании патологического процесса в печени по этому тесту не всегда возможно. Отсутствие гиперминотрансфераземии не исключает хронизации процесса. При остром алкогольном гепатите происходит повышение активности аминотрансфераз, в большинстве случаев 2-3-кратное (не более чем в 5 раз); как правило, активность АСТ увеличивается в большей степени,

чем АЛТ, что объясняют токсическим повреждением не только гепатоцитов, но и миоцитов, кардиомиоцитов. При хронических персистирующих гепатитах вне обострения активность аминотрансфераз в сыворотке крови, как правило, в референтных пределах; в период обострения повышена у 70–80% больных, но относительно немного – в 2-5 раз.

Референтные значения (ориентировочные): 5 - 40 Ед/л.

Увеличением активности фермента сопровождаются:

- острые и хронические заболевания печени с повреждением паренхимы любой этиологии (гепатиты, цирроз, внутри- и внепечёночный холестаза, инфекционный мононуклеоз);

- шок, сердечная недостаточность с застойными явлениями в печени;
- метастазы рака в печень, первичный рак печени;
- острый инфаркт миокарда, острый миокардит, миопатии;
- травма или операционное повреждение скелетных мышц, печени, миокарда;
- миозит, дерматомиозит;
- гемолитическая анемия, мегалобластная анемия;

Аспаратаминотрансфераза. Аспатаминотрансфераза (АСТ) катализирует обратимую реакцию дезаминирования аминокислоты аспартата. Продукт дезаминирования – щавелевоуксусная кислота метаболизируется во многих направлениях, включая распад с выделением энергии, синтез глюкозы и другие. АСТ широко распространена в органах и тканях организма человека, присутствует в митохондриях и в цитоплазме клеток. Наибольшая активность фермента обнаружена в сердечной мышце, затем, по убыванию, – в печени (в цитоплазме и в митохондриях гепатоцитов), скелетных мышцах, головном мозге, семенниках и почках. Высокая активность АСТ обнаружена в эритроцитах. Определение активности АСТ используется для оценки выраженности цитолитического

синдрома при диагностике и мониторинге заболеваний печени, сердца. Тест используется вместе с определением активности АЛТ.

Референтные значения (ориентировочные): 5-40 Ед/л

Увеличением активности фермента сопровождаются:

- острый инфаркт миокарда;
- острый миокардит;
- острые и хронические заболевания печени с повреждением паренхимы любой этиологии (гепатиты, цирроз);
- инфекционный мононуклеоз;
- гемолитическая анемия, мегалобластная анемия.

Креатинкиназа и ее изоферменты. Креатинкиназа (КК) – фермент, участвующий в энергопродукции, катализирует фосфорилирование креатина и его дефосфорилирование с образованием АТФ. Наибольшая активность фермента выявлена в скелетных мышцах и миокарде, меньшая – в головном мозге, плаценте, гладких мышцах, прямой кишке, предстательной железе и других тканях. Изоферменты КК состоят из двух субъединиц, обозначаемых как М («*muscle*» – мышца) и В («*brain*» – мозг). Известно три цитоплазматических изофермента, различающихся комбинацией субъединиц: ММ-КК, МВ-КК, ВВ-КК. Общей КК называют их суммарную активность в сыворотке крови. В веществе головного мозга КК представлена почти на 100% ВВ-КК. В скелетных мышцах присутствует в основном ММ-КК. В наибольших количествах МВ-КК присутствует в миокардиоцитах. Именно поэтому увеличение в сыворотке крови МВ-КК – один из наиболее специфичных показателей цитолиза и некроза кардиомиоцитов.

ВВ-КК – изофермент, не проходит гематоэнцефалический барьер и в норме в сыворотке или плазме крови не обнаруживается. Общая КК крови в норме состоит на 95% из ММ-КК и на 5% из МВ-КК.

Определение активности КК используется для выявления и мониторинга цитолитического синдрома при заболеваниях миокарда и скелетной мускулатуры. При диагностике острого инфаркта миокарда,

миокардитов специфичным показателем повреждения миокарда является увеличение МВ-КК. Для дифференциальной диагностики нейрогенных мышечных заболеваний и миопатий, а также для наблюдения за течением последних определение сывороточной активности КК является наиболее информативным ферментативным тестом. Мышечная слабость, истощение и боль могут наблюдаться как при миопатиях, так и при нарушении иннервации, однако многие формы миопатий сопровождаются специфическим увеличением активности КК сыворотки крови, а при нейрогенных заболеваниях мышц подобные изменения отсутствуют. Изменения КК в сыворотке могут иметь место в доклинический период наследуемых миопатий, а также при носительстве (доказано для дистрофии Дюшена). При интерпретации лабораторных данных необходимо учитывать, что наиболее высокие величины гиперферментемии удаётся обнаружить на ранних стадиях миопатий. Позже, когда значительная часть мышечной ткани уже претерпела патологические изменения и биосинтез КК в мышцах снижен, уровень КК сыворотки может быть понижен.

Референтные значения /ориентировочные/: женщины < 170 Ед/л,
мужчины < 190 Ед/л

Увеличением активности фермента сопровождаются:

- острый инфаркт миокарда (повышение активности, часто коррелирующее с обширностью инфаркта, может быть обнаружено через 4-6 ч после инфаркта, максимум достигается через 12-24 ч, снижение – через 2-4 сут; в первые 12 ч после болевого приступа активность повышена в 80-89% случаев крупноочагового инфаркта и в 60-64% мелкоочагового.

- острые миокардиты (инфекционные и токсические);
- заболевания скелетных мышц: полимиозиты, дерматомиозиты, мышечные дистрофии;
- злокачественная гипертермия;
- судороги;

- алкоголизм.

Гамма-глутамилтранспептидаза. Гамма-глутамилтранспептидаза (ГГТ) – фермент, катализирующий реакции переноса аминокислот из плазмы крови в клетки, а также реакции в процессах реабсорбции аминокислот из желчи и мочи в кровь. В значительных количествах фермент обнаруживается в эпителии извитых канальцев нефрона, в желчных канальцах и ближайших к просвету частях эпителиальных клеток, выстилающих желчный проток. Наибольшая активность фермента отмечается в цитоплазме и гладком эндоплазматическом ретикулуме (микросомах) гепатоцитов, расположенных в области воротной вены. Основным источником сывороточной активности фермента являются гепатоциты.

Определение активности ГГТ используется для диагностики и мониторинга лечения заболеваний печени и билиарного тракта. Повышение фермента при этом является многозначным: отражает внутри- и внепечёночный холестаз (вследствие деструкции желчевыводящих путей), в некоторой степени – цитолиз паренхиматозных клеток (фермент менее чувствителен к повреждениям паренхимы, чем аминотрансферазы), является показателем индукции микросомальной гамма-глутамилтрансферазы алкоголем и гепатотоксичными лекарственными препаратами, может отражать поражение печени злокачественным процессом. При острых вирусных гепатитах происходит увеличение активности ГГТ до 10 раз (чаще в 5 раз), это обусловлено в основном холестазом, поэтому при холестатической форме гиперферментемия более выражена; сроки максимума сходны с таковыми для аминотрансфераз, нормализация происходит позже. При алкогольном гепатите активность ГГТ увеличивается в 20 раз, при лекарственном – варьирует в зависимости от природы и дозы лекарственного препарата. Увеличение активности ГГТ может выявляться при отсутствии повышения активности аминотрансфераз. При гепатоцеллюлярной карциноме у 90% больных без желтухи активность ГГТ увеличивается в 10-20 раз, с желтухой – до 30 раз. Увеличение активности

возможно задолго до появления клинических симптомов и изменения других биохимических показателей. При метастазах в печень активность ГГТ наиболее высокая наблюдается при поражениях в области воротной вены или по ходу желчных путей. Особую ценность тест представляет для выявления патологий гепатобилиарной системы у детей (после 2 лет) и беременных, когда сывороточная активность других ферментов повышена физиологически. Сывороточная активность фермента не меняется при патологии костной ткани, поэтому тест используется для установления источника повышенной активности щелочной фосфатазы: если ЩФ и ГГТ повышены одновременно – то это показатель поражения печени, если увеличена только ЩФ, то скорее это поражение костной ткани.

Референтные значения /ориентировочные/: женщины <30 Ед/л ,
мужчины <50 Ед/л

Увеличением активности фермента сопровождаются:

- обтурация внутри- и внепечёночных желчных путей;
- острые и хронические гепатиты;
- инфекционный мононуклеоз с поражением печени;
- токсические поражения печени;
- панкреатит острый и хронический;
- нефротический синдром.

Альфа-амилаза. Фермент, катализирующий гидролитическое расщепление крахмала и гликогена пищи до мальтозы. Секретируется в полость рта слюнными железами (изоферменты амилазы S-типа) и в ЖКТ поджелудочной железой (изоферменты амилазы Р-типа). Основными источниками фермента сыворотки крови в норме являются слюнные железы и поджелудочная железа. Оба изофермента α -амилазы имеют молекулярную массу около 45 кД, поэтому фильтруются в почках и экскретируются с мочой. Тем не менее, в составе мочи больший удельный вес приходится на панкреатический изофермент. Кроме поджелудочной железы источниками α -

амилазы могут быть слюнные железы, легкие, щитовидная железа, слизистая оболочка кишечника и некоторые ткани женской половой системы.

Референтные значения : взрослые до 70 лет - 25–125 Ед/л , старше 70 лет 20–160 Ед/л.

Увеличением активности фермента в крови в 5-10 раз сопровождаются:

- острый панкреатит;
- почечная недостаточность;
- тяжёлый диабетический кетоацидоз;

До 5 раз:

- киста или псевдокиста поджелудочной железы;
- острый холецистит;
- кишечная непроходимость;
- абдоминальная травма;
- заболевания слюнных желёз: эпидемический паротит, камни в слюнной железе или её протоке;
- макроамилаземия (образование комплексов амилазы с белками плазмы, имеющими большой молекулярный вес) в связи с этим снижено выведение амилазы почками (может быть у здоровых людей).

Холинэстераза. Различают два типа холинэстераз, катализирующих реакции гидролиза различных эфиров: первый – истинная ХЭ (холинэстераза I, ацетилхолинэстераза) содержится преимущественно в эритроцитах, нервно-мышечных синапсах скелетной мускулатуры, центральной нервной системе; второй – S-псевдохолинэстераза или холинэстераза II – находится в сыворотке (плазме) крови, печени, гладкой мускулатуре.

Определение активности ХЭ используется для раннего выявления и оценки степени снижения белоксинтезирующей функции печени, а также для диагностики острых и хронических отравлений фосфоорганическими

соединениями (карбофос, хлорофос), которые необратимо связываются с холинэстеразами и ингибируют их (ингибируются ХЭ I и ХЭ II). Накопление в нервных синапсах ацетилхолина приводит к нарушениям проводимости в симпатической нервной системе.

У некоторых больных после введения мышечных релаксантов наступает длительный период апноэ и/или миорелаксации. Это ассоциируется с низкой активностью или отсутствием ХЭ в сыворотке крови, что может быть связано либо с врождённой наследуемой недостаточностью ХЭ, либо с хроническим отравлением фосфоорганическими соединениями.

Референтные значения: 5300-12900 Ед/л

Снижением активности фермента сопровождаются:

- генетически обусловленный вариант;
- отравления фосфорорганическими инсектицидами (острое отравление – полное отсутствие активности, хроническое – снижение на 25-50% в сравнении с нормой, нормализация после исключения контакта с ядом через 6 нед);
- заболевания печени (хронические гепатиты, цирроз);
- метастазирующий рак различной локализации;
- дерматомиозиты;
- мышечные дистрофии.

Кислая фосфатаза. Кислая фосфатаза (КФ) – группа ферментов, катализирующих гидролитическое отщепление фосфатной группы от различных органических соединений с максимальной активностью в кислой среде. Ферменты присутствуют в лизосомах печени, селезёнки, эритроцитах, тромбоцитах, костном мозге, макрофагах и остеокластах. Самая высокая активность кислой фосфатазы отмечается в предстательной железе (простатическая кислая фосфатаза). У мужчин половину содержащейся в сыворотке крови кислой фосфатазы вырабатывает предстательная железа, остальное дают печень и разрушающиеся тромбоциты, эритроциты. У

женщин источниками фермента сыворотки крови являются печень, эритроциты и тромбоциты. Большинство тканей содержит несколько изоферментов кислой фосфатазы.

Референтные значения : женщины <5,5 Ед/л , мужчины <6,5 Ед/л

Увеличением активности фермента сопровождаются:

- рак простаты (при костных метастазах активность повышается в 40-50 раз);
- аденома простаты;
- опухоли с метастазами в костную ткань;
- гемолитическая анемия;
- тромбоэмболии и др. состояния с повышенным разрушением тромбоцитов;
- гиперпаратиреоз.

Щелочная фосфатаза и ее фракции. Щелочной фосфатазой (ЩФ) называют группу ферментов, катализирующих гидролитическое отщепление фосфатной группы от различных органических соединений с максимальной активностью в щелочной среде. ЩФ широко распространена в тканях человека, особенно много этого фермента в слизистой оболочке кишечника, остеобластах (остеокласты не содержат фермента), эпителиоцитах желчных протоков, образующих просвет желчных канальцев в гепатоцитах, проксимальных отделах извитых канальцев почек, плаценте, лёгких. Несмотря на наличие множественных форм ЩФ в тканях организма, в сыворотке крови чаще всего обнаруживают печеночный и костный изофермент. Формы ЩФ, обнаруживаемые в сыворотке больных с различными заболеваниями, сохраняют признаки, характерные для фермента, находящегося в ткани печени, кости, слизистой кишечника, плаценты. Определение активности ХЭ используется для выявления и мониторинга поражений костей, сопровождающихся повышением активности остеобластов. Значительное увеличение костной щелочной фосфатазы

наблюдается при росте костей. Высокую активность ЩФ выявляют у больных со злокачественными опухолями костей, с метастазами в кости. В гепатоцитах при любой форме нарушения желчевыведения происходит ускорение синтеза ЩФ. Некоторое количество вновь синтезированного фермента способно поступать в кровоток и приводить к повышению активности фермента в сыворотке крови.

Референтные значения: дети <480 Ед/л, взрослые <150 Ед/л

Увеличением активности фермента сопровождаются:

обусловленное повреждением гепатобилиарной системы:

- холестаз при гепатитах, метастазах в печени, циррозах, первичном раке печени, инфекционном мононуклеозе с поражением печени;

- холангит, холангиолит;

обусловленное увеличением функциональной активности остеобластов:

- болезнь Педжета;

- метастазы рака (остеобластные) в кости;

- остеогенная саркома;

- остеомалация;

- первичный и вторичный гиперпаратиреоз при вовлечении скелета;

- саркома, миелома, костный туберкулёз, лейкозы.

Липаза. Липаза – фермент, катализирующий гидролиз триглицеридов (нейтрального жира) с высвобождением жирных кислот в клетках жировой ткани, а также в тонкой кишке, куда фермент секретируется поджелудочной железой. Увеличение активности в сыворотке крови, как правило, является следствием цитолиза и некроза ацинарных клеток поджелудочной железы.

Определение активности липазы используется для диагностики и мониторинга острого и хронического панкреатита. В отличие от альфа-амилазы активность липазы не повышается при паротите, внематочной беременности, аппендиците.

Референтные значения: взрослые <190 Ед/л

Увеличением активности фермента сопровождаются:

- острый панкреатит любой этиологии (начало увеличения через 4–8 ч, максимальная активность через 24 ч, снижение до референтного уровня через 8-14 суток;
- рак поджелудочной железы;
- киста или псевдокиста поджелудочной железы;
- перфорации кишечника;
- перитонит.

5.2.3. Диагностическое значение профилей ферментов при патологии

Разные ткани содержат ферменты в разных количествах. При этом около 90 % диагностически значимых случаев повышения ферментативной активности сыворотки связано с выходом ферментов из поврежденных эритроцитов, печени, сердца или скелетных мышц. Тканевое соотношение ферментов практически воспроизводится в сыворотке при тяжелых некротических поражениях этих тканей (табл. 5.17).

Таблица 5.17

Относительное повышение ферментов в сыворотке при тяжелых органических поражениях с клеточным некрозом

Ткань	Повышение ферментов в сыворотке/плазме
Паренхима печени	ЛДГ > АСТ > АЛТ
Сердечная мышца	КК > ЛДГ > АСТ >> АЛТ
Скелетная мышца	КК >> ЛДГ > АСТ >> АЛТ
Эритроциты	ЛДГ >> АСТ > АЛТ

При острых клинических симптомах неясной органной патологии ферментные профили могут предоставить важную информацию о локализации патологического процесса. Относительное повышение активности ферментов в сыворотке при острой загрудинной или абдоминальной боли представлено в табл. 5.18.

Относительное повышение активности сывороточных ферментов при острой загрудинной или абдоминальной боли

Инфаркт миокарда	Умеренное ↑ трансаминаз: КК > АСТ > АЛТ >> α-амилаза >> ГлДГ
Острая правожелудочковая недостаточность	Значительное ↑ трансаминаз: АСТ ~АЛТ > ГлДГ >> КК >> α-амилаза
Эмболия легочной артерии	Нет или слабое ↑ трансаминаз: АЛТ > АСТ > ЛДГ > КК > α-амилаза
Плеврит	Обычно ферментативная активность не повышается
Окклюзия сосудов в брюшной полости	Умеренное/Значительное ↑/↑ трансаминаз: АСТ ~АЛТ > α-амилаза > ГлДГ > КК
Острый панкреатит	Нет или слабое ↑ трансаминаз: липаза > α-амилаза >>АЛТ > АСТ > ГлДГ >> КК
Печеночная колика (окклюзия желчного протока)	Умеренное ↑ трансаминаз: АЛТ > АСТ > ГлДГ > α-амилаза >> КК
Почечная колика	Обычно ферментативная активность не повышается
Шок	Значительное ↑ трансаминаз: КК >> АСТ ~АЛТ > ЛДГ > α-амилаза

Заболевания сердечно-сосудистой системы. Дифференциально-диагностическим критерием часто бывает не только уровень, но и динамика активности ферментов в сыворотке. Так, ферменты миокардиального профиля – КК, АСТ, АЛТ, ЛДГ-1 примерно одинаково повышаются после ограниченного инфаркта миокарда, кардиомиопатии или тяжелой физической нагрузки. Однако после инфаркта период подъема ферментов сразу же меняется периодом нормализации, тогда как в других случаях повышение стабильно, активность ферментов поддерживается на высоком уровне на протяжении длительного периода. Поэтому при инфаркте миокарда один из критериев диагностики – «повышение и последующее снижение активности кардиоспецифических ферментов в сыворотке», т.е. необходимо динамическое исследование ферментов.

Невозможность унификации нормальных значений для активности ферментов, влияние на них многочисленных факторов, существенно изменяющихся при лечении пациентов, явилось одной из причин внедрения

методов определения ферментов по массе. Это особенно важно при острой патологии, так как ферменты являются белковыми маркерами степени и органоспецифичности повреждения тканей и органов. Массовую концентрацию ферментов в биологических жидкостях организма определяют методами иммунохимического анализа. В отличие от методов, основанных на определении активности фермента, методы иммунохимического анализа позволяют определять массовую концентрацию фермента вне зависимости от его каталитической активности, присутствия ингибиторов или других соединений, вмешивающихся в протекание ферментативной реакции. На этом основано определение массовой концентрации изофермента креатинкиназы МВ. КК-МВ остается единственным рекомендованным ферментом, наряду с тропонином, миоглобином и другими белковыми маркерами, для диагностики острого инфаркта миокарда. Этот тест в настоящее время реализован на большинстве иммунохимических систем, предназначенных для выполнения экспресс-анализов в клинике.

Заболевания печени. Печень – паренхиматозный орган, то есть внутри нет соединительно-тканного скелета, клетки примыкают друг к другу, весь орган покрыт капсулой. Такое анатомическое строение обуславливает массивный ответ клеток на повреждение. При повышении внутрипеченочного давления и появлении очага повреждения происходит массивное сдавление клеток в пределах печеночной доли. У внутрипеченочных желчных протоков также нет соединительно-тканной оболочки, поэтому внутрипеченочный холестаз приводит к повреждению и гепатоцитов. В табл. 5.19 представлены данные повышения активности ферментов печеночного профиля при разных по этиологии заболеваниях печени.

Таблица 5.19

Относительное повышение активности сывороточных ферментов при заболеваниях печени

Острый вирусный	Значительное ↑ трансаминаз: АЛТ > АСТ ~ ЛДГ >> ГГТ ~
-----------------	--

гепатит	ЩФ ; АСТ/АЛТ \leq 1,0
Острый некроз печени (интоксикация ССl ₄ , циркуляторные нарушения)	Значительное \uparrow трансаминаз: ЛДГ > АСТ > АЛТ ~ ГлДГ; АСТ/АЛТ > 2,0
Алкогольное поражение печени	Умеренное \uparrow трансаминаз: ГГТ > АСТ > АЛТ > ~ ЩФ; АСТ/АЛТ > 1,0
Обструкция желчевыводящих путей	Умеренное \uparrow трансаминаз: ЩФ ~ ГГТ > АЛТ > АСТ ; АСТ/АЛТ < 1,0
Хронический гепатит	Умеренное \uparrow трансаминаз АСТ > АЛТ ~ ЛДГ ~ ГГТ > ЩФ; АСТ/АЛТ > 1,0
Цирроз печени	Слабое \uparrow трансаминаз: АСТ > АЛТ ~ ГГТ (цирроз после гепатита); ГГТ \gg АСТ (алкогольный цирроз, билиарный цирроз); АСТ/АЛТ > 2,0
Метастазы в печень	Слабое \uparrow / умеренное \uparrow трансаминаз: ЩФ ~ ГГТ > АСТ > АЛТ ; АСТ/АЛТ > 2,0

Синдром цитолиза характерен для инфекционного гепатита, токсических поражений печени, отравлений. Цитолиз обусловлен нарушением целостности мембран гепатоцитов, их органелл, проявляется гиперферментемией в сыворотке. Индикаторными ферментами повреждения гепатоцитов являются АЛТ, АСТ, ЛДГ. Повышение в плазме крови трансаминаз является чувствительным показателем повреждения плазматической и митохондриальной мембран. При воспалительных и инфекционных заболеваниях, таких как вирусный гепатит, повреждается в основном плазматическая мембрана, происходит выход содержимого цитоплазмы из клетки, повышается в сыворотке крови преимущественно АЛТ. При инфильтративных нарушениях повреждаются как митохондриальные, так и плазматические мембраны, при этом пропорционально из клеток выходят обе трансаминазы, часто в сыворотке в большей степени увеличивается АСТ, чем АЛТ.

Синдром внутри- и внепеченочного холестаза. К ферментам эндотелия желчных протоков относятся щелочная фосфатаза (ЩФ), гаммаглутамилтранспептидаза (ГГТ). Наиболее распространенным тестом холестаза является повышение в сыворотке активности ЩФ. Если повышена активность в сыворотке только ЩФ, то, при отсутствии костной патологии, это самый ранний показатель возможного обширного вовлечения печени в

патологический процесс. Совместное повышение в сыворотке ЩФ и ГГТ – четкий признак синдрома холестаза. Для синдрома холестаза характерно также повышение конъюгированного билирубина.

Синдром токсического поражения гепатоцитов. Алкоголь оказывает прямое повреждающее действие на клетки печени, однако серьезные клинические поражения печени возникают только у 10 - 20 % алкоголиков. В плазме крови активность трансаминаз и содержание билирубина повышаются незначительно. Повышение активности ГГТ при приеме алкоголя является первым симптомом токсического влияния на печень. Длительное повышение в плазме активности ГГТ ассоциируются с макроцитозом, гиперурикемией и гипертриглицеридемией и доказывает хроническое алкогольное поражение. Но эти данные не могут быть использованы для диагностики алкоголизма.

Заболевания поджелудочной железы. Поджелудочная железа синтезирует несколько грамм белка ферментов и секретирует 1-2 л пищеварительного сока в день. В железе образуются активные ферменты α -амилаза и липаза и неактивные предшественники протеолитических ферментов – трипсиноген, химотрипсиноген, которые затем активируются в двенадцатиперстной кишке. Примерно треть α -амилазы сыворотки крови происхождения из поджелудочной железы ($2/3$ – это изофермент слюнных желез), тогда как липаза сыворотки практически полностью синтезирована поджелудочной железой. Из-за низкой молекулярной массы амилаза фильтруется в клубочках почек и присутствует в моче, липаза в мочу не попадает.

При остром панкреатите тестами выбора являются определение активности α -амилазы и липазы. Широко распространено мнение, что α -амилаза более чувствительна, а липаза более специфична. Одновременное определение в сыворотке α -амилазы и липазы позволяет со специфичностью в 98 % диагностировать поражение поджелудочной железы.

Хронический панкреатит – воспаление ткани поджелудочной железы, приводящее к фиброзу, потере экзокринной ткани и, следовательно, к дисфункции железы. Основной причиной хронического панкреатита является алкоголизм. Хронический панкреатит медленно, но неуклонно прогрессирует, при этом нарушается не только экзокринная, но и эндокринная функция поджелудочной железы. Исследование активности α -амилазы и липазы дает патологические значения только при обострениях.

Рак поджелудочной железы развивается из эпителия выводных протоков и ацинарных клеток. Эта опухоль составляет 3-4 % от всех злокачественных опухолей. О малигнизации поджелудочной железы свидетельствуют потеря веса, сильные боли в эпигастральной области и желтуха. Диагноз затруднен. Активность α -амилазы и липазы в сыворотке, как правило, не меняются. На рак поджелудочной железы может указать повышение активности в сыворотке ГГТ, особенно, если активность фермента увеличивается на фоне нормальных значений активности АСТ и АЛТ.

Заболеваний скелетных мышц. Повреждение скелетных мышц может сопровождаться повышением в сыворотке активности КК, ЛДГ, АСТ и АЛТ. При дистрофии мышц в сыворотке существенно повышается активность КК и трансаминаз, что связано с выходом этих ферментов из распадающихся клеток. Повышение КК при этом более специфично и имеет следующие особенности:

- активность КК в сыворотке наиболее высока (превышает в 10 и более раз верхнюю границу нормы) в начальной стадии болезни. В более поздний период, когда прекращается активный процесс дистрофии мышц, активность фермента в сыворотке уменьшается и даже нормализуется;
- активность фермента в сыворотке существенно выше после физической нагрузки, следующей за периодом отдыха, чем при длительной физической активности.

Схожие по характеру изменения активности ферментов могут быть при миозитах, но уровень изменений при этом существенно выше. При нейрогенных болях мышц в случаях миастении беременных, рассеянном склерозе, полиомиелите, паркинсонизме активность ферментов в сыворотке нормальная.

5.3. Основы биохимии и патобиохимия углеводов

Углеводы – альдегиды и кетоны многоатомных спиртов. В зависимости от числа атомов углерода в молекуле моносахарида различают триозы, тетрозы, пентозы, гексозы и т.д. Моносахариды соединяются посредством гликозидной связи, образуя дисахариды, олигосахариды (до 6 моносахаридных остатков) и полисахариды (гликоген, крахмал). Углеводы образуют соединения с белком (гликопротеиды и протеогликаны), липидами (гликолипиды) и другими веществами. В организме наиболее распространены пентозы (входят в состав нуклеиновых кислот и коферментов, в частности НАДФ) и гексозы (глюкоза, фруктоза, галактоза). В организме человека сахара представлены в основном D-изоформами, именно к этой изоформе специфичны ферментные системы и транспортные белки, переносчики углеводов через клеточную мембрану.

5.3.1. Обмен глюкозы

Регуляция обмена глюкозы в организме. Среди моносахаридов наибольшая скорость и доля всасывания у глюкозы (95%). Другим быстро всасываемым моносахаридом является галактоза. Глюкоза гидрофильна, поэтому простая диффузия через липидный бислой клеточной мембраны энтероцита для нее затруднена. Транспорт глюкозы из просвета тонкой кишки через энтероциты осуществляется с помощью белкового натрий-глюкозного транспортера, в этом процессе принимает участие

мембраносвязанная Na,K-АТФаза. Кроме того, имеется собственный транспортер глюкозы GluT-5, который помимо глюкозы осуществляет транспорт фруктозы. Глюкоза практически вся всасывается достаточно быстро. Другие сахара, такие как манноза, ксилоза, арабиноза всасываются только пассивной диффузией.

Всосавшаяся в тонкой кишке глюкоза поступает через воротную вену в печень и попадает в гепатоциты. В клетках печени глюкоза фосфорилируется в гексокиназной реакции, превращаясь в глюкозо-6-фосфат (Гл-6-Ф), Гл-6-Ф является субстратом нескольких путей метаболизма: синтеза гликогена, пентозофосфатного цикла, гликолитического распада до лактата или аэробное полное расщепление до CO_2 и H_2O . В клетках, способных к глюконеогенезу (клетки печени, почек, кишечника), Гл-6-Ф может дефосфорилироваться Гл-6-фосфатазой и в виде свободной глюкозы поступать в кровь и переноситься в другие органы и ткани.

Особенно важна глюкоза для клеток мозга. Клетки нервной системы зависят от глюкозы как от основного энергетического субстрата. В то же время в мозге нет запасов глюкозы, она там не синтезируется, нейроны не могут потреблять другие энергетические субстраты, кроме глюкозы и кетонных тел, глюкоза практически полностью может исчерпываться из внеклеточной жидкости, так как клетки нервной системы потребляют глюкозу инсулин-независимым путем.

Концентрация глюкозы в крови зависит от скорости ее поступления в систему циркуляции и интенсивности утилизации. Диапазон нормальных значений для сыворотки и плазмы натощак 3,8-6,1 ммоль/л, что соответствует в цельной крови 3,3-5,5 ммоль/л. Разница между сывороткой и цельной кровью обусловлена эритроцитами и лейкоцитами, в которых объем водной фазы меньше, чем в сыворотке крови, а глюкоза растворена только в водной фазе. Для клиницистов, которые зачастую не вникают в соотношения между плазмой и цельной кровью, следует приводить значения к концентрации глюкозы в плазме венозной крови.

Уровень глюкозы в крови является важнейшим фактором гомеостаза. Он поддерживается на определенном уровне функцией кишечника, печени, почек, поджелудочной железы, надпочечников, жировой ткани и других органов. На уровень глюкозы в крови влияет широкий спектр гормонов, при этом инсулин является единственным гормоном, снижающим глюкозу в крови. Контринсулярным действием с повышением уровня глюкозы крови обладают глюкагон, адреналин, глюкокортикоиды, соматотропный гормон (СТГ), аденокортикотропный гормон (АКТГ), тиреоидные гормоны, глюкагон. Эффекты инсулина и контринсулярных гормонов в норме контролируют достаточно стабильный уровень глюкозы в крови. При низкой концентрации инсулина, в частности при голодании, усиливаются гипергликемические эффекты других гормонов, таких как СТГ, глюкокортикоиды, адреналин и глюкагон. В таблице 5.20 представлены основные эффекты гормонов на метаболизм глюкозы.

Таблица 5.20

Гормоны, контролирующие гомеостаз глюкозы

Гормон	Механизм действия
Инсулин	<i>увеличивает:</i> потребление глюкозы клетками, синтез гликогена, синтез белков, синтез жирных к-т и триглицеридов; <i>снижает:</i> глюконеогенез, гликогенолиз, кетогенез, липолиз, катаболизм белка
Глюкагон	<i>увеличивает:</i> гликогенолиз, глюконеогенез, кетогенез, липолиз
Адреналин	<i>увеличивает:</i> гликогенолиз, липолиз
Гормон роста	<i>увеличивает:</i> гликогенолиз, липолиз
Кортизол	<i>увеличивает:</i> глюконеогенез, синтез гликогена, протеолиз <i>снижает:</i> потребление глюкозы клетками

Гипо- и гипергликемии. Причины развития. Гипогликемия – состояние, при котором концентрация глюкозы в крови уменьшается до 2,7 ммоль/л и меньше и есть клинические симптомы. Большинство спонтанно возникающих гипогликемий относится к реактивным. У этих пациентов уровень гликемии натощак обычно находится в пределах нормы, в то время

как постпрандиальный – через несколько часов после еды – снижен. Симптомы реактивной гипогликемии, в основном, адренергические по своей природе и имеют временный характер. Гипогликемия возникает чаще всего в результате лечения сахарного диабета (СД) инсулином или пероральными гипогликемическими препаратами без достаточного потребления углеводов. В отсутствии СД гипогликемия бывает реже. В любом случае гипогликемия требует безотлагательного лечения, поиска и устранения провоцирующих ее факторов. Патофизиологические причины и клинические проявления гипогликемии представлены в табл. 5.21.

Таблица 5.21

Причины и признаки гипогликемии

Гипогликемия	
Причины	Клинические признаки
Реактивная гипогликемия Вызванная лекарственными препаратами инсулин сульфонилмочевинные препараты Гипогликемия после еды после операции на желудке начало сахарного диабета («ранний диабет») Алкоголь-индуцированная Врожденные метаболические нарушения галактоземия врожденная непереносимость фруктозы Гипогликемия в состоянии натошак Эндокринные заболевания недостаточность надпочечников повреждение на уровне гипоталамуса недостаточность АКТГ или глюкокортикоидов Врожденные метаболические заболевания: болезнь накопления гликогена I типа (Гирке) Гиперинсулинизм: инсулинома незидиобластоз	Острая гипогликемия Симптомы из-за нейрогликопении: слабость, голод затуманенное сознание обмороки парестезии гемипарезы конвульсии кома Симптомы из-за симпатической стимуляции сердцебиение и тахикардия профузная рвота, понос прилив крови к лицу тремор боязливость, ощущение страха Хроническая гипогликемия изменение личности потеря памяти психоз деменция

Стимуляция транспорта глюкозы из крови в клетки и активация фермента глюкокиназы (гексокиназы) инсулином ведут к усилению всех процессов утилизации глюкозы в тканях-мишенях для этого гормона (печень, скелетные мышцы, жировая ткань). Инсулиновая недостаточность,

развивающаяся вследствие ослабления продукции инсулина поджелудочной железой и/или снижения числа рецепторов к инсулину на клетках-мишенях, ведет к гипергликемии после приема углеводов с пищей (в течении 1-2 часа при нарушении толерантности к глюкозе, в течение 8 и более часов при сахарном диабете).

Причины гипергликемии:

- умеренная физическая нагрузка;
- эмоциональный стресс;
- боль;
- сахарный диабет;
- увеличение продукции гипергликемических гормонов (феохромоцитома, тиреотоксикоз, акромегалия, гигантизм, синдром Кушинга);
- снижение продукции инсулина при заболеваниях поджелудочной железы (острый и хронический панкреатит, опухоли поджелудочной железы);
- травма, опухоли, операционные повреждения головного мозга, кровоизлияние в мозг.

Глюкозурии. *Клиническое значение определения глюкозы в крови и моче.* В норме глюкоза, как беспороговое вещество, фильтруется в клубочках почек, но затем практически полностью реабсорбируется в проксимальных канальцах. В реабсорбции принимают участие транспортные белки и гексокиназа, осуществляющая фосфорилирование глюкозы для удержания ее в клетках эпителия канальцев. В норме реабсорбция составляет примерно 300 мг в мин или около 1,7 ммоль в мин. На появление глюкозы в моче влияет концентрация ее в крови. Концентрация глюкозы в крови, при превышении которой глюкоза появляется в моче, называется *почечным порогом*. Он равен для глюкозы 8,8-9,9 ммоль/л. На появление глюкозы в моче влияет величина клубочковой фильтрации. В норме она равна примерно 130 мл/мин. При возникновении нефропатии с резким снижением фильтрационной способности почек объем фильтрации уменьшается, следовательно, в первичную мочу попадает меньшее количество глюкозы и она успевает вся реабсорбироваться. Таким образом, даже при достаточно высоких цифрах

глюкозы в крови при нарушении фильтрации и сохраненной способности к реабсорбции глюкоза может отсутствовать в моче.

Несмотря на то, что сахарный диабет является наиболее частой причиной глюкозурии, тем не менее, глюкоза в моче может появляться при снижении почечного порога для глюкозы. Это может быть при беременности (из-за снижения реабсорбции) или быть результатом врожденной или приобретенной патологии проксимальных канальцев почек (например, синдром Фалькони). Поэтому глюкозурия не может быть использована для диагностики сахарного диабета. Однако у больных с установленным диагнозом – сахарный диабет – исследование глюкозы в моче является эффективным способом слежения за состоянием больного и контроля эффективности лечения.

5.3.2. Метаболический синдром

Критерии метаболического синдрома. Согласно рекомендациям экспертов Всероссийского научного общества кардиологов к критериям диагностики относятся основной признак и дополнительные критерии.

Основной признак: центральный (абдоминальный) тип ожирения – окружность талии (ОТ) более 80 см у женщин и более 94 см у мужчин.

Дополнительные критерии:

- артериальная гипертензия (артериальное давление (АД) $\geq 140/90$ мм Hg);
- повышение уровня триглицеридов ($\geq 1,7$ ммоль/л);
- снижение уровня холестерина липопротеинов высокой плотности (ЛПВП) ($< 1,0$ ммоль/л у мужчин; $< 1,2$ ммоль/л у женщин);
- повышение уровня холестерина липопротеинов низкой плотности (ЛПНП) ($> 3,0$ ммоль/л);
- гипергликемия натощак (глюкоза в плазме крови натощак $\geq 6,1$ ммоль/л);

- нарушение толерантности к глюкозе (глюкоза в плазме крови через 2 часа после нагрузки глюкозой в пределах $\geq 7,8$ и $< 11,1$ ммоль/л).

Наличие у пациента центрального ожирения и двух дополнительных критериев является основанием для диагностирования у него МС.

Метаболический синдром включает нарушение толерантности к глюкозе или сахарный диабет 2 типа, абдоминальное ожирение, дислиппротеинемию, ишемическую болезнь сердца (ИБС), артериальную гипертензию, гиперурикемию. Указанные патологические процессы являются факторами риска развития атеросклероза, который при сочетании нескольких из них многократно возрастает. Метаболический синдром постепенно и длительное время протекает без явной клинической симптоматики. Зачастую уже развитие осложнений заставляет больных обратиться за медицинской помощью. Важно диагностировать метаболический синдром на ранних этапах его развития, поскольку уже тогда он представляет угрозу развития в скором времени СД 2 типа и атеросклеротических процессов.

Патогенез метаболического синдрома. Имеется разница между разными типами ожирения, отложение жира в верхней половине туловища связано с множеством заболеваний. Висцеральная жировая ткань, в отличие от жировой ткани другой локализации, богаче иннервирована, имеет более широкую сеть капилляров и непосредственно сообщается с портальной системой. Висцеральные адипоциты имеют высокую плотность β_3 -адренорецепторов, кортикостероидных и андрогенных рецепторов и относительно низкую плотность α_2 -адренорецепторов и рецепторов к инсулину. Эти особенности определяют высокую чувствительность висцеральной жировой ткани к липолитическому действию катехоламинов и низкую чувствительность к антилиполитическому действию инсулина, особенно в постпрандиальный период. Интенсивный липолиз в висцеральных адипоцитах приводит к выделению большого количества свободных жирных кислот (СЖК), преимущественно в портальную

циркуляцию и печень. В печени СЖК препятствуют связыванию инсулина гепатоцитами, обуславливая развитие инсулинорезистентности, снижение экстракции инсулина печенью и развитие системной гиперинсулинемии. В свою очередь, гиперинсулинемия через нарушение ауторегуляции инсулиновых рецепторов усиливает периферическую инсулинорезистентность. Попадая в системный кровоток, СЖК способствуют нарушению поглощения глюкозы и ее утилизации в мышечной ткани и, таким образом, усилению периферической инсулинорезистентности.

Рецепторы в подкожно-жировой клетчатке и внутреннем жире совершенно разные, а поэтому там иначе протекают липолиз и липогенез. В подкожной и висцеральной жировой ткани выявлены различия в продукции лептина. Разная эндокринная активность может также быть причиной большей опасности внутреннего жира. Вещества, вырабатываемые жировой тканью (табл. 5.22), могут влиять на активность метаболических процессов в тканях и различных системах организма, либо непосредственно, либо опосредованно, через нейроэндокринную систему, взаимодействуя с гормонами гипофиза, катехоламинами, инсулином.

Таблица 5.22

Биологически активные метаболиты жировой ткани

Лептин	Ингибитор активатора плазминогена –1 (РАI-1)
Адипонектин	Трансформирующий ростовой фактор В
Резистин	Ангиотензиноген
Фактор некроза опухолей- α (ФНО- α)	Липопротеиновая липаза
Интерлейкин-6 (ИЛ-6)	Гормончувствительная липаза
Свободные жирные кислоты	Протеин, переносящий эфиры холестерина
Протеин, стимулирующий ацетилирование	

Критерии лабораторной диагностики метаболического синдрома.

Инсулинорезистентность – необходимый критерий диагноза метаболического синдрома. Инсулинорезистентность устанавливается на основании выявления одного из следующих признаков: СД 2 типа, повышение уровня глюкозы крови натощак, нарушение толерантности к углеводам. Пероральный глюкозотолерантный тест (ПГТТ) – самый

простой способ определения нарушения чувствительности тканей к инсулину. В ПГТТ проводят определение инсулина и С-пептида натощак и через 2 ч после дачи 75 г глюкозы. Даже при нормальном ответе со стороны глюкозы в ПГТТ существенное увеличение инсулина и С-пептида свидетельствует о наличии инсулинорезистентности. Исследование уровня С-пептида в крови может служить более точным подтверждением гиперсекреции инсулина поджелудочной железой, так как известны некоторые методические ограничения при лабораторном определении иммунореактивного инсулина в крови, который на 50% связывается в печени и имеет время полужизни в крови около 4 минут. С-пептид, отщепляющийся от молекулы проинсулина при ее превращении в инсулин, не связывается клеточными рецепторами на периферии, имеет время полужизни около 30 минут, результат не зависит от наличия гемолиза крови и достаточно точно отражает истинную секрецию инсулина поджелудочной железой.

Метод НОМА-IR. Инсулинорезистентность оценивается часто по отношению базальной концентрации иммунореактивного инсулина в сыворотке крови к содержанию глюкозы натощак. В частности индекс НОМА-IR рассчитывается по формуле:

$$\text{Инсулин натощак (мкЕд / мл)} \times \text{Глюкоза натощак (ммоль / л)} / 22,5$$

Норма индекса НОМА-IR составляет < 2,77. Пробы для анализа берутся из вены после 14 час голодания.

В табл. 5.23 суммированы лабораторные показатели, которые свидетельствуют о процессах, способствующих развитию метаболического синдрома.

Таблица 5.23

Лабораторные показатели, свидетельствующие о метаболическом синдроме

Показатели	Метод определения	Диагностические критерии
Инсулинорезистентность	ПГТТ, внутривенный	См. текст

	ГТТ, метод НОМА-IR	
Проинсулин	Отношение проинсулин/инсулин	Повышено
Холестерин	Натощак, сыворотка	> 5,2 ммоль/л
ХС-ЛПВП	Натощак, сыворотка	< 0,9 ммоль/л
Мужчины		< 1,0 ммоль/л
Женщины		< 1,0 ммоль/л
Триглицериды	Натощак, сыворотка	> 1,7 ммоль/л
Глюкоза	Натощак	> 6,1 ммоль/л
	Через 2ч после нагрузки	> 11,1 ммоль/л
Мочевая кислота	Сыворотка	> 480 мкмоль/л
Альбуминурия	Моча, иммунохимический метод	> 20 мг/сутки > 20 мг/г креатинина
Альбумин/креатинин отношение	Моча	Муж. 2,5мг/ммоль Жен. 3,5 мг/ммоль

5.3.3. Сахарный диабет

Международный Экспертный Комитет по диагностике и классификации сахарного диабета определил сахарный диабет как группу метаболических (обменных) заболеваний, характеризующихся гипергликемией, которая является результатом дефектов секреции инсулина, действия инсулина или обоих этих факторов (табл. 5.24).

Таблица 5.24

Классификация сахарного диабета

Тип СД	Характеристика заболевания
Сахарный диабет 1 типа Аутоиммунный Идиопатический	Деструкция β -клеток поджелудочной железы, обычно приводящая к абсолютной инсулиновой недостаточности.
Сахарный диабет 2 типа	С преимущественной инсулинорезистентностью и относительной инсулиновой недостаточностью или преимущественным дефектом секреции инсулина с инсулинорезистентностью или без нее.
Гестационный сахарный диабет	Возникает в период беременности
Другие типы сахарного диабета	Генетические дефекты функции β -клеток Генетические дефекты в действии инсулина Болезни экзокринной части поджелудочной железы Эндокринопатии Диабет, индуцированный лекарствами или химикатами

	Диабет, индуцированный инфекциями Необычные формы иммуно-опосредованного диабета Другие генетические синдромы, сочетающиеся с сахарным диабетом.
--	--

Нарушения углеводного, липидного, белкового обменов при сахарном диабете. Подавляющее большинство случаев диабета относится к двум обширным категориям. *Сахарный диабет I типа (СД I)*, причина развития гипергликемии – абсолютный дефицит секреции инсулина. Лица с высоким риском развития этого типа диабета часто могут быть идентифицированы по серологическим признакам аутоиммунного патологического процесса в панкреатических островках, а также по генетическим маркерам. Многие больные с такой формой диабета I типа в конечном счете становятся жизненно зависимыми от инсулина и находятся в состоянии риска по кетоацидозу. Эти больные часто склонны к другим аутоиммунным заболеваниям, таким как диффузный токсический зоб, тиреоидит Хашимото, болезнь Аддисона, витилиго и пернициозная анемия.

Сахарный диабет 2 типа (СД 2) является гетерогенным заболеванием, причина гипергликемии заключается в комбинации резистентности к инсулину и неадекватного компенсаторного инсулин-секреторного ответа. По распространенности СД 2 типа занимает около 90 % всех типов диабета. Эта гипергликемия может не вызывать клинических симптомов. В течение бессимптомного периода можно обнаружить нарушение углеводного обмена путем определения уровня глюкозы плазмы натощак или после пероральной нагрузки глюкозой.

СД I типа и СД 2 типа сопровождаются нарушениями содержания липидов в сыворотке. При СД I типа при неконтролируемом уровне гипергликемии может возникнуть выраженная гипертриглицеридемия, проявляющаяся в увеличении липопротеидов очень низкой плотности (ЛПОНП) и хиломикрон (ХМ). Это связано с дефицитом липопротеидлипазы и увеличением потока свободных неэстерифицированных жирных кислот (НЭЖК) из жировой ткани в печень

для синтеза триглицеридов. Оба эти эффекта связаны с дефицитом инсулина и предупреждаются его введением. Степень гипертриглицеридемии коррелирует с контролем гликемии. Концентрация липопротеидов низкой плотности (ЛПНП) может быть увеличенной, при этом содержание в плазме антиатерогенных липопротеидов высокой плотности (ЛПВП) снижается.

При СД 2 типа гипертриглицеридемия связана с увеличением синтеза триглицеридов в печени. ЛПОНП содержат необычно большое количество триглицеридов и эфиров холестерина по отношению к количеству апо-белков в этих макромолекулах. Достаточно часто накапливаются липопротеиды промежуточной плотности (ЛППП). ЛПНП имеют несколько меньшие размеры и большую плотность, ЛПВП, как правило, снижены. При СД 2 типа рекомендуется дополнительное лечение препаратами, снижающими уровень липидов в сыворотке, что направлено на уменьшение риска развития сердечно-сосудистых заболеваний.

Глюкоза способна взаимодействовать с белком с образованием гликированных продуктов без участия каких-либо ферментов (рис. 5.5).

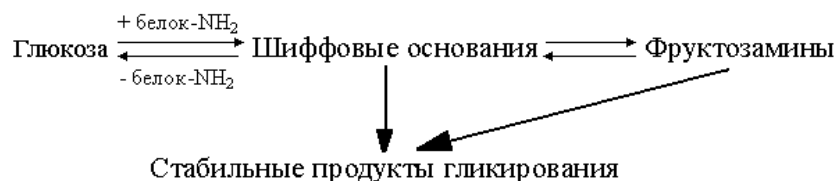


Рис5.5. Образование стабильных продуктов гликирования белков в присутствии глюкозы

При взаимодействии глюкозы и белка сначала образуются ранние продукты – Шиффовые основания и фруктозамины, затем они переходят в стабильные продукты гликирования. Наиболее интенсивно гликированию подвержены: в белках гидроксильные группы серина, N-концевые аминокислоты, аргинил-гуанидиновые группы, в нуклеотидах – гуаниловые основания, в фосфолипидах – аминокислоты фосфатидилэтаноламина и фосфатидилсерина. Степень гликирования реакционных групп зависит от

типа групп, гликирующего агента, наличия катализирующих факторов – фосфата, катионов металлов в восстановленной форме (Fe^{+3} , Cu^{+2}), длительности контакта с этими компонентами глюкозы и других сахаров. Степень гликирования наиболее высока у длительно живущих внеклеточных белков. При этом нарушаются функции белков и возникают разнообразные патологические состояния, включая нефропатию, нейропатию, ретинопатию, кардиомиопатию, нарушение переноса кислорода гемоглобином с последующей ишемией тканей.

Лабораторная диагностика нарушений обмена глюкозы, диагностика сахарного диабета. В КДЛ в основном используют 2 метода определения глюкозы – глюкозооксидазный и гексокиназный. Глюкозооксидазный метод основан на окислении глюкозы кислородом в присутствии фермента глюкозооксидазы, образуется перекись водорода, которая в присутствии пероксидазы окисляет хромоген, при этом скорость изменения оптической плотности раствора пропорциональна количеству глюкозы в биопробе.

Антикоагулянты гепарин, ЭДТА, оксалат натрия, цитрат, стабилизаторы фторид и монойодацетат практически не влияют на результаты. Перекись водорода, образующаяся в этой реакции, может окислять не только хромоген, но и другие вещества, присутствующие в биологической жидкости: аскорбиновую кислоту, мочевую кислоту, билирубин. При этом доля H_2O_2 , окисляющая хромоген, снижается, что может привести к занижению результата по глюкозе, поэтому этот метод не рекомендуется для исследования глюкозы в моче.

Гексокиназный метод высокоспецифичен и не дает реакций с другими компонентами сыворотки или крови. Гексокиназный метод считается референтным для определения глюкозы.

Повсеместное внедрение диагностических тест-полосок для полуколичественного определения метаболитов крови и мочи позволяет проводить анализ быстро, в присутствии пациента, непосредственно в

приемном отделении, в палате, в домашних условиях. Дешевизна и простота процедуры позволяют обеспечить реагентными тест-полосками массовое (диспансерное) исследование различных групп населения. Все виды измерений могут быть выполнены с помощью как монофункциональных, так и полифункциональных полосок с различной комбинацией реагентных зон, что дает возможность проводить как комплексные, так и отдельные исследования.

Международный экспертный комитет по диагностике диабета рекомендует следующие диагностические критерии сахарного диабета:

- симптомы диабета плюс случайное определение уровня глюкозы плазмы крови более 11,1 ммоль/л;
- уровень глюкозы плазмы крови натощак более 7,0 ммоль/л;
- через 2 часа после проведения теста толерантности с 75 г глюкозы, уровень глюкозы в цельной крови более 10,0 ммоль/л, в плазме более 11,1 ммоль/л;
- для диагностики диабета достаточно 2-х из приведенных 3-х критериев.

Тест толерантности к глюкозе. ТТГ проводится в том случае, если неясен диагноз. Если же диагноз «сахарный диабет» не вызывает сомнений из клинической картины и повышенного уровня глюкозы натощак или после еды, то проведение ТТГ не показано, так как этот тест не безразличен для функции поджелудочной железы. Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) выработала рекомендации для проведения ТТГ ТТГ (таблице 5.25) и критерии для постановки диагноза «сахарный диабет» или «нарушение толерантности к глюкозе» (табл. 5.26).

Таблица 5.25

Показания и рекомендации по выполнению теста толерантности к глюкозе

ПОКАЗАНИЯ	ВЫПОЛНЕНИЕ
Сомнительные результаты при	Пациент должен придерживаться обычного питания с

измерении глюкозы в крови натощак/случайно Неожиданная глюкозурия, в том числе при беременности Клинические признаки сахарного диабета при нормальном уровне глюкозы в крови Диагностика акромегалии	содержанием, по крайней мере, 150 г углеводов в день в течение 3 дней. Сохранять обычную физическую нагрузку. Пробу проводят натощак при воздержании от пищи в течение 8 и более часов. Измерить утром уровень глюкозы в плазме крови натощак Растворить 75 г глюкозы в 300 мл воды, выпить за 5 мин Определить концентрацию глюкозы в плазме крови через 2 часа (детям 1,75г глюкозы/кг массы тела, но не более 75 г). Во время проведения теста пациент должен быть спокоен, не курить, не пить воды <i>Внимание!</i> Не использовать сахарозу вместо глюкозы.
--	--

Таблица 5.26

Диагностический уровень концентрации глюкозы (ммоль/л)

Диагноз	Момент взятия пробы	Цельная кровь		Плазма венозной крови
		венозная	капиллярная	
Норма	натощак	3,3-5,5	3,3-5,5	4,0-6,1
	через 2 ч после нагрузки глюкозой	< 6,7	< 7,8	< 7,8
Нарушение толерантнос ти к глюкозе	натощак	< 6,1	< 6,1	< 7,0
	через 2 ч после нагрузки глюкозой	≥6,7 и <10,0	≥7,8 и <11,1	≥7,8 и <11,1
Сахарный диабет	натощак	≥ 6,1	≥ 6,1	≥ 7,0
	через 2 ч после нагрузки глюкозой	≥ 10,0	≥ 11,1	≥ 11,1

Гликированные белки, контроль компенсации сахарного диабета.

Углеводы могут взаимодействовать без участия ферментов с белками, нуклеотидами и липидами; эти реакции получили название гликирования. Способность к гликированию различна у разных сахаров. В табл. 5.27 приведена относительная реакционная способность по гликированию для наиболее распространенных в организме сахаров и их фосфорилированных форм. Гликирующая способность глюкозы меньше, чем у фруктозы в 7,5 раз, чем у галактозы в 4,7 раза, чем у глюкозо-6-фосфата в 50 раз, чем у фруктозо-6-фосфата в 75 раз. Тем не менее, концентрация в сыворотке крови глюкозы значительно выше, чем всех других углеводов, поэтому именно глюкоза

вносит основной вклад в процесс гликирования внеклеточных белков. Фруктоза и галактоза активнее, чем глюкоза взаимодействуют неферментативно с белками. С этим связано, по-видимому, токсическое действие галактозы у детей с галактоземией.

Измерение гликогемоглобина широко используется при мониторинге длительного контроля гипергликемии у больных сахарным диабетом. Кроме того, уровень гликогемоглобина отражает риск развития осложнений сахарного диабета. Поэтому определение гликогемоглобина у больных сахарным диабетом носит системный характер.

Таблица 5.27

Относительная способность гликирования сахаров и их производных

Углевод	Относительная гликирующая способность
Глюкоза	1
Фруктоза	7,5
Галактоза	4,7
Манноза	5,3
Рибоза	6,7
Глюкоза-6-фосфат	≈ 50

Тот факт, что гемоглобин подвергается неферментативному гликированию, позволил предложить тест для оценки степени контролируемости гликемии на протяжении длительного периода. Образование гликированного гемоглобина (HbA_{1c}) определяется уровнем гликемии и длительностью контакта гемоглобина с глюкозой. В норме HbA_{1c} составляет менее 6 % от общего гемоглобина, при неконтролируемом диабете он повышается. Измерение концентрации гликированного гемоглобина показано для выявления нарушенной толерантности к глюкозе, диабета в т.ч., «скрытых» или доманифестных форм и диабета беременных, используется для оценки компенсации сахарного диабета, эффективности лечения и степени риска осложнений. Уровень гликированного гемоглобина в эритроцитах является интегральным показателем углеводного обмена за предшествующие 6-8 недель и отражает риск развития осложнений сахарного диабета (табл. 5.28).

Контрольные параметры (цель лечения) сахарного диабета

Сахарный диабет 1 типа	хорошо (норма)	адекватный контроль	неадекватный контроль
HbA _{1C} , %	< 6,1	6,1-7,5	> 7,5
Сахарный диабет 2 типа	низкий риск ангиопатии	риск макроангиопатии	риск микроангиопатии
HbA _{1C} , %	≤ 6,5	6,5-7,5	> 7,5

В случае уменьшения времени присутствия эритроцитов в системе циркуляции (например, при гемолитической анемии) относительное количество HbA_{1C} снижается.

Лабораторная диагностика осложнений сахарного диабета.

Хронические осложнения диабета включают ретинопатию с возможным развитием слепоты; нефропатию, ведущую к почечной недостаточности; периферическую нейропатию с риском образования язв на нижних конечностях и ампутации; автономную нейропатию, вызывающую гастроинтестинальные, урогенитальные, сердечно-сосудистые симптомы и половую дисфункцию. Среди больных диабетом высока частота атеросклеротических поражений сосудов сердца, периферических и церебральных сосудов. Часто у больных обнаруживается гипертония, нарушения метаболизма липопротеинов и парадонтоз.

Кетоацидоз может быть первым признаком недиагностированного ранее СД I типа или может возникнуть у больных, у которых используемая доза инсулина становится неэффективной, увеличивается потребность в инсулине, в частности при инфекциях, острых заболеваниях, таких как инфаркт миокарда, травма, эмоциональные нарушения. Клинические и метаболические признаки диабетического кетоацидоза представлены в таблице 5.29.

Клинические и метаболические признаки диабетического кетоацидоза

Клинические признаки	Лабораторные показатели
----------------------	-------------------------

Жажда, полиурия, дегидратация гипотония, тахикардия, периферическая циркуляторная недостаточность кетоз гипервентиляция тошнота, рвота абдоминальные боли затуманенное сознание, кома	Гипергликемия гликозурия метаболический ацидоз гипокапния кетонемия, кетонурия уремия гиперкалиемия гипертриглицеридемия
--	---

Гиперосмолярная гипергликемия. У больных с СД 2 типа тяжелая гипергликемия (концентрация глюкозы до 50 ммоль/л и более) может развиваться без кетоза с минимальным ацидозом, но выраженной дегидратацией и очень высокой осмолярностью плазмы. Это осложнение обозначают как гиперосмолярная некетоновая гипергликемия.

Диабетическая нефропатия – достаточно часто осложняют течение сахарного диабета, она является причиной высокой инвалидизации и смертности. Почечная недостаточность является причиной смертности среди больных СД I и 2 типов соответственно в 53 и 3 % случаев. Поэтому лабораторный контроль за поражением почек включен в обследование больных сахарным диабетом. Первым признаком диабетической нефропатии является развитие микроальбуминурии, по мере прогрессирования болезни она сменяется протеинурией.

Микроальбуминемия является достаточно ранним признаком нарушения функции клубочков, в этот период болезнь поддается медикаментозному лечению. Уровень экскреции альбумина с мочой (табл. 5.30) определяется в основном структурной и функциональной целостностью гломерулярного фильтра, отделяющего просвет клубочкового капилляра от мочевого пространства, и величиной внутрикапиллярного клубочкового давления. При диабете происходит гликирование сиалогликопротеинов на гломерулярной базальной мембране клубочкового полианиона, что ведет к нейтрализации общего отрицательного заряда гломерулярного фильтра. Эта потеря заряда способствует более легкому прохождению в ультрафильтрат отрицательно заряженных молекул альбумина. Способствует

микроальбуминемии повышение внутриклубочкового давления, которое развивается первично по отношению к увеличению системного АД, так как почки при диабете теряют эффективность работы системы ауторегуляции внутрипочечного давления.

Таблица 5.30

Классификация альбуминурии

Уровень альбуминурии	Экскреция альбумина с мочой		Концентрация альбумина в моче
	В утренней порции	за сутки	
Нормоальбуминурия	< 20 мкг/мин	< 30 мг	< 20 мг/л
Микроальбуминурия	20-200 мкг/мин	30-300 мг	20-200 мг/л
Макроальбуминурия	> 200 мкг/мин	> 300 мг	> 200 мг/л

Макроангиопатии Сердечно-сосудистые поражения являются наиболее тяжелыми осложнениями сахарного диабета. Под термином макроангиопатии понимают поражения крупных сосудов, окклюзия которых приводит к нарушению перфузии жизненно важных органов. Риск развития атеросклероза за счет диабета увеличен в 2-3 раза, особенно сильно среди женщин. Системным фактором, ускоряющим развитие атеросклероза, является нарушение липидного метаболизма. К существенному изменению метаболизма липопротеидов и накоплению их в сосудистой стенке может привести гликирование апо-белков, что сопровождается активацией поглощения ЛПНП макрофагами сосудистой стенки. При сахарном диабете за счет гликирования, с одной стороны, меняются пути транспорта модифицированных ЛПНП, которые накапливаются в клетках сосудистой стенки, с другой стороны, меняется проницаемость эндотелия.

Диабетические микроангиопатии – это комплекс патологических изменений в сосудах микроциркуляции и периваскулярных зонах, развивающихся при сахарном диабете, при этом затронуты все сосуды микроциркуляции: артериолы, капилляры, венулы, межмикрососудистые анастомозы. Первичным в развитии диабетических признается поражение

эндотелия. Особое место в патологии эндотелиальных клеток занимает неферментативное гликирование их белковых макромолекул. Особенно этим изменениям подвержены сосуды сетчатой оболочки глаза (диабетические ретинопатии) и сосуды почек (нефропатия). Выраженность микроангиопатий тесно связана с тщательностью контроля сахарного диабета.

Гестационный сахарный диабет. Лабораторная диагностика. У здоровых беременных женщин из-за потребления глюкозы растущим плодом ее уровень натощак может быть немного снижен по сравнению с небеременными женщинами. Адаптивные гормональные сдвиги при беременности вызывают некоторое повышение толерантности к инсулину организма женщины, что направлено на увеличение доступности глюкозы для плода. У некоторых женщин эта, так называемая, относительная недостаточность инсулина может вызвать развитие диабета беременных - гестационный диабет. При возникновении гестационного сахарного диабета на начальных сроках беременности отмечено значительное возрастание риска самопроизвольного аборта и появления врожденных пороков развития сердца и мозговых структур плода. Если сахарный диабет начинается в более поздние сроки беременности (2-3й триместры), это приводит к чрезмерному росту плода (макросомии) и гиперинсулинемии, а после рождения может осложниться диабетической фетопатией.

Специфических проявлений при гестационном сахарном диабете не выявляется, поэтому единственным критерием для постановки диагноза является лабораторный скрининг беременных. Женщины, входящие в группу риска, при первом же обращении в женскую консультацию должны сдать анализ на уровень сахара в крови натощак на фоне обычной диеты и физических нагрузок. Если уровень сахара в крови, взятой из пальца, составляет 4.8-6,0 ммоль/л, рекомендуется пройти специальный тест с нагрузкой глюкозой.

Для выявления гестационного сахарного диабета беременным в период между шестым и седьмым месяцами проводят оральный

глюкозотолерантный тест, который показывает качество усвоения глюкозы организмом. Если уровень глюкозы в плазме крови, взятой натощак, превышает 5,1 ммоль/л, через час после еды – более 10,0 ммоль/л, а через пару часов – более 8,5 ммоль/л, то у врача есть основание диагностировать гестационный сахарный диабет. При необходимости тест можно проводить неоднократно.

При своевременном диагностировании заболевания и последующем выполнении рекомендаций врача риск рождения больного ребенка снижается до 1-2%.

5.3.4. Обмен дисахаридов и его нарушения

Дисахариды составляют около 40 % углеводов, получаемых с пищей. Всасываются углеводы в виде моносахаров. Поэтому нарушение переваривания дисахаридов может вызвать существенные патологические последствия. Активность дисахаридаз различна в разных отделах кишечника, подвержена индивидуальным колебаниям, зависит от желудочной секреции. Сахара лактоза, сахароза и мальтоза расщепляются ферментами лактазой, сахаразой и мальтазой, которые вырабатывает слизистая оболочка тонкой кишки. В норме ферменты расщепляют эти сахара до моносахаридов, включая глюкозу, которые затем всасываются в кровь через кишечную стенку. При врожденном или приобретенном недостатке необходимого фермента сахара не перевариваются и не могут поступать в кровоток, поэтому остаются в тонкой кишке. Дисахариды блокируют места всасывания моносахаридов, поэтому всасывание моносахаридов нарушается. Возникающая в результате высокая концентрация сахара приводит к поступлению жидкости в тонкую кишку, что сопровождается поносом.

Непереносимость лактозы. Чаще других встречается дефицит лактазы. У детей различают 2 формы непереносимости лактозы: доброкачественная без лактозурии и злокачественная с лактозурией. При 1 форме исключение из пищи новорожденных лактозы приводит к

исчезновению патологических проявлений. При 2 тяжелой форме возникают значительные вторичные проявления: дегидратация, ацидоз, лактозурия, замедляется рост ребенка, может наблюдаться поражение почек, ЦНС, развивается гипотрофия. Непереваренная лактоза поступает в толстую кишку, где расщепляется бактериями до органических кислот (молочная, уксусная). Повышение концентрации лактозы и органических кислот увеличивает осмолярность в просвете кишки, нарастает секреция жидкости, объем химуса, усиливается моторика кишечника, развивается осмотическая диарея. Диагностика дисахаридазной недостаточности основана, в первую очередь, на клинических проявлениях (боли, вздутие, дискомфорт), а также на определении активности ферментов дисахаридаз в биоптатах слизистой оболочки тонкой кишки, определении лактозы, сахарозы в кале, снижении рН кала, проведении нагрузочных тестов.

Непереносимость сахарозы. Непереносимость сахарозы – состояние, характеризующееся отсутствием или недостатком сахаразы в кишечнике человека. Врожденная первичная сахаразная недостаточность развивается в результате мутации гена, кодирующего синтез фермента сахаразы. В результате сахараза синтезируется в меньшем количестве или не синтезируется совсем. Приобретенная вторичная сахаразная недостаточность развивается в результате острых кишечных инфекций, хронических энтеритов (воспаление слизистой оболочки тонкого кишечника), паразитарных инвазий кишечника (например, при лямблиозах), длительного приема некоторых медикаментов (например, антибиотиков). Транзиторная сахаразная недостаточность возникает в первые дни жизни ребенка из-за замедленного созревания ферментативных систем. Лабораторная диагностика сводится к исследованию кала и биоптатов кишечника. В кале рН меньше 5,0 наблюдается наличие сахарозы, повышенное содержание молочной и уксусной кислот, нарушается баланс микрофлоры кишечника. В биоптатах слизистой тонкого кишечника определяется недостаточность

сахарозной активности, генетический анализ проводится для выявления мутации гена, кодирующего синтез сахарозы в организме.

5.3.5. Обмен гликогена

Гликоген синтезируется из глюкозо-6-фосфата в результате сочетанного действия гликогенсинтетазы и «ветвящего» фермента гликоген. В молекуле гликогена может содержаться до миллиона моносахаридов. При этом происходит как бы кристаллизация гликогена, в результате он не обладает осмотическим эффектом. Такая форма пригодна для хранения глюкозы в клетке. Если бы такое количество молекул глюкозы было растворено, то из-за осмотических сил клетку бы разорвало. Гликоген является депонированной формой не только глюкозы, но и энергии. В составе гликогена присутствует глюкоза, которая прошла этап фосфорилирования, на что затрачена значительная энергия. Гликоген содержится практически во всех тканях, в клетках нервной системы его минимальное количество, в печени и мышцах его особенно много.

Путь расщепления гликогена – *гликогенолиз*. Гликоген в организме в основном сохраняется в печени и скелетных мышцах. Гликоген мышц используется в качестве источника энергии при интенсивной физической нагрузке. Гликогенолиз в печени активируется в ответ на снижение глюкозы при перерывах в приеме пищи или как стрессовая реакция. Основными гормонами, активирующими гликогенолиз, являются глюкагон, адреналин и кортизол.

Гликогеновая болезнь, типы гликогенозов. Гликогенозы - это группа наследственных заболеваний, связанных с дефектами ферментов, при которых нарушен распад гликогена. Несмотря на огромный запас гликогена в органах, у больных детей развивается (табл. 5.31).

Таблица 5.31

Гликогенозы – болезни накопления гликогена

Тип	Название болезни	Дефект фермента	Структурные и клинические проявления дефекта
I	von Gierke's (Гирке)	глюкозо-6- фосфатаза	тяжелая постабсорбционная гипогликемия, лактоацидоз, гиперлипидемия
II	Pompe's (Помпе)	лизосомальная α - глюкозидаза	гранулы гликогена в лизосомах
III	Cori's (Кори)	трансглюкозилаза/ глюкозидаза	измененная структура гликогена, гипогликемия
IV	Andersen's (Андерсен)	«ветвящий» фермент	измененная структура гликогена
V	McArdle's (Мак-Ардль)	мышечная фосфорилаза	отложение гликогена в мышцах, судороги при физической нагрузке
VI	Hers' (Геру)	фосфорилаза печени	гипогликемия, но не такая тяжелая, как при I типе

Наиболее изучена болезнь Гирке (гликогеноз I типа), при этом заболевании блокировано расщепление гликогена из-за отсутствия фермента глюкозо-6-фосфатазы, структура гликогена нормальная. Нарушено образование свободной глюкозы, образуется много лактата. Гипогликемия приводит к активации жирового обмена, окисление липидов сопровождается образованием кетоновых тел. Гипогликемия проявляется ярко при определении глюкозы в крови глюкоксидазным и гексокиназным методами. Велика ценность адреналиновой и глюкагоновой пробы, так как адреналин и глюкагон не повышают уровень глюкозы в крови из-за неспособности печени поставлять свободную глюкозу из гликогена.

Лабораторная диагностика гликогенозов. При лабораторной диагностике гликогеноза I типа измеряют уровни глюкозы, лактата, мочевой кислоты и активность ферментов печени натощак. У новорожденных и грудных детей с гликогенозом типа I уровень глюкозы в крови после 3-4-часового голодания падает до 2,2 ммоль/л и ниже; если продолжительность голодания превышает 4 ч, уровень глюкозы почти всегда меньше 1,1 ммоль/л. Гипогликемия сопровождается значительным повышением уровня лактата и метаболическим ацидозом. Сыворотка обычно мутная или похожа

на молоко из-за очень высокого содержания триглицеридов и умеренно повышенного содержания холестерина.

Чтобы отличить гликогеноз типа I от других гликогенозов проводят провокационную пробу с глюкагоном: глюкагон вводят в/м или в/в струйно в дозе 30 мкг/кг (но не более 1 мг) через 4-6 ч после еды или приема глюкозы; кровь для определения глюкозы и лактата берут за 1 мин до инъекции глюкагона и через 15, 30, 45, 60, 90 и 120 мин после инъекции. При гликогенозе типа I глюкагон не повышает либо незначительно повышает уровень глюкозы, тогда как исходно повышенный уровень лактата продолжает нарастать. Специальное исследование включает исследование активности ферментов в биоптатах печени и выявление генетического дефекта методом ПЦР с последующей гибридизацией со специфическими олигонуклеотидами.

5.4. Основы биохимия и патохимия липидов

5.4.1. Обмен липидов

Регуляция обмена липидов. Жирные кислоты (ЖК) представляют собой углеводородные цепи, оканчивающиеся карбоксильной группой. Важной характеристикой ЖК является длина углеводородной цепи. У большинства млекопитающих, которые живут на суше, среди ЖК доминируют насыщенные пальмитиновая и стеариновая ЖК, в организме человека – моноеновая олеиновая ЖК. Увеличение числа двойных связей в жирных кислотах ведет к увеличению числа возможных пространственных конфигураций молекулы. Это может оказывать большое влияние на упаковку молекул в мембранах, а также на положение молекул жирных кислот в составе более сложных молекул, таких, как фосфолипиды. Жирные кислоты в плазме крови, в основном, находятся в эстерифицированной форме: в составе моно-, ди- и триглицеридов, фосфолипидов и эфиров холестерина или могут быть неэстерифицированы, в последнем случае они обозначаются как свободные жирные кислоты (СЖК). Местом хранения жирных кислот

служит жировая ткань, где они откладываются в виде триглицеридов (ТГ). Последовательное расщепление ТГ до глицерина и ЖК в жировой ткани активирует гормонзависимая триглицеридлипаза. Инсулин ингибирует активность этого фермента и, при увеличении инсулина, липиды накапливаются в жировой ткани. Контринсулярные гормоны, особенно катехоламины и глюкокортикоиды, активируют триглицеридлипазу жировой ткани. При недостатке инсулина, продолжительном голодании, стрессе усиливается липолиз и увеличивается концентрация в сыворотке СЖК.

Холестерин (ХС) является мононенасыщенным стеринном; по химической структуре это одноатомный вторичный спирт (холестерол). Основным биохимическим превращением ХС, как спирта, является образование эфирной связи с кислотами, в частности, со свободными жирными кислотами с формированием эфиров ХС. 80% холестерина в организме составляет свободный ХС, почти весь он является компонентом биологических мембран. В то же время, в сыворотке крови 2/3 ХС представлено в форме эфиров. Свободный холестерин метаболически активен, именно он является субстратом для желчных кислот, половых гормонов, кортикостероидов. Эфиры холестерина метаболически неактивны, это форма для транспорта холестерина в составе липопротеинов и форма накопления холестерина в адипоцитах. Холестерин входит в состав всех живых клеток. Важной функцией ХС является его роль как предшественника синтеза стероидных гормонов (минерало- и глюкокортикоидов, половых гормонов: андрогенов и эстрогенов), витамина D, он также выполняет роль структурного антиоксиданта. Холестерин все клетки организма способны синтезировать из ацетата, последовательно проходя стадии ацетоацетата, метилглутарил-КоА, и, наконец, мевалоновой кислоты. Превращение метилглутарил-КоА в мевалоновую кислоту происходит при действии гидроксиметилглутарил-КоА- (ГМГ-КоА)-редуктазы – ключевого фермента синтеза ХС. Образованная мевалоновая кислота может быть использована только в синтезе ХС и активация ГМГ-КоА-редуктазы облигатно приводит к

гиперхолестеринемии. Несколько гормонов влияют на активность этого фермента: инсулин и трийодтиронин (Т3) увеличивают активность ГМГ-КоА-редуктазы, тогда как глюкагон и кортизол оказывают ингибирующее действие на этот фермент. Группа лекарственных препаратов - статинов (ловастатин, мевастатин, симвастатин и др.) снижают уровень холестерина в организме, блокируя ГМГ-КоА-редуктазу.

Липопротеиды, их строение, функции в организме. Липиды не растворимы в воде, поэтому они транспортируются в крови в ассоциации с белками. Жирные кислоты в крови ассоциированы с альбумином, другие липиды транспортируются в составе липопротеидов (ЛП). ЛП частицы представляют собой макромолекулярные комплексы, внутренняя часть которых содержит нейтральные липиды (триглицериды и эфиры холестерина), а поверхностный слой состоит из фосфолипидов, неэтерифицированного холестерина и специфических липидтранспортных белков-аполипопротеинов. По величине гидратированной плотности ЛП принято разделять на пять классов: хиломикроны (ХМ), ЛП очень низкой плотности (ЛПОНП), ЛП промежуточной плотности (ЛППП), ЛП низкой плотности (ЛПНП), ЛП высокой плотности (ЛПВП). Аполипопротеины (апоЛП) способствуют формированию мицелл ЛП в эндоплазматическом ретикулуме гепатоцитов, являются лигандами для специфических рецепторов на поверхности плазматической мембраны клеток и кофакторами (активаторами и ингибиторами) процессов липолиза и метаболизма ЛП в сосудистом русле.

Хиломикроны (ХМ) имеют относительную плотность около 0,95 г/мл, определяются как сливообразный слой, формирующийся при стоянии сыворотки в течение 8-12 часов в холодильнике (рефрежираторный тест). В ХМ содержание липидов составляет 98-99,5 %, белков 0,5-2 %, отношение белок/липид в среднем 1:100. ХМ синтезируются в кишечнике и служат для переноса экзогенных липидов. Это основной переносчик экзогенных

(пищевых) жиров. ХМ сначала попадают в лимфатическую систему, затем в кровотоки.

Липопротеиды очень низкой плотности (ЛПОНП) содержат 90-92 % липидов, 8-10 % белка, соотношение белок/липид как 1:9. ЛПОНП образуются в печени, секретируются гепатоцитами в кровотоки и транспортируют эндогенные ТГ. Насцентные ЛПОНП имеют в составе только апоВ-100.

Липопротеиды промежуточной плотности (ЛППП) имеют соотношение белок/липид непостоянное. В норме циркулирует очень мало ЛППП, что связано с их быстрым превращением в ЛПНП или захватом гепатоцитами. В процессе метаболического превращения ЛППП в ЛПНП, кроме гепаринзависимой ЛПЛ принимает участие второй липолитический фермент, триглицеридлипаза печени (ПТГЛ). Этот фермент способен действовать не только как гидролаза ТГ, но и как фосфолипаза.

Липопротеиды низкой плотности (ЛПНП) содержат около 80 % липидов, 20 % белка, соотношение белок/липиды 1:4. ЛПНП основные переносчики холестерина в виде эфиров холестерина, могут проходить через фенестры между эндотелиальными клетками капилляров и проникать в клетки периферических тканей. Период полужизни циркулирующих ЛПНП составляет приблизительно 2,5 дня. ЛПНП достаточно надежно защищены от окисления антиоксидантами плазмы, такими как витамин С и Е. Тем не менее, при задержке в плазме или снижении антиоксидантной активности в организме ЛПНП, их фосфолипиды и жирные кислоты подвергаются окислению.

Липопротеиды высокой плотности (ЛПВП) подразделяются на 3 подкласса ЛПВП: ЛПВП₁ (1,055-1,085 г/мл); ЛПВП₂ (1,063-1,120 г/мл); ЛПВП₃ (1,120-1,210 г/мл). Основное значение в транспорте липидов придают метаболизму ЛПВП₂ и ЛПВП₃. По электрофоретической подвижности оба класса одинаковы, но ЛПВП₂ содержат меньше белка, чем ЛПВП₃ и присутствуют в меньших количествах. Свыше 90 % белка ЛПВП

представлено апо А, отношение апо А I/апо А II равно примерно 3:1 как в ЛПВП₂, так и в ЛПВП₃. ЛПВП образуются несколькими путями, включая синтез и секрецию первичных или насцентных ЛПВП печенью и кишечником. Насцентные ЛПВП представляют собой бислойные диски, состоящие из апоЛП и фосфолипидов. Свободный холестерин диффундирует в ЛПВП из клеток эндотелия, эритроцитов и других клеток. Кроме того, во время липолиза ЛПОНП или хиломикрон поверхностные липиды (ФЛ и ХС) и белки (апо А-I, апо А-II) переносятся во фракцию ЛПВП. Дискоидальные насцентные ЛПВП в плазме крови взаимодействуют с ферментом лецитин-холестерин ацилтрансферазой (ЛХАТ), в результате образуются эфиры ХС, быстро перемещающиеся в ядро частицы; формируются сферические (зрелые) частицы – ЛПВП₃. У людей большая часть эфиров ХС, содержащихся в ЛПВП, переносится в более крупные ЛП, богатые триглицеридами, что приводит к снижению эфиров ХС и увеличению ТГ в ЛПВП. Комбинированный эффект липолиза и переноса липидов приводит к обогащению частиц ЛПВП дополнительными липидами и апопротеинами, в результате чего происходит увеличение размера и снижение плотности частиц ЛПВП, сопровождающееся превращением частиц ЛПВП₃ в ЛПВП₂.

Метаболизм липопротеидов в крови и органах. В плазме крови содержатся 4 основных класса липопротеидов: ХМ, ЛПОНП, ЛПНП и ЛПВП и несколько других ЛП, которые представлены в сравнительно низких концентрациях; ЛППП и ЛП(а). В табл. 5.32 представлены некоторые свойства ЛП.

Таблица 5.32

Характеристика липопротеидов плазмы крови

	Хиломик- роны	ЛПОНП	ЛППП	ЛПНП	ЛПВП
Плотность (г/мл)	< 0,95	0,96-1,006	1,007-1,019	1,02-1,063	1,064-1,21
Диаметр (нм)	100-1000	43	27	22	8
Электрофоретическая подвижность	остаются на старте	пре-β		β	α

Место образования	тонкая кишка	печень	катаболизм ЛПОНП	катаболизм ЛПОНП через ЛППП	печень, тонкая кишка, катаболизм хиломикрон и ЛПОНП
Основная функция	транспорт экзогенных ТГ	транспорт эндогенных ТГ	предшественник ЛПНП	транспорт холестерина	обратный транспорт холестерина
Состав:					
триглицериды	90 %	65 %	20 %	5 %	5 %
холестерин	5 %	15 %	25 %	50 %	20 %
фосфолипиды	4 %	10 %	35 %	25 %	25 %
белок	1 %	10 %	20 %	20 %	55 %
апобелки	А, В-48, С, Е	В-100, С, Е	В-100, Е	В-100	А, С, Е

Хиломикроны в крови в процессе гидролиза теряют около 96% своей массы, в основном за счет ТГ, а также холестерина, фосфолипидов и апоЛП А и С. В результате этого ХМ преобразуются в меньший по размерам, обогащенный холестерином ремнант ХМ, в котором апоВ и апоЕ являются основными апоЛП. Образованные ремнанты ХМ имеют гидратированную плотность ЛПОНП и ЛППП и в норме из сыворотки крови их элиминируют гепатоциты посредством специфического рецептора (апоЕ-рецептор). Рецептор к ремнанту хиломикрон отличается от ЛПНП-рецептора, в частности он не контролируется уровнем внутриклеточного холестерина.

В кровотоке в состав ЛПОНП включаются аполипопротеины из ЛПВП-апоС-II и апоЕ. ЛПОНП, подобно ХМ, деградируют под влиянием липопротеинлипазы, расположенной на эндотелии капилляров. В этом процессе ЛПОНП превращаются в ЛППП. Некоторые ЛППП удаляются из кровотока через ЛПНП-рецепторы печенью, но в основном печеночная липопротеинлипаза гидролизует ТГ ЛППП и тем самым ЛППП превращаются в ЛПНП. Таким образом, ЛПОНП, богатые ТГ, являются предшественниками ЛПНП.

ЛПНП являются основными переносчиками холестерина в плазме, период полужизни циркулирующих ЛПНП составляет приблизительно 2,5 дня. ЛПНП удаляются из крови посредством рецептор-опосредованного

эндоцитоза через специфические рецепторы на поверхности клеток. Повышение уровня свободного холестерина приводит к подавлению активности ключевого фермента внутриклеточного синтеза холестерина – ГМГ-КоА-редуктазы, угнетению синтеза рецепторов к ЛПНП, а также к увеличению скорости образования эфиров холестерина в клетке при участии фермента АХАТ. Основная роль рецептора ЛПНП заключается в обеспечении клетки холестерином адекватно ее потребности. Примерно 75 % ЛПНП-рецепторов в организме человека сосредоточено на поверхности гепатоцитов, на клетках периферических тканей этот рецептор представлен слабо из-за высокого содержания холестерина в клетках. Важнейшая физиологическая функция ЛПНП-рецептора – быстрое эффективное удаление ЛПНП в печень, где избыток холестерина окисляется в желчные кислоты и выводится из организма через кишечник. В дополнении к эндоцитозу при участии ЛПНП-(В,Е)-рецептора, ЛПНП могут включаться в клетки периферических тканей за счет неспецифического эндоцитоза. Этот процесс, обеспечивающий поступление холестерина в ткани пропорционально его концентрации в системном кровотоке, в норме имеет низкую эффективность, но становится значительным, если концентрация ЛПНП в кровотоке увеличена, например, при семейной гиперхолестеринемии. Неспецифический эндоцитоз не регулируется механизмом обратной связи. Кроме того, тканевые макрофаги, образующиеся из моноцитов крови, и трансформированные гладкомышечные клетки могут захватывать ЛПНП посредством сквенджер-рецепторов. Этот процесс имеет место при нормальной концентрации ЛПНП, но существенно усиливается при повышении их концентрации, задержке в системе циркуляции и модификации ЛПНП. Модификация ЛПНП (окисление, сиамирование, гликирование и др.) происходит при задержке ЛП частиц в кровотоке. Показано, что такая модификация происходит после контакта с эндотелиальными клетками и фибробластами.

У ЛПВП 2 важнейшие функции в плазме: 1) они являются источником апо-белков для хиломикрон и ЛПОНП и 2) обеспечивают обратный транспорт холестерина, забирая его от перегруженных клеток тканей и других липопротеидов и перенося его в ремнантные частицы, которые затем захватываются печенью. Частицы ЛПВП подвергаются воздействию печеночной триглицеридлипазы (ПТГЛ), фермента, обнаруженного в основном в эндотелиальных клетках синусоидов печени. ПТГЛ обладает как триглицеролгидролазной, так и фосфолипазной активностью, что приводит к снижению триглицеридов и фосфолипидов в ЛПВП и уменьшению размера частицы. Некоторое количество ЛПВП₂ удаляется из системы циркуляции печенью через класс В сквенджер-рецепторов, которые распознают апо А I.

5.4.2. Типы дислипопропротеидемий

Дислипопропротеидемия, трактуемые как нарушения метаболизма ЛП, характеризуются повышением липидов крови – гиперлипопропротеидемия или снижением – гиполлипопропротеидемия. Гиполлипопропротеидемии клиническое значение имеют в основном при наследственной первичной форме, тогда как клинически значимые гиперлипопропротеидемии наиболее часто имеют характер вторичной приобретенной патологии. Классификация гиперлипопропротеидемий, принятая ВОЗ, выделяет 5 типов гиперлипопропротеидемий, причем наиболее распространенный II тип подразделяется на 2 подтипа (табл. 5.33). Классификация основана на фенотипических характеристиках сыворотки при нарушениях липидного обмена. Эта классификация достаточно универсальна: под нее подводятся наиболее типичные варианты перераспределения липопротеидов при гиперлипидемиях, электрофоретические характеристики липопротеидов, патобиохимические механизмы, связанные с нарушениями на разных этапах транспорта липидов в организме.

Таблица 5.33

Классификация гиперлипопропротеидемий, принятая ВОЗ

Тип	ХМ	ЛПОНП	ЛПНП	Холестерин	ТГ	Нарушения липопротеидов
I	↑	Норм.	Норм.	Норм.	↑↑	Избыток хиломикрон
IIa	—	Норм.	↑↑	↑↑	Норм.	Избыток ЛПНП
IIb	—	↑	↑	↑	↑	Избыток ЛПНП и ЛПОНП
III	—	флотирующие β-ЛП		↑	↑	Избыток ремнантов ХМ и ЛППП
IV	—	↑	Норм.	Норм.(↑)	↑	Избыток ЛПОНП
V	↑	↑	Норм.	Норм.(↑)	↑↑	Избыток хиломикрон и ЛПОНП

Определение типа ГЛП – полезный тест диагностики нарушений липидного обмена, особенно часто типирование ГЛП проводят при назначении гиполипидемической терапии. Основным недостатком этой классификации является неучет изменений ЛПВП, снижение которых имеет не менее важное значение, чем увеличение ЛПНП или общего холестерина.

Первичные и вторичные дислипопротемии. Семейная гипоальфалипотеинемия – аутосомно-доминантное заболевание, для которого характерно снижение уровня ХС ЛПВП при нормальном уровне липидов. Для этого заболевания характерно развитие ИБС в раннем возрасте. У гетерозигот содержание в крови ХС-ЛПВП, апоА-I и апоА-II составляет половину нормы. У гомозигот практически отсутствуют ЛПВП, апо А-I и А-II; содержание общего ХС и ХС-ЛПНП в сыворотке крови составляет около трети нормальных значений; уровень ТГ нормальный или слабо повышен.

Абеталипопротеидемия и гипобеталипопротеидемия – наследственные заболевания, при которых содержание апоВ в крови не определяется. При такой патологии у больных-гомозигот уровень ХС в крови не превышает 1,55 ммоль/л, в плазме крови удается выявить только следовые количества ХМ, ЛПОНП и ЛПНП. При варианте заболевания – нормотриглицеридемической абеталипопротеидемии, энтероциты сохраняют способность синтезировать и секретировать апоВ-48, но нет синтеза апоВ-

100 в гепатоцитах. Для таких больных характерен нормальный уровень ТГ и гипохолестеринемия. При абетапопротеидемии и гипобетапопротеидемии развивается атаксия, пигментация сетчатки, акантоцитоз, дефицит эссенциальных жирных кислот и жирорастворимых витаминов в плазме крови.

Гиперлипопротеидемии (ГЛП) могут быть первичными, то есть обусловленными генетическими аномалиями и факторами среды, или вторичными – результатом таких заболеваний как диабет, патология печени, почек, гормональных нарушений и др.

Первичные ГЛП имеют наследственную предрасположенность. Известно много наследственных аномалий обмена ЛП, но только для некоторых установлены точные биохимические дефекты, позволяющие диагностировать заболевание.

Семейная гиперхолестеринемия (СГХС) – наследственное заболевание, при котором отмечают высокий уровень ХС сыворотки крови и ЛПНП и раннее развитие атеросклероза и ИБС. Уровень ХС сыворотки крови у гетерозигот варьирует от 6,5 до 13 ммоль/л, у гомозигот отмечены повышения до 20 ммоль/л. Ксантомы сухожилий считают патогномичными для больных с семейной ГХС. Это заболевание связано с мутацией генов, кодирующих рецептор ЛПНП. Дефицит ЛПНП-рецепторов приводит к накоплению ЛПНП в сыворотке практически с рождения. У детей и молодых людей при этом отмечается IIa тип гиперхолестеринемии, в среднем и пожилом возрасте IIb тип. Содержание ЛПВП обычно бывает нормальным.

Семейная комбинированная гиперлипидемия (СКГЛ) – заболевание с аутосомно-доминантным типом наследования. У пробанда и его родственников I степени родства отмечают разные типы ГЛП (IIA, IIB, IV). Нарушения липидного обмена проявляются обычно после 20 лет, но могут быть выявлены и в более раннем возрасте. Частота встречаемости СКГЛ в популяции составляет от 0,5 до 2%, тогда как среди больных ИМ – 5%, а

среди пациентов в возрасте до 60 лет с ангиографически документированной ИБС – 15-20%.

Вторичные ГЛП возникают на фоне некоторых заболеваний, гормональных нарушений или приема лекарственных препаратов.

Гормональная терапия. Развитие вторичных гиперлипопротеидемий отмечают при приеме пероральных контрацептивов, лечении глюкокортикоидными гормонами. Женщины, принимающие в возрасте до 45 лет оральные контрацептивы, имеют более высокие уровни холестерина и ТГ в плазме. Анаболические стероиды существенно уменьшают уровень ЛПВП-холестерина в сыворотке, тем самым способствуя развитию сердечно-сосудистых заболеваний.

Лабораторные исследования, выявляющие дислипотеинемии. Алгоритм диагностики нарушений липидного обмена (патология системы липопротеидов) включает три последовательных этапа.

Первый этап – скрининг. Исследование включает определение в крови содержания общего ХС и ТГ. В случае констатации гиперхолестеринемии или гипертриглицеридемии (гиперлипопротеинемия, ГЛП) следует провести типирование ГЛП.

Второй этап – установление типа ГЛП. Фенотипирование предусматривает повторное определение уровня в крови ХС и ТГ с целью исключения алиментарного влияния на уровень липидов (обязательное голодание в течение 12 ч), электрофорез ЛП на ацетате целлюлозы (агарозе) или определение ХС-ЛПВП и ХС-ЛПНП иммунотурбидиметрическим методом. Фенотипирование позволяет провести дифференциальную диагностику между отдельными формами ГЛП. Гипертриглицеридемия также является фактором риска ИБС, особенно у женщин. При повышении концентрации ТГ свыше 10 ммоль/л резко увеличивает риск развития панкреатита.

В случаях неясного генеза ГЛП следует провести третий этап исследования.

Третий этап – дифференциальная диагностика первичных и вторичных ГЛП. Дифференциальную диагностику проводят методом исключения всех заболеваний, для которых характерны вторичные ГЛП – сахарный диабет, нефротический синдром и иные формы поражения паренхимы почек, патология печени с явлениями холестаза, снижение в крови альбумина, наличие острой или хронической фазы воспалительного процесса, ожирения и дисфункции коркового слоя надпочечников с гиперпродукцией глюкокортикоидов, избыток или недостаток тиреоидных гормонов. Комплексное лабораторное исследование и исключение вторичной ГЛП дает основание поставить диагноз первичной ГЛП и заниматься выяснением конкретных механизмов нарушения метаболизма ЛП.

Клиническое значение типирования дислиппротеинемий. Основная цель исследования липидного обмена – это выявление гиперлипидемии как фактора риска сердечно-сосудистых заболеваний. Поэтому исследование липидов необходимо назначать:

- при ишемической болезни сердца, нарушениях мозгового кровообращения и кровотока в крупных артериях;
- у лиц с отягощенной наследственностью (ИБС у родителей в возрасте до 60 лет);
- при наличии локальных липидных отложений (ксантомы, ксантелазмы, липидные стрии, липидная дуга роговицы) в возрасте до 50 лет;
- в случаях липимической сыворотки.

В обязательный перечень лабораторных исследований анализ липидов сыворотки входит у больных сахарным диабетом и гипертензией, которые в свою очередь являются факторами риска ИБС. Основное число случаев нарушений липидного метаболизма носит вторичный характер. Прежде чем использовать гиполипимические препараты, необходимо выяснить характер нарушения, основную терапию направлять на лечение первичной патологии. Во многих случаях успешное лечение основного заболевания приводит к нормализации показателей липидного метаболизма.

Характер изменений липопротеидов при некоторых заболеваниях.

Сахарный диабет. Гипертриглицеридемия средней тяжести (2,3 - 5,6 ммоль/л) выявляется в 90 % случаев нелеченного сахарного диабета.

Гипотиреоз является распространенной причиной обратимой гиперлипидемии. При гипотиреозе гиперлипидемия и увеличение уровня апо В обусловлены замедлением катаболизма ЛПНП.

Нефротический синдром. В условиях нефротического синдрома параллельно экскреции альбумина с мочой развивается гипертриглицеридемия, за которой следует повышение в крови концентрации ХС и ЛПНП. Ключевую роль в выраженности гиперлипидемии играет гипоальбуминемия, вызывающая, по-видимому, увеличение притока в печень СЖК и стимулирующая синтез липопротеидов.

5.4.3. Диагностическое значение определения показателей липидограммы

Холестерин общий. Холестерин – одноатомный циклический спирт, структурный компонент мембран клеток, исходный субстрат при синтезе половых гормонов, кортикостероидов, желчных кислот, витамина Д. Транспортируется в крови в составе липопротеидов ЛПОНП, ЛПНП, ЛПВП. Общий холестерин включает как этерифицированный (связанный эфирной связью с жирной кислотой), так и свободный холестерин липопротеидов всех видов. Основная масса ХС синтезируется в печени и поступает с пищей. Все клетки организма способны синтезировать холестерин из ацетата, последовательно проходя стадии ацетоацетата, метилглутарил-КоА и мевалоновой кислоты. Превращение метилглутарил-КоА в мевалоновую кислоту происходит при действии гидроксиметилглутарил-КоА- (ГМГ-КоА)-редуктазы – ключевого фермента синтеза ХС. Образованная мевалоновая кислота может быть использована только в синтезе ХС и активация ГМГ-КоА-редуктазы облигатно приводит к гиперхолестеринемии. Несколько гормонов влияют на активность этого фермента: инсулин и трийодтиронин (Т3) увеличивают активность ГМГ-КоА-редуктазы, тогда как

глюкагон и кортизол оказывают ингибирующее действие на этот фермент. Группа лекарственных препаратов - статинов - снижают уровень холестерина в организме, блокируя ГМГ-КоА-редуктазу.

Повышенное содержание общего холестерина в крови ассоциируется с высоким риском атеросклероза и ишемической болезни сердца.

Рекомендованные пределы Всероссийского научного общества кардиологов, 2004.

Риск развития ишемической болезни сердца и ее осложнений: низкий - $< 5,0$ ммоль/л, умеренный – $5,0-6,2$ ммоль/л, высокий – $> 6,2$ ммоль/л.

У больных ишемической болезнью сердца, атеросклерозом периферических и сонных артерий, аневризмой брюшного отдела аорты, а также сахарным диабетом 2 типа оптимальным является уровень $< 4,5$ ммоль/л.

При концентрации $5,0$ ммоль/л и выше для оценки атеросклеротических изменений необходимо исследовать холестерин в комплексе с триглицеридами, ХС-ЛПВП и ХС-ЛПНП с расчетом индекса атерогенности.

Увеличение концентрации.

Первичные дислиппротеинемии:

- семейная и полигенная гиперхолестеролемиа (тип IIa, IIb);
- дислиппротеинемия III типа.

Вторичные дислиппротеинемии:

- атеросклероз, ишемическая болезнь сердца;
- печеночная недостаточность, внутри- и внепеченочный холестаза;
- нефротический синдром;
- гипотиреоз;
- сахарный диабет.

Холестерин липопротеинов высокой плотности. Липопротеины высокой плотности (ЛПВП) – сложные мицеллы, состоящие из

фосфолипидов, специфических белков синтезируемых в гепатоцитах (апо-белков) и гидрофобных липидов, преимущественно холестерина. ЛПВП осуществляют в крови транспорт липидов, включая холестерин, от клеток периферических тканей, в том числе кровеносных сосудов сердца, в печень, где он может выводиться из организма в виде желчных кислот. Сниженный уровень холестерина ЛПВП рассматривают как фактор риска развития атеросклероза.

Рекомендованные пределы Всероссийского научного общества кардиологов.

Снижение концентрации ХС-ЛПВП для мужчин менее 0,90 ммоль/л, для женщин менее 1,2 ммоль/л связывают с повышенным риском развития ИБС и ее осложнений, уровень выше 1,56 ммоль/л играет защитную роль. Для корректной оценки атерогенных нарушений липидного обмена необходимо исследовать комплекс показателей: триглицериды, холестерин общий, ХС-ЛПНП, ХС-ЛПВП с расчетом индекса атерогенности.

Индекс атерогенности. Показатель атерогенных нарушений липидного обмена, а также адекватно проводимой гиполипидемической терапии оценивают в комплексе с результатами других тестов липидного профиля с расчетом индекса атерогенности по формуле:

$$\text{Индекс атерогенности} = \frac{\text{ОХС(ммоль/л)} - \text{ХС - ЛПВП(ммоль/л)}}{\text{ХС - ЛПВП(ммоль/л)}}$$

Рекомендованные пределы Всероссийского научного общества кардиологов: не более 4.

Холестерин липопротеинов низкой плотности. Липопротеины низкой плотности (ЛПНП) – сложные мицеллы, состоящие из фосфолипидов, специфических белков синтезируемых в гепатоцитах (апо-белков), холестерина и триглицеридов; переносят холестерин из печени к клеткам периферических тканей. Уровень ХС-ЛПНП в крови более тесно положительно коррелирует с риском развития ИБС, чем уровень общего холестерина. Патогенез атеросклероза включает перекисное повреждение

компонентов ЛПНП под действием местных факторов воспаления, их захват макрофагами сосудистых стенок и включение ХС-ЛПНП в состав образующихся атеросклеротических бляшек.

Рекомендованные пределы Всероссийского научного общества кардиологов:

Повышение концентрации ХС-ЛПНП выше 3 ммоль/л ассоциируется с повышенным риском развития ИБС и ее осложнений; 3,4-4,1 ммоль/л – пограничный риск, более 4,1 ммоль/л - высокий.

У больных ИБС, атеросклерозом периферических и сонных артерий, аневризмой брюшного отдела аорты, а также СД 2 типа оптимальным признан уровень ХС-ЛПНП менее 2,6 ммоль/л.

Холестерин липопротеинов очень низкой плотности. Липопротеины очень низкой плотности (ЛПОНП) – сложные мицеллы, основная роль этих частиц – транспорт триглицеридов из печени в периферические ткани. В крови ЛПОНП превращаются в ЛПНП в результате гидролиза триглицеридов под действием липопротенлипазы. Поскольку ЛПОНП участвуют в механизме образования атеросклеротических бляшек (поглощение ЛПОНП макрофагами обуславливает выраженную аккумуляцию в них холестерина и образование пенистых клеток), их относят к высокоатерогенным липопротеинам. Гиперлипемия, обусловленная ЛПОНП, как и хиломикронами, придает плазме мутность («хилез»).

Референтные пределы: 0,26-1,04 ммоль/л.

Увеличение концентрации.

- первичные дислиппротеинемии III, IV, V типов;
- вторичные дислиппротеинемии, сопровождающие патологические состояния: ожирение, хроническая почечная недостаточность, нефротический синдром, сахарный диабет с кетоацидозом, гипотиреоз и реоз, хронический алкоголизм, острый и хронический панкреатит.

Триглицериды. Триглицериды – эфиры спирта глицерола и высших жирных кислот. Основная функция – энергетический субстрат. Повышенный

уровень ТГ может быть обусловлен увеличением содержания в плазме крови хиломикрон и/или ЛПОНП и ассоциируется с риском развития атеросклероза и ишемической болезни сердца. Определение триглицеридов проводится с целью диагностики первичных и вторичных нарушений липидного обмена (в комплексе с другими липидного обмена), оценке риска атеросклероза и его осложнений.

Оптимальный уровень менее 1,77 ммоль/л (Рекомендации Всероссийского научного общества кардиологов, 2004)

Увеличение концентрации.

Первичные дислиппротеинемии:

- дислиппротеинемии I, IIb, III, IV и V типов (семейная или спорадическая эндогенная гипертриглицеридемия, наследственный дефицит липопротеинлипазы, семейная комбинированная гиперлипидемия).

Вторичные дислиппротеинемии:

- нарушение толерантности к глюкозе, сахарный диабет;
- атеросклероз;
- вирусные гепатиты, цирроз печени, обтурация желчевыводящих путей;
- острый и хронический панкреатит;
- ожирение;
- нефротический синдром, хроническая почечная недостаточность;
- гипотиреоз.

Свободные жирные кислоты. Жирные кислоты (ЖК) представляют собой углеводородные цепи, оканчивающиеся карбоксильной группой. Жирные кислоты в плазме крови, в основном, находятся в эстерифицированной форме: в составе моно-, ди- и триглицеридов, фосфолипидов и эфиров холестерина или могут быть неэстерифицированы, в последнем случае они обозначаются как свободные жирные кислоты (СЖК). В свободном виде жирные кислоты транспортируются в плазме из жировой

ткани к печени и скелетным мышцам, в этом случае они связаны с альбумином. Каждая молекула альбумина может связывать 6 - 8 молекул жирных кислот. Насыщенные ЖК во всех клетках организма являются преимущественно энергетическим материалом. Основная функция полиеновых ЖК является пластическая; поступившие с пищей эссенциальные полиеновые ЖК ЛПВП доставляют непосредственно к клеткам, в том числе и к высокодифференцированным клеткам. Эти клетки используют экзогенные эссенциальные поли-ЖК как предшественники синтеза индивидуальных ЖК, которые встраиваясь в мембраны, во многом определяют специфичность функции клеток. Насыщенные жирные кислоты оказывают атерогенное действие, полиеновые эссенциальные жирные кислоты обладают антиатерогенным действием. Увеличение содержания насыщенных ЖК в составе фосфолипидов мембраны понижает ее жидкостность, увеличивает ее микровязкость: последнее существенно нарушает функционирование всех встроенных в мембрану интегральных белков. Встраивание в мембрану эссенциальных, особенно омега-3 поли-ЖК, существенно увеличивает жидкостность мембран. Это приводит к улучшению всего комплекса метаболических проявлений липидного обмена.

В норме концентрация СЖК в плазме человека колеблется в пределах 0,4-0,8 ммоль/л или 100-200 мг/л.

Фосфолипиды. Фосфолипиды (ФЛ) являются комплексными липидами, содержащими фосфатное основание. Это придает молекуле ФЛ алифатический характер – неполярные цепи жирных кислот способны взаимодействовать с липидами, а полярные фосфатные головки - с водным окружением. В результате этого свойства ФЛ являются неотъемлемым компонентом всех клеточных мембран. В липопротеидах плазмы фосфолипиды играют ключевую роль, поддерживая в растворенном состоянии неполярные липиды, такие как ТГ и эфиры холестерина.

Референтные значения: взрослые 1,25-2,75 г/л, пожилые старше 65 лет 1,90 - 3,65 г/л.

Повышение содержания:

- Беременность;
- Вирусный гепатит (легкое течение);
- Гиперлипопротеидемия II типа;
- Алкогольный и билиарный цирроз печени;
- Нефротический синдром;
- Сахарный диабет.

5.4.4. Нарушения обмена липидов

Перекисное окисление липидов мембран, лабораторные показатели.

Окислительный стресс – усиление продукции высоко реактивных форм кислорода (H_2O_2 , O_2^- и OH^-) является одним из системных повреждающих факторов клеточных мембран. Окисленные формы липопротеинов низкой плотности (окЛПНП) оказывают выраженное проатерогенное действие. Окислительный стресс в клетках сосудистой стенки сопровождается накоплением в атеросклеротической бляшке продуктов, которые могут образовываться только в результате взаимодействия свободных радикалов кислорода с белками и липидами. Увеличение концентрации перекисей липидов в крови отмечается сразу после курения табака. Липиды могут быть модифицированы под влиянием ферментов липоксигеназы и миелопероксидазы, которые присутствуют в атеросклеротической бляшке.

В окЛПНП происходит модификация липидов и апоВ-белка, сопровождающаяся структурной и функциональной дезориентацией, делающей невозможными обычную утилизацию окЛПНП через апоВ-рецепторы. В виде модифицированных продуктов окЛПНП являются не просто балластом в интима сосудов, а оказывают раздражающее действие. Результатом является включение механизмов защиты, восприятие модифицированных липопротеидов как чужеродной субстанции. Отложение окЛПНП в интима стимулирует проникновение лейкоцитов в стенку сосудов, в частности моноциты-макрофаги двигаются в направлении окЛПНП.

Макрофаги поглощают модифицированные липопротеины, используя для этого севенджер-рецепторы. Перенаполненные модифицированными липопротеинами макрофаги превращаются в пенистые клетки, являющиеся морфологическим субстратом липидной атеросклеротической бляшки. Переокисная модификация ЛПНП сопровождается существенным повышением их иммуногенности. Образование антител к окЛПНП, захватываемым клетками артериальной стенки, является дополнительным фактором повреждения артерий. Антитела против окЛПНП могут использоваться как параметр, точно отражающий окислительные процессы, происходящие *in vivo*.

Нарушения обмена липидов при заболеваниях печени и желчевыводящих путей:

Отложение липидов в печени (стеатоз) возникает при повышении поступления липидов в гепатоцит, при снижении окисления жирных кислот, при уменьшенном синтезе апобелков по сравнению с потоком образующихся липидов, что сопровождается уменьшением синтеза липопротеидов. Умеренная степень жировой инфильтрации печени, как правило, протекает бессимптомно. Однако жировое перерождение печени, особенно при алкоголизме, ведет к фиброзу (циррозу). Жировая инфильтрация может, как структурный фактор, вызывать повреждения печени в результате нарушения архитектоники гепатоцитов и желчевыводящих путей.

Желчнокаменной болезнью, протекающей бессимптомно или с печеночной коликой, страдает до 20 % взрослого населения. Холестерин, присутствующий в желче, «растворяется» в мицеллах, которые содержат также фосфолипиды и желчные кислоты. При превышении отношения холестерин/фосфолипиды величины 1:1 нарушается растворимость холестерина и имеет место тенденция к кристаллизации вокруг нерастворимого ядра мицелл. Больным с холестериновыми камнями показано ограничение приема холестерина и введение хенодезоксихолевой кислоты, способствующей образованию желчных кислот.

Нарушения обмена липидов при атеросклерозе. Между развитием ИБС и повышением в сыворотке общего холестерина и ЛПНП-холестерина имеется положительная корреляционная связь; между ИБС и повышением в сыворотке ЛПВП - отрицательная корреляционная связь. Снижение высокого уровня ЛПНП-холестерина до нормальных значений сопровождается уменьшением риска ИБС и других нарушений кровотока в органах и тканях.

Гиперхолестеринемия – наиболее документированный фактор риска коронарного атеросклероза. Это подтверждено многочисленными эпидемиологическими и клиническими исследованиями, установившими связь гиперхолестеринемии с коронарным атеросклерозом, частотой клинических проявлений ИБС и инфаркта миокарда. При вторичной профилактике коронарного атеросклероза, в ходе гиполипидемической терапии, показана регрессия клинической картины ИБС и кардиосклероза при нормализации ХС сыворотки крови.

На многих популяциях показана независимость ТГ как фактора риска ИБС. Оценка независимости ТГ как фактора риска ИБС крайне затруднена вследствие наличия отрицательной зависимости между уровнем ТГ и ХС ЛПВП, независимого отрицательного фактора риска ИБС.

Нарушения обмена липидов при сахарном диабете. Гипертриглицеридемия средней тяжести (2,3-5,6 ммоль/л) выявляется в 90 % случаев нелеченного сахарного диабета, тогда как холестерин у больных сахарным диабетом не увеличен или повышен незначительно. В основе нарушений липидного обмена у больных сахарным диабетом лежит как абсолютный (I тип), так и относительный (II тип) недостаток инсулина. Коррекция уровня гликемии инсулином или гипогликемическими препаратами способствует нормализации содержания триглицеридов в крови. В то же время во многих случаях помимо лечения, направленного на нормализацию уровня глюкозы в сыворотке, больным сахарным диабетом как I, так и II типа дополнительно требуется коррекция показателей

липидного обмена, в первую очередь, в качестве профилактики сердечно-сосудистых заболеваний.

Диабет I типа сопровождается абсолютным снижением инсулина, при этом происходит активация липолиза в жировой ткани и освобождение в сосудистое русло СЖК. В печени СЖК эстерифицируются до ТГ и секретируются в форме ЛПОНП. При установившемся метаболизме с нормализацией клиренса ЛПОНП как правило при диабете I типа регистрируется гиперлипопротеинемия IV типа.

Диабет II типа обычно сопровождается ожирением и резистентностью к инсулину. При резистентности к инсулину нарушается поступление глюкозы в жировую и мышечную ткани, в печень же поступает повышенное количество глюкозы и СЖК, что вызывает значительное увеличение образования ТГ и ЛПОНП. Уровень ХС-ЛПНП тем не менее часто остается нормальным. Несмотря на то, что концентрация ХС-ЛПНП зачастую не выходит за пределы нормы, до 5% лизиновых остатков в апо В может быть гликозилировано, что снижает их захват апо В₅Е рецепторами печени и увеличивает захват через сквенджер-рецепторы в макрофаги/моноциты, значительное количество которых находится в сосудистой стенке. В результате увеличивается отложение липидов в артериях и развивается липоидоз.

При II типе сахарного диабета часто бывает снижен уровень ХС-ЛПВП, что способствует развитию сердечно-сосудистых заболеваний. При активном контроле за диетой, воздействии сахароснижающими таблетированными препаратами и инсулином гипергликемия и гипертриглицеридемия поддаются лечению, однако содержание ХС-ЛПВП меняется незначительно. В связи с этим при комплексном лечении сахарного диабета все чаще используются препараты, первично направленные на нормализацию липидного обмена (фибраты, статины).

Патобиохимия ожирения. Ожирение часто сопровождается гипертриглицеридемией, гиперинсулинемией, непереносимостью глюкозы и

сосудистой патологией, напоминая при этом сахарный диабет II типа. Как правило, с увеличением массы тела снижается уровень ХС-ЛПВП в сыворотке. Биохимическим проявлением обычно бывает увеличение синтеза ЛПОНП, поэтому развивается IV тип гиперхолестеринемии. Снижение массы тела за счет ограничения приема углеводов и калорийности пищи приводит к нормализации уровня ТГ. Адипоциты секретируют гормоны и цитокины, которые оказывают как центральное действие на регуляцию энергетического обмена (лептин) так и периферические эффекты на чувствительность к инсулину или инсулинорезистентность (резистин, адипонектин).

Лептин – белок вырабатываемый исключительно адипоцитами жировой ткани, имеет несколько метаболических эффектов. Он играет ключевую роль в регулировании массы тела, влияя на активность энергетического метаболизма и чувство сытости. Этот эффект реализуется через гипоталамус, где взаимодействие лептина с рецептором приводит к чувству насыщения и отказа от пищи. Снижение запасов жировой ткани приводит к уменьшению секреции лептина, что является сигналом для мозга противодействовать потере жиров и способствует возникновению чувства голода. Уровень лептина повышается с увеличением жировой ткани. Имеются обоснованные предположения, что ожирение связано со снижением чувствительности тканей к лептину. При СД 2 типа определяется резистентность не только к инсулину, но и к лептину, что способствует поддержанию повышенной массы жировой ткани. В условиях лептинорезистентности, в сочетании с повышенной концентрацией в плазме СЖК, триглицеридов и липопротеидов, богатых триглицеридами (ЛПОНП и хиломикроны), происходит отложение жирных кислот в виде триглицеридов в скелетных мышцах, миокарде, поджелудочной железе и усиление неокислительного пути метаболизма СЖК, влекущие за собой нарушение обмена глюкозы.

Адипонектин является единственным известным адипокином, обладающим контратерогенными свойствами. Он защищает стенки сосудов

от повреждения и образования тромбов. В мышечной ткани адипонектин стимулирует окисление СЖК, уменьшает накопление липидов в клетках и улучшает чувствительность мышечной ткани к инсулину. Уровень адипонектина уменьшается при ожирении, а похудание сопровождается его увеличением. Это может быть одним из дополнительных условий того, что уменьшение избыточной массы тела является профилактикой атеросклероза.

Наследственные нарушения липидного обмена. В формировании первичных ГЛП основную роль играет наследственная предрасположенность. По данным обследования близнецов в России, изменчивость общего ХС на 82% обусловлена генетическими факторами. Известно много наследственных аномалий обмена ЛП, но только для некоторых установлены точные биохимические дефекты, позволяющие диагностировать заболевание. Полигенная гиперхолестеринемия (ПГХС) – самое распространенное среди наследственных нарушений липидного обмена. При этом заболевании наблюдается гиперхолестеринемия в семье, указывающая на наследственный характер. Распределение уровней ХС в таких семьях сдвинуто в сторону более высоких значений, чем в среднем в популяции и является унимодальным, что указывает на отсутствие моногенного наследования. Полагают, что наличие ПГХС обусловлено суммарным влиянием нескольких генов, при этом проявление ПГХС в большой степени провоцируют средовые факторы, особенно характер питания. Термин ПГХС применяют для характеристики пациентов с наследственной ГХС с неустановленным генетическим дефектом и отсутствии признаков моногенного наследования. Учитывая полигенный характер наследования ПГХС, генетический дефект, определяющий заболевание и его биохимический маркер (или маркеры) неизвестны. Четких критериев постановки этого диагноза не отработано. Проявлением заболевания является преждевременный атеросклероз.

5.5. Биохимия поддержания гомеостаза гормонами и биологически активными веществами

5.1.1. Биологически активные вещества. Химическая природа, физиологические и возможные патологические эффекты, клиническое значение определения

Ренин и ангиотензин. Ренин является протеолитическим ферментом, выделяемым юкстагломерулярным аппаратом почек. Секреция ренина в почках стимулируется снижением кровяного давления в привносящих к клубочкам артериях, понижением концентрации натрия в области плотного пятна и дистальных канальцев, а также в результате возбуждения симпатической системы. В качестве субстрата для ренина выступает белок плазмы ангиотензиноген. Ренин вызывает гидролиз ангиотензиногена до декапептида ангиотензина I, который затем под влиянием ангиотензин-превращающего фермента трансформируется в ангиотензин II.

Ангиотензин II стимулирует секрецию альдостерона в коре надпочечников, сокращает гладкую мускулатуру кровеносных сосудов, вызывая повышение артериального давления.

Ангиотензин-превращающий фермент (АПФ) представляет собой гликопротеид, присутствует в основном в легких и в небольших количествах в щеточной каемке эпителия проксимальных канальцев почек, эндотелии кровеносных сосудов и плазме крови. АПФ является ключевым ферментом сосудистого тонуса. С одной стороны, катализирует превращение ангиотензина I в один из наиболее мощных вазоконстрикторов - ангиотензин II. С другой стороны, АПФ гидролизует вазодилататор брадикинин до неактивного пептида. Синтезированные ингибиторы АПФ оказались эффективными для понижения давления у больных с реноваскулярной

формой гипертонии, в терапии сердечной недостаточности, показан антиатеросклеротический эффект этих препаратов.

Таблица 5.34

Диагностическое значение изменений ренина, ангиотензина и ангиотензинпревращающего фермента в сыворотке крови

Ренин	Ангиотензин II	АПФ
Референтные значения		
Горизонтальное положение (лежа) 2,1-4,3 нг/мл в час; вертикальное положение (стоя) 5,0–13,6 нг/мл в час.	Артериальная кровь 12-36 пг/мл; венозная кровь 50-75% концентрации в артериальной крови	Дети: моложе 12 лет 9,4-37,0 Е/л; 13-16 лет 9,0-33,4 Е/л. Взрослые 6,1-26,6 Е/л.
Повышение активности		
Уменьшение внеклеточной жидкости: кровотечения, бедный натрием рацион питания, ограничения питья. Правожелудочковая недостаточность Нефротический синдром. Цирроз печени. Первичная недостаточность коры надпочечников (болезнь Аддисона). Активизация симпатической нервной системы. Сужение почечной артерии. Нейробластома, выделяющая рениноподобный белок. Рак почки, выделяющий ренин. Лекарственные препараты (диуретики, кортикостероиды, diazoxid, гидралазин, простагландины, эстрогены).	Повышение артериального давления (почечная гипертония). Опухоли юкстагломерулярного аппарата почек, секретирующие ренин.	Повышенная активность щитовидной железы. Алкогольное повреждение печени. Сахарный диабет (в некоторых случаях). Саркоидоз (особое значение имеет в мониторинге лечения).
Снижение активности		
Чрезмерное потребление соли. Ограниченное потребление калия. Увеличенное выделение вазопрессина. Острая почечная недостаточность. Первичный гиперальдостеронизм. Лекарственные препараты (антагонисты бета-адренергических рецепторов, альфа-метилдофа, резерпин, клонидин, ингибиторы синтеза простагландинов).	Синдром Конна (первичный гиперальдостеронизм). Обезвоживание (дегидратация)	Болезни легких. Лечение каптоприлом. Пониженная активность щитовидной железы

Серотонин. Серотонин – один из основных нейромедиаторов. По химическому строению серотонин относится к биогенным аминам. Физиологические функции серотонина чрезвычайно многообразны. Серотонин «руководит» очень многими функциями в организме. При снижении серотонина повышается чувствительность болевой системы организма, то есть даже самое слабое раздражение отзывается сильной болью. Серотонин играет важную роль в процессах свёртывания крови. Тромбоциты крови содержат значительные количества серотонина и обладают способностью захватывать и накапливать серотонин из плазмы крови. Серотонин повышает функциональную активность тромбоцитов и их склонность к агрегации и образованию тромбов. Стимулируя специфические серотониновые рецепторы в печени, серотонин вызывает увеличение синтеза печенью факторов свёртывания крови. Выделение серотонина из повреждённых тканей является одним из механизмов обеспечения свёртывания крови по месту повреждения.

Дефицит или ингибирование серотонинергической передачи, например, вызванные снижением уровня серотонина в мозге является одним из факторов формирования депрессивных состояний, навязчивых расстройств и тяжелых форм мигрени.

Гиперактивация серотониновых рецепторов, например, при приёме некоторых наркотиков, может привести к галлюцинациям. С хронически повышенным уровнем их активности может быть связано развитие шизофрении.

Гистамин. Гистамин – биогенный амин, является регулятором многих физиологических процессов.

В обычных условиях гистамин находится в организме преимущественно в связанном, неактивном состоянии. При патологических процессах (анафилактический шок, ожоги, обморожения, сенная лихорадка, крапивница и аллергические заболевания), а также при поступлении в организм некоторых химических веществ, гистамин освобождается из

тучных клеток (гистиоцитов) и переходит в активную форму, количество свободного гистамина увеличивается. Свободный гистамин обладает высокой активностью: он вызывает спазм гладких мышц (включая мышцы бронхов), расширение капилляров и понижение артериального давления; застой крови в капиллярах и увеличение проницаемости их стенок; вызывает отёк окружающих тканей и сгущение крови.

Простагландины и лейкотриены. В эндотелиальных клетках, активированных тромбоцитах и других клетках из мембранных фосфолипидов под действием фосфолипаз освобождается арахидоновая кислота, которая в свою очередь является предшественником эйкозаноидов – кислородсодержащих производных. В эндотелиальных клетках из полиненасыщенной арахидоновой кислоты при участии специфического мультиферментного комплекса циклооксигеназы синтезируются простагландин и ряд активных простагландинов – PGD_2 , PGE_2 , $\text{PGF}_{2\alpha}$. В тромбоцитах при активации фосфолипаз из образующейся арахидоновой кислоты синтезируется в основном тромбоксан (TXA_2), он является мощным стимулятором адгезии тромбоцитов. Роль простагландинов и тромбоксанов исключительно важна (сейчас их объединяют под общим названием простаноиды) в работе кровеносной системы, в репродуктивной функции, они принимают участие в развитии воспалительных процессов и иммунного ответа. Сейчас известно около 30 природных простаноидов. Они разделены на группы А, В, С, D, E, F, G, I. Как правило, в одном типе клеток синтезируется один тип простагландинов, а в органе или ткани проявляется действие пары простагландинов-антагонистов, от соотношения концентраций которых зависит нормальное или патологическое состояние этого органа или ткани. Так, в тканях дыхательных путей образуются простагландины F_2 и E_2 (цифрой обозначается число двойных связей в молекуле простагландина), причем первый из них синтезируется в легочной ткани и способен вызывать сокращение мышцы бронхов, а второй - в бронхах, но оказывает прямо противоположное действие, т.е. расслабляет их.

Сейчас уже установлено, что усиление синтеза ПГF₂ и понижение концентрации ПГE₂ приводят к возникновению разных форм бронхиальной астмы, изменение уровня этих простагландинов зафиксировано и у больных пневмонией и бронхитом.

В лейкоцитах арахидоновая кислота является предшественником липооксигеназного пути образования лейкотриенов. Идентифицированы ЛТА₄, ЛТВ₄, LTC₄, LTD₄, LTE₄. Подкласс лейкотриенов, вместе с простаноидами, входит в класс эйкозаноидов. Один из основных эффектов лейкотриенов – бронхоспазм – лежит в основе патогенеза бронхиальной астмы. ЛТВ₄ – опосредует хемотаксис, экссудацию плазмы, сокращение паренхимы лёгких. Группа лейкотриенов LTC₄, LTD₄, LTE₄ относится к мощным бронхоконстрикторам. Также эти лейкотриены способны повышать тонус гладких мышц ЖКТ, опосредовать экссудацию плазмы и сокращение паренхимы лёгких.

Интерлейкины. Интерлейкинами называют растворимые медиаторы, продуцируемые в основном лимфоцитами и моноцитами и оказывающие регуляторное действие на другие клетки иммунной системы или клетки, участвующие в иммунной реакции организма. Термин «интерлейкины» обозначает медиаторы, осуществляющие связь между лейкоцитами. Однако их биологические эффекты распространяются далеко за пределы иммунной системы, и поэтому более приемлемым термин «цитокины». Характерные признаки цитокинов

- В основном цитокины – простые белки или гликопротеины с молекулярным весом до 30 кДА.
- Продукция цитокинов кратковременна, а радиус действия обычно короткий (типичное действие аутокринное или паракринное, но не эндокринное).
- Цитокины реализуют свои эффекты через специфические высокоафинные рецепторы

- Фенотипически действие цитокинов приводит к повышению (или к снижению) скорости клеточной пролиферации, к изменению клеточной дифференцировки и проявлению различных функций соматических клеток.

- Хотя набор биологических эффектов различных цитокинов может различаться, мишенями для большинства цитокинов являются гемопоэтические клетки.

Исследование системы цитокинов в клинко-диагностических лабораториях проводится в зависимости от конкретных задач в основном иммунохимическими и молекулярно-биологическими методами. Наибольшее распространение получили иммуноферментные диагностические тест-системы, позволяющие проводить количественный анализ содержания цитокинов в любых биологических жидкостях и обладающие достаточно высокой чувствительностью для определения уровней цитокинов у человека. Для оценки уровней цитокинов в различных биологических жидкостях используются мультиплексные методы, в основе которых лежит «сэндвич»-метод ИФА в разных комбинациях.

Определение цитокинов в биологических жидкостях используют для оценки активности воспаления, характеристики иммунного ответа, оценки эффективности проводимой терапии и прогноза заболевания.

Калликреин и брадикинин. Калликреин – кининовая система (ККС) является ключевой протеолитической системой, участвующей в регуляции широкого спектра физиологических функций организма и развитии многих патологических состояний. Калликреин плазмы крови (молекулярная масса 97 кДа) вырабатывается в печени в виде неактивного предшественника – прекалликреина. Под действием калликреинов выщепляются биологически активные пептиды – кинины, в том числе брадикинин, обладающий сосудорасширяющим действием и понижающий кровяное давление. Роль ККС не ограничивается участием в регуляции кровяного давления, ККС принимает активное участие в морфогенезе клеток, контроле тонуса гладкой мускулатуры некоторых органов, увеличения проницаемости сосудистой

стенки, в том числе гематоэнцефалического барьера, развитии воспаления, трансформации клеток. Такие процессы, как гемостаз, водно-солевой обмен, многие функции желудочно-кишечного тракта и репродуцирующей системы могут повреждаться, являясь мишенями воспаления и боли, при этом центральным событием является активация ККС и образование брадикинина.

5.1.2. Лабораторная оценка функционального состояния эндокринной системы

Каскадный принцип строения гормональной системы. Эндокринная система построена по иерархической схеме. В нейронах гипоталамуса вырабатываются релизинг-гормоны, которые под влиянием стимулов из ЦНС, механизмов обратной связи или за счет циркадных ритмов периодически секретируют в сосудистые сплетения релизинг-гормоны. Релизинг-гормоны, в свою очередь, поступают в переднюю долю гипофиза и стимулируют там образование тропных гормонов: соматотропного гормона (СТГ), пролактина (ПРЛ), адренокортикотропного гормона (АКТГ), тиреотропного гормона (ТТГ), фолликулостимулирующего гормона (ФСГ), лютеинизирующего гормона (ЛГ). В задней доле гипофиза синтезируются вазопрессин (синоним – антидиуретический гормон) и окситоцин. Каскадная схема организации гормональной активности учитывается при лабораторной диагностике нарушений эндокринной функции.



Рис. 5.6. Каскадный принцип организации эндокринной системы. Сокращения: ТРГ – тироксин релизинг-гормон (фактор), КРГ – кортикотропин релизинг-гормон, СРГ – соматотропин релизинг-гормон, ТТГ – тиреотропный гормон, АКТГ – адренкортикотропный гормон, ФСГ – фолликулостимулирующий гормон, ЛГ – лютеинизирующий гормон, Т4 – тироксин, Т3 – трийодтиронин, ИПФР – инсулиноподобный фактор роста

Релизинг-факторы гипоталамо-гипофизарной системы. Семейство релизинг-факторов (гипофизарных либеринов и статинов) включает небольшие пептиды, образующиеся в нейронах мелкоклеточных ядер медиобазального и отчасти заднего гипоталамуса и хранящиеся в срединном возвышении нейрогипофиза. Гормоны гипоталамуса поступают в воротную систему гипофиза. Секреция либеринов и статинов контролируется адренергическими, холинергическими и дофаминергическими нейронами высших нервных центров. Кроме того, секреция некоторых гормонов аденогипофиза и либеринов тормозится гормонами периферических эндокринных желез по принципу отрицательной обратной связи. В частности, в регуляции роста участвуют гормоны гипоталамуса, аденогипофиза и периферических эндокринных желез – мишеней аденогипофизарных гормонов. Известны 10 релизинг-факторов, участвующих в регуляции секреции гормонов аденогипофиза. Релизинг-факторы состоят из небольшого количества аминокислотных остатков: тиролиберин является трипептидом, ЛГ/ФСГ-РФ – декапептид, соматостатин – тетрапептид. Релизинг-факторы не всегда обладают строго специфической направленностью действия. Так, ТРФ – стимулятор секреции не только тиреотропного гормона (ТТГ), но и пролактина. ЛГ-РФ стимулирует продукцию лютеинизирующего гормона (ЛГ) и фолликулостимулирующего гормона (ФСГ). Соматостатин обладает довольно широким спектром ингибирующих эффектов на эндокринные функции: он тормозит секрецию соматотропина (СТГ), индуцированную секрецию ТТГ и пролактина передней долей гипофиза, секрецию инсулина и особенно глюкагона поджелудочной железой, а также гормонов желудочно-кишечного тракта.

Интересно, что соматостатин образуется не только в гипоталамусе, но и в островковом аппарате поджелудочной железы.

Тропные гормоны гипофиза. Тропными гормонами гипофиза являются соматотропный гормон (СТГ), пролактин (ПРЛ), аденокортикотропный гормон (АКТГ), тиреотропный гормон (ТТГ), фолликулостимулирующий гормон (ФСГ), лютеинизирующий гормон (ЛГ).

Гипопитуитаризм – снижение функции передней доли гипофиза, может проявляться как недостаточным синтезом одного, так и отсутствием синтеза всех тропных гормонов. Это может быть следствием или недостаточности самих клеток гипофиза или отсутствием стимуляции со стороны гипоталамуса. Гипопитуитаризм может быть врожденным или развиться в результате гипофизэктомии, облучения, опухоли гипофиза, кровоизлияния или инфильтративного гранулематозного процесса. Из тиреотропных гормонов наиболее распространенными при лабораторном мониторинге при гипопитуитаризме являются исследования ТТГ и пролактина.

Опухоли гипофиза составляют примерно 10% от всех внутричерепных опухолей. Симптомы связаны с локальным сдавливанием, нарушением секреции гормонов, питуитаризмом. Аденома гипофиза может быть нефункционирующей или функционирующей по 1 гормону с гипосекрецией других гормонов, как правило, это болезнь Кушинга или акромегалия. Классификация опухоли гипофиза по секретируемому гормону представлена в табл. 5.35.

Таблица 5.35

Частота встречаемости секретирующих и несекретирующих опухолей гипофиза

Пролактин (только)	35%
СТГ	20%
пролактин + СТГ	7%
АКТГ	7%
ЛГ\ФСГ\ТТГ	1%
несекретирующие опухоли	30%

Лабораторный мониторинг при опухоли гипофиза: Определение пролактина, ТТГ, ФСГ, ЛГ;

- Мониторинг кортизола;
- Тесты стимуляции гормонов гипофиза.

Акромегалия – достаточно распространенная патология, основной причиной которой является гиперсекреция СТГ (гормона роста). Отличительные признаки заболевания – быстрое старение, удлинение конечностей, сахарный диабет.

Лабораторные исследования для диагностики акромегалии. Изолированное измерение СТГ может указать на повышенную секрецию (норма < 8 нг/мл), однако СТГ секретируется непостоянно, имеет короткое время полувыведения. Многие факторы вызывают его повышение: физическая нагрузка, гипогликемия и голодание, заболевания печени, почечная недостаточность, стресс, неконтролируемый сахарный диабет.

Скрининговый тест – определение содержания в сыворотке IGF-1 (ИФР-1, он же соматомедин С или инсулиноподобный ростовой фактор-1). Его уровень отражает секрецию СТГ за 24 ч и может указать на гиперсекрецию СТГ.

Подтверждающий тест – глюкозотолерантный тест (ГТТ) с определением СТГ.

Специфика проведения ГТТ:

- необходимо брать кровь, не тревожа больного (устанавливают в вену канюлю за 1 ч до теста);
- кровь исследуют до и через 30, 60, 90, 120 и 150 минут после нагрузки 75 г глюкозы;
- исследуют СТГ, инсулин и глюкозу.

Интерпретация:

- норма – СТГ падает < 2 нг/мл;
- акромегалия (гипотиреоз, болезнь Кушинга, плохо контролируемый сахарный диабет) – СТГ > 2 нг/мл.

Гормоны задней доли гипофиза. Гипоталамо-заднегофизарная система состоит из крупных нейросекреторных клеток, которые у высших позвоночных располагаются в двух основных ядрах: супраоптическом и паравентрикулярном. Волокна, проводящие нейросекрет и составляющие гипоталамо-гипофизарный тракт, оканчиваются в нейрогипофизе, или задней доле гипофиза. В клетках этих ядер происходит выработка вазопрессина (антидиуретического гормона) и окситоцина. В супраоптическом ядре вырабатывается преимущественно вазопрессин, а в паравентрикулярном – больше окситоцина. Эти гормоны состоят из девяти аминокислот. Рецепторы вазопрессина расположены в почечных канальцах. Вазопрессин – ведущий фактор регуляции осморегулярной функции почек, он уменьшает мочеотделение и повышает осмотическую концентрацию мочи. Это действие гормона связано главным образом с увеличением проницаемости базальной мембраны канальцев для натрия и воды. Недостаток вазопрессина вызывает несахарный диабет.

Окситоцин оказывает влияние на гладкую мускулатуру матки и других органов (половых протоков, стенки кровеносных сосудов), стимулирует родовую деятельность. Кроме того, этот гормон вызывает сокращение миоэпителиальных клеток в молочной железе, стимулируя выделение молока.

Лабораторная оценка гормональной активности щитовидной железы. Тиреотропин-релизинг-гормон (ТРГ) – тиреолиберин синтезируется в ядрах гипоталамуса, секретруется в импульсном режиме, стимулирует синтез и секрецию тиреотропного гормона (ТТГ). ТТГ стимулирует синтез тиреоидных гормонов – тироксина (Т4) и трийодтиронина (Т3), увеличивает размеры и количество фолликулов в щитовидной железе. Продолжительная ТТГ-стимуляция сопровождается усилением васкуляризации и гипертрофией щитовидной железы. Контроль над взаимодействием гипофиза и гипоталамуса происходит за счет механизма обратной связи с участием тиреоидных гормонов (рис. 5.7). Отрицательная обратная связь на уровне

гипофиза проявляется в том, что T4 и T3 подавляют биосинтез и секрецию ТТГ. Гипофизарная секреция ТТГ очень чувствительна к изменениям концентрации T4 и T3 в сыворотке.

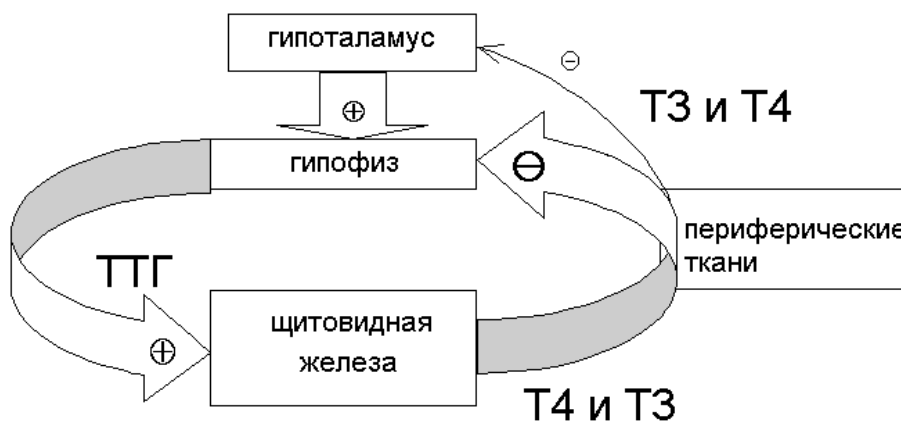


Рис. 5.7. Регуляция секреции тиреоидных гормонов по механизму обратной связи

Хотя тироксин основной продукт щитовидной железы, он не является наиболее активной формой, T3 – более сильный гормон. При нормальной функции щитовидной железы около 15-20 % циркулирующего T3 поступает из щитовидной железы, большая же часть T3 образуется в периферических тканях. Голодание и хронические нетиреоидные заболевания уменьшают активность периферических тканей по преобразованию T4 в активный гормон T3. Стресс, соматостатин, эстрогены, глюкокортикоиды, охлаждение также влияют на образование ТТГ. В кровотоке гормоны щитовидной железы связаны с циркулирующими белками плазмы, период полувыведения гормонов составляет около 7 дней. Основным белком, связывающим тироксин, является тироксинсвязывающий глобулин (ТСГ). Свободный T4 (свТ4) и свободный T3 (свТ3) – это биологически активные формы гормонов, участвующие в метаболизме. При субклиническом гипертиреозе общий T4 остается в норме, тогда как свободный возрастает в несколько раз. Как и общий, свободный T4 понижен в случае пациентов с явным гипотиреозом, но при субклинической форме общий T4 остается в норме в отличие от свободной формы гормона. Поэтому диагностически важным является определение концентраций свТ4, и реже свТ3.

Скрининг заболеваний щитовидной железы. Выявление гипер- и гипотиреоза основано на определении в сыворотке гормонов ТТГ, Т4 (свТ4) и Т3 (свТ3). Определение ТТГ в плазме крови является основным методом для диагностики заболеваний тиреоидного профиля (табл. 5.36). Нормальный базальный уровень ТТГ у негоспитализированных пациентов исключает гипертиреоз и первичный гипотиреоз. Низкий уровень ТТГ параллельно с повышенными уровнями Т4 (свТ4) и/или Т3 (свТ3) имеют место при гипертиреозе, высокий уровень ТТГ и пониженный уровень Т₄ (свТ₄) подтверждает наличие гипотиреоза.

Таблица 5.36

Базальные значения ТТГ и интерпретация

Концентрация ТТГ (мЕд/л)	Диагностическое значение
Ниже 0,1	При повышенных концентрациях свТ4 или свТ3 — гипертиреоз с подавленной регуляцией гипофизарно-тиреоидной системы
0,1-0,4	Ниже нормы. Необходимо определить свТ4 и Т3
0,4-5,0	Эутиреоидный диапазон. Могут проявляться функциональные нарушения щитовидной железы
5,0-10	Выше нормы. Рекомендуется проведение ТРГ-теста для подтверждения или исключения латентной формы гипотиреоза. Дефекты усвояемости йода, ярко выраженная недостаточность йода, Опухоли гипофиза, продуцирующие ТТГ
Выше 10	Первичный гипотиреоз, опухоли гипофиза, продуцирующие ТТГ

Уровень Т4 в сыворотке – основной аналитический параметр, дающий четкое представление о функции щитовидной железы.

Сниженный уровень Т4 – гипотиреоз.

- Первичный гипотиреоз при аутоиммунном тиреоидите,
- Тиреостатическая терапия.
- Ярко выраженный дефицит йода.
- Вторичный (гипофизарный) гипотиреоз.

Повышенный уровень Т4 – гипертиреоз.

- Локализованная аденома или рассеянные автономные клетки.
- Диффузный токсический зоб (болезнь Базедова).
- Ранняя стадия подострого тиреоидита или тиреоидита Хашимото.

- Острый гипертиреоз.
- Опухоли гипофиза.

Трийодтиронин (Т3), свободный Т3 (свТ3) – основной биологически активный тиреоидный гормон. Нормальный уровень Т3 может быть при скрытых функциональных дефектах тиреоидной функции, при гипотиреозе, компенсированном повышенным превращением Т4 в Т3. Диагностическое значение определения Т3 (свТ3) при дифференциальной диагностике Т3 гипертиреоза, начальной стадии токсической аденомы и многоузлового зоба, рецидивов гипертиреоза на фоне супрессивной терапии левотироксином.

Диагностика нозологических форм заболеваний щитовидной железы.

Основная патология щитовидной железы обусловлена аутоиммунным процессом. Для выявления причины аутоиммунных заболеваний определяют уровень аутоантител: антитела к ТТГ-рецепторам-тироксинстимулирующие иммуноглобулины (ТСИ), антитела к тиреопероксидаза (анти-ТПО), антитела к тиреоглобулину (анти-ТГ).

При опухолевых заболеваниях щитовидной железы опухолевым маркером является тиреоглобулин и кальцитонин. Тиреоглобулин – маркер некротизирующихся опухолей, кальцитонин – маркер С-клеточного рака щитовидной железы. Основное значение в дифференциальной диагностике опухолей имеют результаты цитологического исследования пунктатов с использованием тонкоигольной биопсии.

Лабораторная оценка гормональной активности паращитовидных желез. Основным гормоном паращитовидных желез является паратиреоидный гормон (ПТГ), который контролирует метаболизм кальция и неорганического фосфора, действуя главным образом на кости, почки и желудочно-кишечный тракт. ПТГ оказывает гиперкальций- и гипофосфатемический эффект, вызывая выход кальция из кости, усиленную реабсорбцию его в проксимальных канальцах почек и всасывание кальция в кишечнике. Кроме того, ПТГ в почках активизирует образование кальцитриола [1,25(ОН)₂D₃]. Секретция ПТГ находится в обратной зависимости от

концентрации ионов кальция в крови. Концентрация ионов кальция в плазме является главным фактором, регулирующим выделение ПТГ паращитовидными железами. Для гиперпаратиреоза патогномично одновременное повышение содержания кальция и снижение неорганического фосфора в сыворотке, а для гипопаратиреоза – снижение кальция и повышение неорганического фосфора.

ПТГ – пептид, построенный из 84 аминокислот, время его полужизни в крови около 20 мин. Гормон подвергается постепенному катаболизму в печени и почках, поэтому в системе циркуляции, наряду с интактным ПТГ, присутствуют многочисленные пептидные фрагменты, заслуживающие внимания в плане диагностики. Преобладающим фрагментом является биологически неактивный С-концевой пептид ПТГ. Его концентрация в сыворотке коррелирует с секреторной функцией паращитовидных желез. Биологически активной частью гормона является N-концевой 1-34 ПТГ, определение концентрации которого проводится в случаях нарушения метаболизма ПТГ.

Повышение концентрации.

Первичная гиперфункция паращитовидных желез:

- гиперплазия паращитовидных желез;
- рак паращитовидных желез.

Вторичная гиперфункция паращитовидных желез:

- тип I – связанная с опухолью гипофиза или островковой ткани поджелудочной железы;
- тип II – связанная с раком щитовидной железы или феохромоцитомой.

Эктопическое выделение ПТГ. Выделение субстанций, подобных ПТГ новообразованиями, но не паращитовидными железами (например, при раке легких, груди, надпочечника).

Лабораторная оценка гормональной активности поджелудочной железы. Основными гормонами поджелудочной железы являются

секретируемые альфа-клетками островков Лангенгарса глюкагон и бета-клетками инсулин.

Глюкагон – пептидный гормон, его выделение увеличивается при понижении концентрации глюкозы в крови. Глюкагон активирует в печени процесс глюкогенеза и гликогенолиза, а также процесс липолиза в жировой ткани. Глюкагон стимулирует секрецию инсулина; это явление используется в тестах с нагрузкой глюкагоном. Лабораторными методами с применением антител определяется общий глюкагон.

Выделение гормона увеличивается при:

- гипогликемии, голодании;
- интенсивной и длительной физической работе;
- повышении активности адренергической системы.

Повышение концентрации.

- Глюкагонома (опухоль, выделяющая глюкагон).
- Кетоацидоз, гиперосмолярная кома при сахарном диабете.
- Сепсис.
- Тяжелый панкреатит.
- Уремия (снижен распад в почках).

Инсулин является пептидным гормоном, выделяемым бета-клетками островков Лангерганса поджелудочной железы. Перед выделением из бета-клеток полипептид проинсулин подвергается протеолизу до инсулина и С-пептида. В организме происходят постоянные колебания концентрации инсулина во внеклеточной жидкости: повышение после приема пищи и снижение при голодании. Отражением изменения концентрации инсулина являются колебания концентрации глюкозы в крови. Измерение концентрации инсулина в крови излишне для диагностики сахарного диабета, но информативно для диагностики инсулиномы.

Абсолютные показатели концентрации инсулина часто имеют минимальное диагностическое значение, большее значение имеет тест

стимуляции глюкозой. В случае сахарного диабета максимальная концентрация инсулина после введения глюкозы появляется позднее и может быть выше, чем у здоровых людей.

C-пептид (соединительный пептид) является фрагментом пептидной цепи проинсулина. Инсулин и C-пептид являются конечными продуктами преобразования проинсулина в бета-клетках островков поджелудочной железы в результате воздействия эндопептидазы. Выделение инсулина и C-пептида в кровь бета-клетками равномолярно. Время полужизни в плазме крови C-пептида дольше, чем у инсулина; из системы циркуляции инсулин удаляется печенью, C-пептид – почками. Поэтому отношение C-пептид/инсулин равно 5/1. Определение концентрации C-пептида в крови позволяет охарактеризовать остаточную синтетическую функцию бета-клеток (после стимуляции глюкагоном или толбутамидом), особенно у больных, леченных гетерогенным инсулином. В клинической практике определение C-пептида используется для определения причины возникающей гипогликемии.

Повышение концентрации:

- Инсулинома. Проведение анализа особенно показано для пациентов, требующих лечения инсулином после резекции гормонально функционирующей опухоли, производящей инсулин; обнаружение повышенной концентрации C-пептида указывает на метастазы или на рецидив опухоли.

Снижение концентрации:

- Введение экзогенного инсулина. Оценка синтетической функции бета-клеток определением инсулина у пациентов, лечившихся инсулином или имеющих противоинсулиновые антитела, невозможна по методическим соображениям из-за присутствия экзогенного инсулина и антител к инсулину.

- Сахарный диабет 1-го типа.
- Сахарный диабет 2-го типа (за исключением ранней стадии).

Лабораторная оценка гормональной активности надпочечников.

Гормонально активными в надпочечниках являются кора и клубочковый слой надпочечников. В коре вырабатываются глюкокортикоиды – кортизол, кортикостерон – и андрогены – дегидроэпиандростерон(DHA), его сульфат (DHAS) и андростенедион. Основным гормоном коркового вещества является минералокортикоид альдостерон.

Кортизол является стероидным гормоном, выделяемым в кровь корой надпочечника. Кортизол составляет 75-90% кортикоидов, циркулирующих в крови. Кортизол главным образом связан с глобулином транскортином и альбумином. Менее 5% циркулирующего в крови кортизола биологически активно. Кортизол метаболизируется в печени, период полураспада гормона составляет 80-110 мин, он фильтруется в почечных клубочках и удаляется с мочой.

Повышение концентрации.

- Синдром Иценко–Кушинга.
- Цирроз печени (снижение катаболизма кортизола).
- Некомпенсированный сахарный диабет.
- Стресс, болевой синдром, лихорадка.
- Острые инфекционные заболевания, менингиты.

Влияние лекарственных препаратов.

- Синтетические аналоги глюкокортикоидов (особенно преднизолон и преднизон).
- Амфетамин.

Снижение концентрации.

- Первичная гипопункция коры надпочечника (болезнь Аддисона).
- Гипопункция коры надпочечника при нарушении функции гипофиза.
- Торможение функции коры надпочечника в результате длительного приема АКТГ или глюкокортикоидов.

Альдостерон – стероидный гормон, синтезируется из холестерина в клетках клубочкового слоя коры надпочечника. Это самый сильнодействующий минералокортикостероид. Органом-мишенью для альдостерона являются почки. Он воздействует главным образом на дистальные каналцы, стимулируя реабсорбцию ионов натрия и секрецию ионов калия и водорода. Главным фактором, регулирующим секрецию альдостерона, является объем циркулирующей крови. Гиповолемия ведет к активизации системы ренин-ангиотензин и к повышению секреции альдостерона. Кроме того, секреция альдостерона увеличивается вследствие:

- повышения концентрации калия в плазме;
- повышения концентрации АКТГ в плазме (при физиологических условиях);
- возбуждения бета-адренергической системы.

Выделение альдостерона подчинено суточному ритму. Пик концентрации гормона отмечается по утрам, самая низкая концентрация — около полуночи.

Концентрация альдостерона увеличивается в лютеиновую фазу овуляторного цикла и во время беременности.

Повышение концентрации.

- Первичный гиперальдостеронизм (синдром Конна):
 - снижение активности ренина в плазме крови;
 - альдостерома;
 - гиперплазия коры надпочечников.
- Вторичный гиперальдостеронизм (повышение активности ренина в плазме крови):
 - сердечно-сосудистая, легочная, печеночная, почечная патология, сопровождающаяся гипертонией и отеками.

Снижение концентрации.

- Первичный гипоальдостеронизм

- Вторичный гипoadостеронизм:
 - препараты, блокирующие адренергическую систему.

Лабораторная оценка гормональной активности женских половых желез. У женщин половыми гормонами являются эстрогены, а также гормоны желтого тела – гестагены. В яичниках у женщин синтезируются эстрогены, а также в небольшом количестве тестостерон, который является предшественником эстрогенов. Прогестерон, женский половой гормон, синтезируется желтым телом яичника, образующимся и осуществляющим свою функциональную активность после наступления овуляции. В период беременности выработка эстрогенов и прогестерона осуществляется плацентой.

Гормональная регуляция менструального цикла. Во время менструального цикла репродуктивные органы претерпевают серию изменений, которые делают возможным развитие яйцеклетки, ее оплодотворение и прикрепление оплодотворенной яйцеклетки в матке. В менструальном цикле различают 4 фазы: менструальную, фолликулиновую (эстрогенную, пролиферативную), овуляторную и лютеиновую (прогестиную, секреторную). Эти фазы связаны с созреванием яйцеклетки, которое регулируется гонадотропными гормонами гипоталамо-гипофизарной системы. Повышение ФСГ стимулирует развитие нескольких (10-15) фолликулов, но наступает созревание лишь одного из них, другие фолликулы подвергаются в этот период атрезии. ФСГ способствует синтезу в фолликуле эстрогенов. Концентрация эстрадиола в крови достигает максимума в предовуляционный период, что приводит к высвобождению большого количества гонадолиберина в гипоталамусе и последующему пику высвобождения ЛГ и ФСГ. Предовуляторное повышение ЛГ и ФСГ стимулирует разрыв фолликула и овуляцию. В общем виде считается, что ФСГ определяет рост фолликулов в яичнике, а ЛГ – их стероидную активность. В течение менструального цикла происходит переключение

секреторной активности яичников с эстрогенов в фолликулярной фазе цикла на прогестерон – в фазе желтого тела. Идентифицировано около 30 эстрогенов, основным из них является эстрадиол, его, как правило, определяют для оценки эндокринной активности фолликулов.

Гормональная диагностика аменореи

При дифференциальной диагностике гипер- и гипогонадотропного гипогонадизма следует определять содержание ФСГ в сыворотке крови. Повышение ФСГ, как правило, указывает на первичную недостаточность яичников. Вторичная аменорея, наблюдаемая после приема пероральных контрацептивов, у большинства больных связана с повышением секреции пролактина. Для выяснения причин бесплодия надо провести тщательное обследование женщины, в том числе гормональное. Оценивают функцию щитовидной железы, определяют уровень пролактина, ФСГ. В зависимости от изменения этих гормонов определяют уровень ЛГ, прогестерона, эстрадиола в сыворотке крови в различные фазы цикла, экскрецию с мочой 17-КС, 17-ОКС, кортизола, дегидроэпиандростерона, тестостерона, эстрагенов.

Лабораторная оценка гормональной активности мужских половых желез. Нарушения, возникающие на различных уровнях нейрогормональной системы, играют существенную роль в патогенезе бесплодия у мужчин. Эндокринные нарушения составляют от 15 до 30% случаев мужского бесплодия. Они могут возникать внутриутробно в результате аномалии половых хромосом, при эндогенных и экзогенных интоксикациях в процессе развития мужских половых органов. Эндокринные нарушения могут носить приобретенный характер в результате постнатального нарушения развития или повреждения яичек.

Для оценки функции гонадной оси используется базовая гормональная диагностика, по ней проводят дифференциальную диагностику между первичным и вторичным гипогонадизмом. Она включает определение в крови содержания ЛГ, ФСГ, пролактина и тестостерона. При необходимости

диагностическую панель расширяют, включая в нее определение эстрадиола, ТТГ и других гормонов.

В процессе базового обследования могут быть получены следующие результаты:

- При первичном гипогонадизме, когда поражены яички, в крови выявляется высокий уровень гонадотропинов и низкий – тестостерона.
- При вторичном гипогонадизме, когда имеется дефицит гонадотропинов, уровни в крови ЛГ, ФСГ и тестостерона низкие.
- Реже встречается нормогонадотропный гипогонадизм, когда имеет место сочетанное поражение яичек и гипоталамо-гипофизарной области. При этой патологии в крови выявляется низкий уровень тестостерона при нормальных уровнях ЛГ и ФСГ.

Пролактин – пептидный гормон передней доли гипофиза. Гиперпролактинемия может вызвать нарушение репродуктивной функции у мужчин. Прямого действия пролактина на гаметогенез не зарегистрировано, но повышенные концентрации пролактина вызывают дисфункцию гонадной оси, поэтому связь гиперпролактинемии с пониженной фертильностью объясняют скорее падением уровня гонадотропинов, чем прямым эффектом пролактина на функцию гонад. Определяют пролактин в случаях бесплодия и импотенции. Гормональное обследование мужчины часто начинают с определения уровня пролактина в крови.

Лабораторная оценка гормональной активности фетоплацентарного комплекса. После зачатия для сохранения оплодотворенной яйцеклетки необходимо прекращение циклической деятельности яичников и предотвращение отслойки эндометрия. Данный процесс обеспечивается специфическим гормоном беременности – хорионическим гонадотропином человека (ХГЧ). Молекула ХГЧ состоит из двух субъединиц – α и β , различающихся по аминокислотному составу; α -субъединица (α -цепь) имеет такую же структуру, как и α -цепи

лютеинизирующего (ЛГ), фолликулостимулирующего (ФСГ) и тиреотропного (ТТГ) гормонов. β -Субъединица отличается от аналогичных структур ФСГ, ЛГ и ТТГ и определяет специфическую биологическую активность ХГЧ. ХГЧ продуцируется клетками синцитиотрофобласта. Этот гормон, имитируя активность ЛГ и ФСГ, стимулирует выработку в желтом теле половых гормонов. Ко времени достижения зиготой (бластоцистой) полости матки синтезируется такое количество ХГЧ, которое необходимо для предотвращения атрезии желтого тела. Максимальная концентрация ХГЧ в течение беременности обнаруживается на 6-8-й неделе (считая от зачатия), затем постепенно снижается приблизительно до 15-й недели; с 15-й недели и до конца беременности концентрация практически не меняется, составляя в среднем 10000-30000 МЕ/л.

Нарушение транспорта яйцеклетки в результате неадекватной перистальтики маточных труб вызывает эктопическую беременность. В зависимости от локализации плодного яйца возникает первичная брюшнополостная, яичниковая или трубная беременность. Синтез ХГЧ при эктопической беременности наблюдают с первых дней после прикрепления оплодотворенной яйцеклетки. На ранних сроках развития трубной беременности (как правило, до 2 нед) динамика концентрации ХГЧ не отличается от соответствующих показателей нормы. Затем при данной патологии уровень ХГЧ в крови становится достоверно ниже соответствующих нормативных показателей для физиологической беременности. Снижение концентрации ХГЧ может выявляться при неразвивающейся маточной беременности.

Динамика содержания ХГЧ при самопроизвольном прерывании беременности и после медицинского аборта идентична. Поскольку период полувыведения ХГЧ составляет 36 ч, при полном удалении хориона концентрация его в крови будет уменьшаться каждые 3 сут примерно в 4 раза. Отсутствие остатков хориона можно проконтролировать, измерив концентрацию ХГЧ в крови через 2-3 нед после медицинского или

самопроизвольного аборта. За этот период гормон, как правило, полностью выводится из кровотока. Уровень ХГЧ ниже 10 МЕ/л расценивается как отрицательная реакция и свидетельствует об отсутствии хориона.

При многоплодной беременности концентрация ХГЧ кратна количеству развивающихся хорионов, а не эмбрионов. В случае монохориальной двуплодной беременности уровень ХГЧ в крови соответствует нормативным показателям, а при бихориальной превышает соответствующий показатель для одноплодной беременности в 2 раза.

5.6. Химия и патохимия водно-электролитного и кислотно-основного гомеостаза

5.6.1. Обмен жидкостей в организме

Организм человека – открытая система, в которой нормальное состояние достигается равновесием поступления и выведения воды и электролитов. Минимальная суточная потребность в воде около 1,5 л. Примерно 500 мл необходимо для удаления шлаков почками, 900 мл воды уходит с испарениями.

Дегидратация – недостаток воды в организме, возникает, если не восполняются потребности в ней. Кровь при этом становится более концентрированной, что приводит к повышению гематокрита, вязкости крови, общего белка и нарушениям гемодинамики. В зависимости от выраженности обезвоживания выделяют три степени дегидратации: легкую (потеря до 5 % всей жидкости организма, 1-2 л); среднюю (потеря до 5-10 % жидкости, 2-4 л); тяжелую – возникает, когда недостаточность воды достигает более 10 % водных ресурсов организма, свыше 4 л. Дефицит воды в 20 % приводит к летальному исходу.

Гипергидратация – избыток воды в организме. Если почки не могут выводить достаточного количества воды, то вода равномерно распределяется в организме, в том числе увеличивается ее содержание в клетках, что приводит к увеличению их объема. Особенно чувствительны к снижению

осмоляльности межклеточной жидкости нервные клетки, что объясняет развитие мышечных судорог центрального генеза после приема большого избыточного количества воды, ее патологической задержке в организме, то есть развитие водной интоксикации.

В том случае, если выведение почками воды недостаточно при олигурии или избыточной выработке вазопрессина, потребление воды следует увеличивать очень осторожно. Попытки врача вызвать усиленный диурез путем избыточного введения жидкости в таких случаях могут быть ошибочными, так как приведут к водной интоксикации.

Характер питания влияет на потребление воды. При углеводном и углеводно-жировом питании потребности в воде уменьшаются. При белковой диете потребление воды увеличивается. Кроме того, при белковом питании потребляется соль, поэтому потребности в воде при белковой диете увеличиваются. Эти особенности усиливаются у больных с олигурией (диурез менее 400 мл/сутки) или гипостенурией (угнетение концентрирующей способности почек).

Распределение воды в жидкостных пространствах. Понятие об осмотическом давлении. Относительное содержание воды в организме меняется с возрастом: оно составляет около 75 % массы новорожденного. Вода занимает примерно 60 % веса тела мужчины и около 55 % женщины. Различия связаны с относительным содержанием жировой ткани, которой больше у женщин. В безжировой массе тела у взрослого человека на долю воды приходится 73,2 % массы.

Примерно 66 % воды находится во *внутриклеточном пространстве* и около 34 % во *внеклеточном пространстве*. В состав внеклеточной жидкости входит плазма, интерстициальная жидкость, лимфа, спинномозговая, синовиальная жидкость, жидкость между серозными оболочками, вода плотных тканей, таких как соединительная ткань, кость, а также трансклеточная жидкость. Плазма содержит примерно 93 % воды и 7

% сухого вещества, главным образом белки и липиды. На плазму приходится примерно 8 % воды организма.

Интерстициальная жидкость образуется в основном за счет фильтрации плазмы через сосудистую стенку, которая хорошо проницаема для воды, электролитов и низкомолекулярных субстратов. 25-50 % объема белков, циркулирующих в плазме, в течение дня фильтруется в интерстиций, в то же время 80 % фибриногена находится внутри сосудистого русла. Интенсивность и направление перемещения жидкости через капиллярную стенку определяется балансом гидростатического, гидродинамического и онкотического давлений. При нарушении этого баланса, в частности при сердечной недостаточности, циррозе печени, белковом голодании, развиваются отеки. На долю межклеточной жидкости приходится около 20 % воды организма. *Трансклеточная жидкость* определяется как жидкая часть секретов, таких как слюна, панкреатический сок, желчь и др. Эти жидкости содержат до 15 % воды организма.

Факторы, влияющие на перемещение воды и электролитов между клеткой и внеклеточным пространством. Различные пространства организма отделены мембранами, через которые идет обмен веществ. Транспорт веществ может быть активным и пассивным. Активный транспорт является однонаправленным, для его осуществления требуется энергия АТФ. Активный транспорт работает против градиента концентрации. Пассивный транспорт идет в направлении трансмембранных градиентов. К пассивному транспорту относятся диффузия, осмос и фильтрация.

Диффузия – перенос вещества из более высокой концентрации в меньшую. Движущая сила – концентрационный градиент. Легко по градиенту концентрации через клеточную мембрану движутся мочевины и лактаты.

Осмос – транспорт растворителя через полупроницаемую мембрану. Такие растворенные вещества как глюкоза, аминокислоты, Na, Ca и другие не проникают через мембрану. Двигается растворитель в более

концентрированный раствор. 1 молярный раствор глюкозы обладает осмотическим давлением 22,4 атмосферы. Таким же давлением обладает 0,5 М раствор NaCl, так как он полностью диссоциирован на осмотически активные катион Na^+ и анион Cl^- . **Осмолярность** отражает осмотически активную концентрацию компонентов жидкости и выражается в осмолях/л и связана с числом растворенных частиц в растворе. **Осмоляльность** измеряется как концентрация тех же осмотически активных компонентов, но выражается в осмолях/кг растворителя, для биологических жидкостей – на 1 кг H_2O . Осмолярность определяется степенью диссоциации молекул, присутствующих в данной массе раствора. Осмолярность тканевых жидкостей может быть выражена через осмотическое давление. Если раствор отделить от растворителя полупроницаемой мембраной, то растворитель будет стремиться перейти в раствор. Гидростатическое давление, которое должно уравнять давление растворителя, и будет соответствовать осмотическому давлению, определяемому осмолярностью раствора. В случае клеточной мембраны осмотическое давление зависит от концентрации частиц, которые не проходят через мембрану.

В нормальных условиях осмолярность плазмы около 300 мосмолей/л (табл. 5.37), осмоляльность плазмы ≈ 287 мосмолей/ кг H_2O , то есть разница в абсолютных цифрах составляет около 13 мосмолей

Существенные различия («осмотический интервал») между осмолярностью и осмоляльностью возникают при попадании в кровь большого количества осмотически активных веществ (при отравлениях) или при уменьшении объема воды плазмы или при выраженной гиперлипидемии или гиперпротеинемии. Осмолярность плазмы.

Таблица 5.37

Концентрация основных осмотически активных молекул в плазме

	Нормальный диапазон (ммоль/л)	Возможные изменения при патологии (ммоль/л)
Натрий	135 - 144	100 - 170

Калий	3,5 - 5,0	1,0 - 8,0
Хлориды	97 - 108	50 - 150
Бикарбонаты	22 - 26	2 - 50
Мочевина	2,5 - 5,5	< 1 - 100
Кальций	2,2 - 2,6	0,5 - 4,0
Глюкоза	3,3 - 5,5	< 1 - 100

Осмотическое давление плазмы около 7,3 атмосферы. *Онкотическое давление* – часть осмотического давления, создаваемого белками как полиэлектролитами. Оно составляет примерно 20 мм водного столба или 0,5 % от осмотического давления крови. Градиент осмотического давления – важный фактор перемещения воды между внутри- и внеклеточным пространствами в организме.

Фильтрация – перенос раствора через мембрану под влиянием гидростатического давления. Гидростатическое и гидродинамическое давление создаются работой сердца и как противовес ему периферическим сопротивлением из-за эластического сокращения тканей, соединительно-тканного каркаса сосудов, сокращения гладкомышечных клеток сосудов.

Баланс между гидростатическим, гидродинамическим и онкотическим давлением определяет перемещение воды между плазмой и интерстицием. Перенос воды в обменных капиллярах возрастает при повышении артериального давления, увеличении объема крови из-за вливания растворов, повышения венозного давления, снижения онкотического давления, повышения проницаемости стенки капилляров из-за действия кининов, гистамина, при ожогах. Перемещение воды в ткани уменьшается при понижении артериального давления, сужении резистивных капилляров, кровопотере, обезвоживании.

Кажется, что много факторов способствует отекам, однако отеки не так часты. Это связано с тем, что интерстициальное пространство мало растягивается и препятствует накоплению в нем воды. Дренажной системой для интерстиция является лимфатическая система, жидкость способна уходить по ней. При этом из интерстиция уходят белки, падает онкотическое

давление этой жидкости, что способствует уменьшению перехода воды в ткань. Среднее содержание белка в лимфе 20 г/л. За сутки образуется примерно 2 л лимфы.

Тем не менее, при патологических состояниях может произойти быстрое перераспределение жидкости в организме. Это может случиться при перитоните, панкреатите, тромбозе воротной вены, обширных ожогах, нефротическом синдроме, кишечной непроходимости, пищевых токсикоинфекциях, травмах тканей, а также в послеоперационном периоде. В подобных ситуациях может потребоваться компенсация секвестрированной (выключенной из кровообращения) жидкости.

Роль почек в поддержании баланса воды и натрия. Скорость удаления почками осмотически активных веществ ограничена максимально возможной концентрацией их в моче, составляющей 1200-1500 мосмолей/л. В норме за сутки образуется и удаляется почками около 30 г (500 ммоль) мочевины, 12 г NaCl (205 ммоль). Осмотическая нагрузка, подлежащая экскреции почками, только мочевины (500 мосмолей), катионов Na (205 мосмолей) и анионов Cl (205 мосмолей) составляет в сумме 910 мосмолей. При максимальной концентрации мочи 1300 мосмолей для удаления этого количества нужно, чтобы суточный диурез был не менее 700 мл. Однако с мочой выделяются и другие осмотически активные вещества. Поэтому фактически суточный диурез должен быть еще больше. При малом потреблении белков осмотическая нагрузка почек может быть уменьшена до 200 мосмолей/сутки. Такая диета показана больным с олигурией. Полное голодание этим больным противопоказано, так как для покрытия энергозатрат распадаются собственные белки организма. Концентрационная способность почек ограничена. Поэтому нельзя потреблять морскую воду для питья. Осмолярность морской воды примерно 900 мосмолей/л. Для выведения солей, содержащихся в 500 мл морской воды, требуется, по меньшей мере, 800 мл мочи, то есть дополнительная «свободна вода».

Участие ренин-ангиотензин-альдостероновой системы, натрийуретического и антидиуретического гормонов в осмо- и волюморегуляции. Осмоляльность межклеточной жидкости в норме поддерживается в диапазоне 285-295 мосм/кг воды. Уменьшение воды межклеточного пространства будет сопровождаться повышением осмоляльности и перемещением воды из внутри- во внеклеточное пространство. Даже небольшое повышение осмоляльности внеклеточной жидкости вызовет раздражение осморцепторов гипоталамуса и приведет к освобождению в кровь *вазопрессина* (антидиуретического гормона). Вазопрессин способствует усилению реабсорбции в почках Na и H₂O, задержке воды в организме и концентрированию мочи. Осморцепторы имеют высокую чувствительность к изменениям осмоляльности, реагируют на изменение осмоляльности на 1 %, в результате меняется осмолярность мочи примерно на 100 мосм/л, что обеспечивает постоянство осмотического гомеостаза. Вазопрессин не обнаруживается в плазме при осмоляльности ниже 282 мосм/кг H₂O, при большей осмоляльности его концентрация начинает повышаться. Если осмоляльность внеклеточной жидкости повышается из-за присутствия таких веществ как мочевины, которая легко диффундирует через клеточную мембрану, то одновременно повышается осмоляльность внутриклеточной жидкости, при этом осморцепторы не стимулируются.

Секреция *ренина* в почках стимулируется снижением кровяного давления в привносящих к клубочкам артериях, понижением концентрации натрия в области плотного пятна и дистальных канальцев, а также в результате возбуждения симпатической системы. Ренин вызывает гидролиз ангиотензиногена до декапептида ангиотензина I, который затем под влиянием ангиотензин-превращающего фермента трансформируется в ангиотензин II. Ангиотензин II стимулирует секрецию альдостерона в коре надпочечников, сокращает гладкую мускулатуру кровеносных сосудов, вызывая повышение артериального давления.

Органом-мишенью для альдостерона являются почки. Он воздействует главным образом на дистальные каналцы, стимулируя реабсорбцию ионов натрия, воды и секрецию ионов калия и водорода.

Натрийуретический фактор (НУФ) оказывает эффекты, направленные на уменьшение нагрузки на сердце: это усиление диуреза, увеличение экскреции натрия и снижение артериального давления. НУФ вызывает вазодилатацию, подавляет секрецию ренина. Первичной тканью-мишенью для НУФ являются почки, в которых он усиливает тонус приводящих артериол, что вызывает повышение давления в клубочке и увеличивает экскрецию натрия с большим количеством первичной мочи. Усиление экскреции натрия происходит также за счет способности НУФ подавлять секрецию ренина юкстагломерулярным аппаратом почек, прямого действия на проксимальные каналцы нефрона, в которых он ингибирует Na,K-АТФазу, и непрямого ингибирования секреции альдостерона. Усиление экскреции Na и повышение диуреза сопровождается уменьшением объема жидкости в сосудистом русле и соответственно уменьшением артериального давления.

Гипо-, изо-, гиперосмотическое изменение объема внеклеточной жидкости. Дегидратация (обезвоживание) развивается при недостаточном поступлении в организм или значительной потере жидкости.

Гипертоническая дегидратация обусловлена потерей воды, превышающей потерю солей. Наблюдается у детей, больных сахарным диабетом, при обильных поносах, в экстремальных условиях, когда ограничен прием воды. Внеклеточное пространство уменьшается, развивается гиперосмия, которая компенсируется переходом воды из клетки во внеклеточное пространство. Объем циркулирующей крови уменьшается, концентрация белка в плазме, количество эритроцитов, вязкость и гематокрит увеличиваются незначительно. В крови повышаются мочевины и натрий. Развивается олигурия. Моча высокой плотности (1,030-1,040 г/мл).

Гиперкалиурия. Общий объем воды в организме снижен за счет внутриклеточной воды.

Изотоническая дегидратация обусловлена потерей эквивалентных количеств воды и солей, основным из которых является Na. При этом не меняется осмолярность внеклеточной воды, поэтому не происходит перераспределения внутри- и внеклеточной жидкости. Потеря плазмы существенно больше, чем при гипертонической дегидратации. При изотонической дегидратации быстро возникает циркуляторная недостаточность. Лабораторных тестов, позволяющих точно определить степень внеклеточной дегидратации, нет; однако измерения концентрации Na в моче и отношение мочевины крови к креатинину могут дать дополнительную диагностическую информацию. Иногда наблюдается повышение гематокрита и концентрации белка в сыворотке.

Гипотоническая дегидратация (внеклеточная) наблюдается при большей потере организмом электролитов, чем воды. Среди электролитов при этом состоянии теряется натрий. Гипотоническая дегидратация возникает при неукротимой рвоте, поносах, обильном потоотделении (до 10 л в сутки), недостаточности надпочечников, гипоальдостеронизме, черепномозговых травмах, дренажах, фистулах, назначении диуретиков, ограничении потребления соли. Концентрация солей при этом в межклеточном пространстве резко снижена. Избыток воды поступает в клетки, возникает клеточная гипергидратация, межклеточное пространство уменьшается в объеме. Больной не ощущает жажды, он отказывается от воды. Дефицит натрия свыше 0,5 г на 1 кг веса приводит к тяжелым, часто необратимым состояниям.

5.6.2. Регуляция обмена, клинические проявления и лабораторные показатели нарушений обмена электролитов и минеральных веществ

Общая концентрация катионов в плазме около 150 ммоль/л, из них на натрий приходится примерно 140 ммоль/л, на калий около 4 ммоль/л,

остальное количество составляют кальций, магний и другие катионы. Плазма электронейтральна, количество катионов в ней соответствует количеству анионов. Из анионов основное количество в норме приходится на хлор (около 112 ммоль/л) и бикарбонаты (около 25 ммоль/л). Оставшиеся анионы, составляющие так называемый анионный промежуток (АП), включают фосфаты, сульфаты, белки, органические кислоты, такие как лактат, цитрат, пируват, ацетоацетат, гидроксипутират. Поддержание ионного баланса между клетками и внеклеточным пространством является важнейшим параметром гомеостаза. Для этой цели по разным оценкам клетки используют от 10 до 20 % образующейся в них энергии.

Распределение ионов неравномерное. Распределение ионов между клеткой и внеклеточным пространством представлено в табл. 5.38.

Таблица 5.38

Распределение ионов между вне- и внутриклеточным пространством в ммольях/л воды

Ион	Плазма	Внеклеточная жидкость	Внутриклеточная жидкость	
			эритроцит	скелетная мышца
Калий	4,5	4,0	99	150
Натрий	142	145	23	10
Кальций	2,5	2,1	0,025	0,01
Магний	1,0	1,1	0,8	13
Хлориды	103	116	54	15

Лабораторные методы и диагностическое значение определения калия. В клинико-диагностических лабораториях основными методами определения К являются потенциометрический с помощью ион-селективных электродов и турбидиметрический – на биохимическом анализаторе. Так как практически все соли калия диссоциированы в плазме крови, то при определении калия не вводится различий между активностью и концентрацией. С помощью ионселективных электродов калий можно измерять в цельной крови, сыворотке и любой биологической жидкости. Турбидиметрический метод предназначен для измерения в сыворотке.

Ион К является в организме основным потенциалобразующим катионом. От его распределения между клетками и внеклеточной средой зависят электрофизиологические свойства. Как при увеличении, так и снижении K^+ меняются проводимость, возбудимость, автоматия и передача нервных импульсов. Если уровень K^+ повышается примерно до 8 ммоль/л, то это приводит к остановке сердца в диастоле. Если же уровень K^+ слишком низкий, то сердце останавливается в систоле.

Внеклеточное содержание К первично контролируется почками и в меньшей степени желудочно-кишечным трактом. В почках К фильтруется и затем практически полностью реабсорбируется в проксимальных канальцах. В дистальных канальцах имеет место незначительная активная секреция К. Однако она первично связана с активной АТФ-зависимой реабсорбцией Na, в обмен на который из тубулярных клеток в просвет поступают ионы H^+ и K^+ . Так как оба иона H^+ и K^+ могут обеспечивать электронейтральность реабсорбции Na^+ , то между экскрецией H^+ и K^+ существует тесная связь. При ацидозе имеет место тенденция к секреции ионов H^+ с мочой и соответственно к снижению выделения K^+ . Наоборот, при алкалозе будут задерживаться в организме ионы H^+ и усиленно экскретироваться ионы K^+ . Таким образом, при ацидозе имеется тенденция к гиперкалиемии, при алкалозе к гипокалиемии. При почечном тубулярном ацидозе эта тенденция исчезает.

Имеется относительное постоянство выведения K^+ . Даже при бедной K^+ диете выделение его с мочой не менее 10-20 ммоль/сутки. Потеря K^+ через кожу и желудочно-кишечный тракт составляет примерно 15-20 ммоль/сутки. Почки не могут предупредить истощение K^+ в организме, если потребление K^+ становится меньше 40 ммоль/сутки (1.5 г/день). При жесткой диете с большим потреблением воды и приемом мочегонных препаратов может возникнуть гипокалиемия.

Контроль за уровнем калия важен при острой и хронической почечной недостаточности, сердечной недостаточности, ацидозе и алкалозе, при

проведении гемодиализа, приёме диуретиков, сердечных гликозидов. При нарушениях сердечного ритма необходимо исключить патологические изменения калия как причины аритмии.

Референтные значения концентрация калия в сыворотке крови – 3,5-5,5 ммоль/л.

Увеличение концентрации (гиперкалиемия) может возникнуть при:

- избыточном поступлении в организм при быстром вливании растворов калия;

- выходе калия из клеток во внеклеточную жидкость при массивном гемолизе, рабдомиолизе, распаде опухолей, тяжёлых повреждениях тканей, глубоких ожогах, ацидозе;

- сниженном выделении калия почками при острой почечной недостаточности с олиго- и анурией, ацидозом, болезни Аддисона, гипопункция ренин-ангиотензин-альдостероновой системы, шоковых состояниях.

Уменьшение концентрации (гипокалиемия):

- недостаточное поступление калия в организм при хроническом голодании;

- потеря калия с мочой при почечном канальцевом ацидозе, почечной недостаточности, альдостеронизме, синдроме Кушинга, алкалозе;

- потеря калия организмом с кишечными секретами при частой рвоте, профузном поносе, кишечных свищах;

- усиленное поступление калия внутрь клеток при лечении глюкозой и инсулином, алкалозе;

- потеря с потом при муковисцидозе.

Лабораторные методы и диагностическое значение определения натрия. Лабораторные методы определения натрия схожи с методами определения калия. Это отенциометрический метод с использованием ион-

селективных электродов и колориметрические методы определения с использованием реактивов для биохимического анализатора.

На долю Na приходится примерно 90 % всех внеклеточных катионов, это катион внеклеточного пространства, к нему малочувствительны клетки. Это чрезвычайно гидрофильный ион. Перемещение воды в организме контролируется движением Na. Из-за большой гидратной оболочки движение Na через липидный барьер клеточной мембраны затруднено. Первостепенную роль играет Na в поддержании осмотического давления. Гипо- и гипернатриемии приводят к изменениям осмотичности среды. Натрий имеет определяющее значение в поддержании нормального значения pH плазмы. Он опосредованно через Cl влияет на бикарбонатный буфер. Na защищает клетки почечных канальцев от повреждения анионами сильных кислот. При накоплении этих анионов в больших количествах они экскретируются с мочой в виде Na-солей, а не как кислоты, что предупреждает чрезмерное закисление мочи.

Баланс Na постоянно регулируется почечной экскрецией. При повышенном потреблении пропорционально повышается его выделение почками. Скорость гломерулярной фильтрации (СГФ) может быть ограничивающим фактором экскреция Na почками (терминальная стадия хронической почечной недостаточности). Обычно примерно 70% фильтрованного Na активно реабсорбируется в проксимальных канальцах, остальная часть в петле Генле. Менее 5% фильтрованного Na достигает дистальных канальцев. Альдостерон, минералокортикоид, освобождающийся из коры надпочечников в ответ на активацию ренин-ангиотензиновой системы, стимулирует реабсорбцию Na в дистальных канальцах и собирательных трубочках. Этот гормон является главным фактором, контролирующим экскрецию Na с мочой. Он активирует реабсорбцию Na в почечных канальцах и экскрецию K путем активации Na,K-АТФазы. Пассивно за натрием перемещается вода, сопряжено с Na в почках реабсорбируется глюкоза, аминокислоты и другие метаболиты.

Референтные значения концентрация Na в сыворотке крови – 135 до 146 ммоль/л.

Гипонатриемия обнаруживается достаточно часто. Умеренная гипонатриемия является проявлением «синдрома солевого истощения». Это вторичный феномен, поэтому в первую очередь необходимо лечить основное заболевание. Клинические проявления гипонатриемии обычно отсутствуют до тех пор, пока концентрация Na в плазме не упадет ниже 120 ммоль/л, но они могут возникнуть и при более высокой концентрации, если ее снижение происходит очень быстро. Тяжелая гипонатриемия иногда требует срочной коррекции, но обычно это состояние сочетается с клиническим проявлением водной интоксикации. Гипонатриемия возникает в результате:

- недостаточного поступления Na в организм;
- потере Na при рвоте, диарее, сильной потливости и неадекватном солевом замещении;
- недостаточности надпочечников;
- острой почечной недостаточности (полиурическая стадия);
- отёков и асцита при хронической сердечной недостаточности, циррозе печени, печёночной недостаточности, нефротическом синдроме;
- гипотиреозе;
- синдроме неадекватной секреции антидиуретического гормона (вазопрессина).

Гипернатриемия развивается при:

- гипертонической дегидратации из-за усиленного потоотделения (лихорадка и др.), гипервентиляции, рвоты, диареи;
- недостаточного поступления воды в организм;
- снижения выведения с мочой: первичный и вторичный гиперальдостеронизм, синдром Кушинга.

Лабораторные методы и диагностическое значение определения кальция. В лабораторной практике определяют фотометрическим методом

общий кальций, потенциометрическим методом с использованием ион-селективных электродов – ионизированный кальций.

Са имеет несколько чрезвычайно важных функций в организме (табл. 5.39).

Таблица 5.39

Функции Са в организме

Структурная	кости, зубы
Нейромышечная	контроль возбудимости освобождение медиаторов контроль сокращения и расслабления мышц
Ферментная	ко-фактор компонентов свертывания
Сигнальная	внутриклеточный вторичный мессенджер

В плазме кальций присутствует в нескольких формах: связанным с белком, главным образом альбумином, в комплексе с бикарбонатом, лактатом, фосфатом, цитратом и в свободном виде ионизированного кальция. Общий Са – это сумма связанного с белками, комплексированного и ионизированного кальция. Определение общего Са представляет клиническую ценность, свидетельствуя об уровне притока Са в кровь. Чаще всего направленность отклонений общего Са совпадает с изменениями ионизированного Са²⁺, поскольку регуляция гомеостаза Са осуществляется главным образом путем изменений уровня притока Са в кровь. Однако, так как значительная часть Са связана с компонентами, которые могут меняться в плазме (альбумин, бикарбонаты, лактат, лиганды), то во многих случаях общий Са может неадекватно отражать состояние пациента (рис. 5.8). Это особенно существенно при гиперпаратиреозе, уремии, при изменении кислотно-основного равновесия, в ситуациях клинического использования цитрата, что часто возникает в клинике неотложных состояний, в неонатологии, при операциях коронарного шунтирования, в клинической токсикологии, при пересадке органов и тканей.

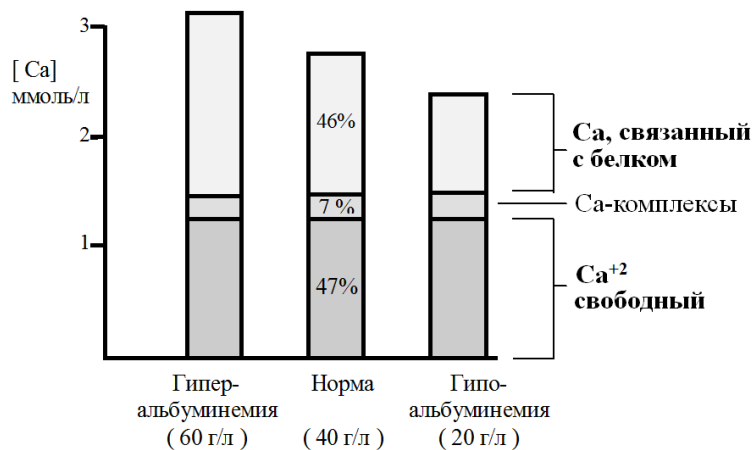


Рис. 5.8. Влияние альбумина на фракции кальция в крови

Ионизированный Ca (Ca^{+2}) физиологически активен, поэтому концентрация Ca^{+2} поддерживается на определенном уровне и регулируется рядом физиологических механизмов. Основными регуляторами обмена кальция являются гиперкальциемические гормоны – кальцитриол (активная форма витамина D) и паратиреоидный гормон (повышают уровень кальция плазмы крови, усиливая его всасывание в тонкой кишке, реабсорбцию в почках, резорбцию костной ткани), а также гипокальциемический гормон – кальцитонин (снижает уровень кальция плазмы крови, в основном через усиление минерализации костной ткани). У здоровых людей содержание Ca^{+2} находится в диапазоне 0,98-1,13 ммоль/л. Существует состояние равновесия между Ca^{+2} , находящимся во внеклеточном пространстве, и Ca^{+2} в цитоплазме. Градиент значений Ca^{+2} между внеклеточным пространством (10^{-3} М) и внутриклеточным (10^{-7} М) достигает 10000 (разница в четыре порядка). Ионизированный Ca^{+2} по сравнению с общим Ca лучше отражает метаболизм Ca. Определение ионизированного Ca^{2+} наиболее полезно при оценке быстрых изменений его концентрации, которые наблюдаются, в частности, при переливании крови и кровозаменителей, при экстракорпоральном кровообращении, при диализе.

Увеличение концентрации (гиперкальциемия) связано, чаще всего, с усилением мобилизации кальция из костной ткани:

- гипервитаминоз D;

- первичный гиперпаратиреоз (аденома или карцинома паращитовидных желёз);
- эктопический синтез паратгормона при раке лёгких, почек, яичников, мочевого пузыря, пищевода, опухолях головы и шеи;
- вторичный гиперпаратиреоз при хронической почечной недостаточности, при гиповитаминозе D (уровень общего, также как и ионизированного кальция, периодически может быть в референтных пределах или снижен в сочетании с изменением уровня фосфатов и повышенной активностью щелочной фосфатазы);
- остеолитический при злокачественных опухолях костной ткани, метастазах в костную ткань (чаще всего рака молочной железы, лёгких, почек).

Уменьшение концентрации (гипокальциемия):

- недостаточное всасывание кальция из кишечника и/или снижение его реабсорбции в почках;
- гиповитаминоз D при рахите у детей и остеомаляции у взрослых (в результате сниженной инсоляции, мальабсорбции и нарушений питания);
- гипопаратиреоз (послеоперационный, аутоиммунный);
- гипоальбуминемия (снижается общий кальций, тогда как ионизированный кальций может находиться в референтных пределах);
- снижение ионизированного кальция в результате изменений связывания кальция с белками и органическими анионами плазмы крови;
- алкалоз (повышение pH на 0,1 единицы вызывает снижение концентрации ионизированного кальция на 0,05 ммоль/л).

Лабораторные методы и диагностическое значение определения магния. Mg преимущественно внутриклеточный катион. Mg является Ко-фактором около 300 ферментов, включая ферменты синтеза белков, гликолиза, трансмембранного переноса ионов. Комплекс Mg-АТФ является субстратом для многих АТФ-зависимых ферментов. Mg необходим для поддержания структуры рибосом, нуклеиновых кислот, некоторых белков.

Он взаимодействует с Ca через несколько механизмов, влияет на проводимость мембран возбудимых клеток и их электрические свойства, поэтому недостаток Mg вызывает гипервозбудимость. Ионизированный Mg является ко-фактором для АТФ-зависимых ионных насосов в мембранах нервных, мышечных и других клетках. Комплекс Mg-АТФ необходим для функционирования Ca-насоса, определяющего уровень импульсации клеток, обладающих свойством автоматии. Поэтому нарушения ритма сердца возникают при нарушениях в сыворотке уровня Ca^{+2} , K^{+} и Mg^{+2} .

Референтные пределы: 0,70–1,05 ммоль/л сыворотки крови

Гипермагниемия:

- почечная недостаточность;
- болезнь Аддисона;
- гипотермия.

Гипомагниемия:

- хронический алкоголизм (из-за сниженного содержания магния в рационе, нарушения его абсорбции в кишечнике и повышенной экскреции почками);
- мальабсорбция при раке, колите, сниженной функции поджелудочной железы, резекции желудка, кишечника;
- диабетический кетоацидоз или некомпенсированный сахарный диабет (перемещение магния из клеток и усиление экскреции почками вследствие глюкозурии).

Диагностическое значение определения фосфора. Фосфатные анионы относятся к числу основных анионов организма. В мягких тканях фосфаты содержатся преимущественно внутри клеток, где выполняют роль структурного компонента органических соединений (нуклеиновых кислот, фосфолипидов, коферментов и др.), участвуют в энергетическом обмене (креатинфосфат, АТФ). Эта фракция получила название кислоторастворимый фосфор. Фосфолипиды (липидный фосфор) – основной компонент всех

клеточных мембран. Отражением разных пулов фосфора в организме являются фракции фосфора в крови. В плазме $\Phi_{\text{неорг.}}$ содержится в виде анионов HPO_4^{-2} и H_2PO_4^- . Около 95% – это свободные анионы, оставшаяся часть связана с белком. Фосфор и кальций образуют плохо растворимые соединения, поэтому их общая концентрация не превышает определенного уровня и повышение одного из них, как правило, сопровождается снижением другого. Обмен фосфатов и тесно связанный с ним обмен кальция регулируют биологически активная форма витамина D – кальцитриол (гиперфосфатемический эффект), паратгормон (эффект зависит от уровня кальцитриола), кальцитонин (гипофосфатемический эффект). Гипофосфатемия ниже 0,3 ммоль/л может сопровождаться нарушением энергетического обмена в клетках, проявляющегося рабдомиолизом, неврологической симптоматикой. Клинические симптомы, ассоциированные с гиперфосфатемией, обусловлены, как правило, одновременно развивающейся гипокальциемией.

Референтные пределы: 0,87-1,45 ммоль/л.

Увеличение концентрации:

- гипопаратиреоз, псевдогипопаратиреоз;
- острая и хроническая почечная недостаточность;
- остеолит при злокачественных опухолях (особенно при метастазировании), лейкозах.

Уменьшение концентрации:

- дефицит витамина D (остеомалация, рахит, семейный гипофосфатемический рахит, при синдроме мальабсорбции);
- первичный гиперпаратиреоз;
- выраженная гиперкальциемия различной этиологии;
- эктопический синтез паратгормона злокачественными опухолями.

Диагностическое значение определения хлора. Хлор – основной анион, компенсирующий влияние катионов, в первую очередь натрия, во

внечелочной жидкости. В физиологических условиях изменения концентрации хлора в крови вторичны к изменениям других электролитов и направлены на создание электронейтральности среды. При потере хлорида развивается алкалоз, при избытке – ацидоз. Изолированное изменение концентрации хлорида наблюдается при нарушениях кислотно-щелочного баланса. Определение хлоридов в крови используется чаще всего при оценке кислотно-щелочного баланса. Хлор – основной анион секретов желудка. Референтные пределы: 98-107 ммоль/л.

Гиперхлоремия:

- обезвоживание;
- почечный канальцевый ацидоз;
- метаболический ацидоз при длительной диарее с потерей бикарбонатов;
- интоксикация салицилатами;

Гипохлоремия:

- усиленное потоотделение, в том числе при секреторных дисфункциях и гормональном дисбалансе;
- длительная, повторная рвота в связи дуоденальной язвой, высокой кишечной непроходимостью, стенозом привратника;
- метаболический гипокалиемический ацидоз.

Исследование хлора в поте считается достоверным тестом в диагностике муковисцидоза. Тест дает положительные результаты на 3-5 неделе жизни пораженных детей. Результаты теста могут быть в пределах нормы у больных с истощением запасов солей, например в жаркую погоду. Дополнительные исследования электролитов предупреждают неправильное толкование. Кожные поражения и сыпь могут приводить к завышению результатов.

Содержание хлора в поте: норма 5-35 ммоль/л, пограничные значения 30-70 ммоль/л, муковисцидоз 60-200 ммоль/л

Диагностическое значение определения меди. Медь участвует во многих ферментативных процессах в качестве активатора или как составная часть активного центра ферментов. Из медь-содержащих гидролаз широко распространена тирозиназа, участвующая в образовании кожного пигмента меланина. Недостаток этого фермента или его блокада в меланоцитах приводят к альбинизму. Свободные ионы меди, также как ионы других металлов с переменной валентностью, могут инициировать перекисное повреждение белков и липидов. Поэтому медь в сыворотке присутствует исключительно в форме, связанной с церулоплазмином (95%) и альбумином (5%). Церулоплазмин проявляет антиоксидантную активность – функционируя как ферроксидаза в плазме крови, он восстанавливает свободные ферри-ионы в ферро-ионы, связывающиеся белком трансферрином. Дефицит Cu наблюдается у детей (особенно у недоношенных), получающих продукты с дефицитом Cu, у больных на парентеральном питании с недостатком микроэлементов. Проявления дефицита Cu включают нейтропению, анемию, остеопороз, костно-суставные нарушения, снижение пигментации кожи. Симптомы отравления медью: тошнота, рвота, головные боли, понос, боли в животе, в тяжелых случаях могут развиваться поражение печени, желтуха и гемолитический шок. Отравление медью может быть при введении медь-содержащих растворов, медь-содержащих внутриматочных спиралей. Болезнь Вильсона-Коновалова – генетически обусловленное нарушение метаболизма Cu, характерным является прогрессирующее поражение нервной системы и печени, обусловленные токсическими эффектами меди, откладывающейся в этих органах. В то же время в сыворотке содержание меди и церулоплазмينا снижено, увеличена экскреция меди с мочой.

Референтные значения: мужчины 11,0-22,0, женщины 13,3-4,3 мкмоль/л.

Увеличение концентрации:

- чаще всего обусловлено поступлением меди в кровь из разрушенных клеток;

- инфекции, острое и хроническое воспаление;
- лейкоз, лимфогранулематоз;
- введение медь-содержащих растворов.

Уменьшение концентрации:

- болезнь Вильсона–Коновалова;
- синдром Менкеса (болезнь «курчавых волос»);
- диффузные поражения тонкой кишки в связи с нарушением всасывания меди (целиакия, спру).

5.6.3. Кисотно-основное состояние

Кислотность или щелочность раствора зависит от концентрации в нем свободных ионов водорода (H^+). Показателем этой концентрации служит рН. При увеличении оснований без повышения кислот, значение рН увеличивается, если повышается кислота, то рН снижается. рН артериальной крови в норме поддерживается в ограниченном диапазоне между 7,35 и 7,45 единиц. Значения рН ниже 7,35 свидетельствуют об ацидозе, значения рН выше 7,45 указывают на развитие алкалоза.

Образование кислот и оснований в процессе обмена веществ и выделение их из организма. В процессе клеточного метаболизма непрерывно образуются кислоты. Избыток ионов H^+ постоянно выводится из организма для поддержания устойчивого состояния. Клетки являются постоянным источником углекислого газа и нелетучих кислот. Как нелетучие кислоты, так и CO_2 в плазме способствуют повышению концентрации ионов H^+ . В покое человек выделяет 230 мл CO_2 в 1 мин или около 15000 ммоль/день. Это потенциально сопровождается исчезновением из крови 15000 ммоль H^+ (летучие кислоты). В организме примерно 1 ммоль/кг/день H^+ образуется в виде нелетучих кислот, таких как H_2SO_4 и H_3PO_4 . Кислотность крови, выражением которой является рН, зависит от соотношения ряда факторов:

величины легочной вентиляции, функции почек, уровня оксигенации, интенсивности метаболических реакций, состояния гемодинамики и др. рН отражает взаимодействие этих факторов. В то же время определение только рН не позволяет установить возможные причины нарушения кислотно-основного состояния (КОС).

Механизмы регуляции рН крови. Непосредственно за поддержание постоянства рН крови отвечают буферные системы, из которых наиболее важной является бикарбонатный буфер. Буферная емкость этого буфера, а значит и физиологическая способность противостоять изменениям концентрации иона H^+ , составляет более половины всей буферной емкости крови. Составные части этого буфера – угольная кислота (H_2CO_3) и ионы бикарбоната (HCO_3^-). Угольная кислота – нестойкое соединение, разлагается с образованием воды и двуокиси углерода, последний через дыхательную систему удаляется в атмосферу. Учитывая эту особенность, бикарбонатную буферную систему называют летучим буфером

Действие бикарбонатного буфера дополняется в организме действием нелетучих буферных систем, наиболее важным из которых является гемоглобиновый буфер, составляющий около одной трети всей буферной емкости крови. Кроме того, в организме суфествуют еще фосфатный и белковый буфер. При оценке способности крови противостоять изменению рН нужно принимать во внимание участие всех буферных систем крови. Показателем, характеризующим это свойство, является концентрация буферных оснований крови (ВВ, по международной номенклатуре Buffer Bases) состоящая из бикарбонатного и небикарбонатного буферных компонентов.

Концентрацию буферных оснований легче интерпретировать с помощью показателя избытка или недостатка буферных оснований (ВЕ, по международной номенклатуре Buffer Excess), который определяется разницей между актуальной и должной концентрацией буферных оснований. В норме по определению ВЕ равен нулю. Учитывая биологическую

вариабильность, принято считать референтными значениями ВЕ: взрослые $0 \pm 2,5$ ммоль/л, дети 0 ± 3 ммоль/л.

При патологическом увеличении содержания буферных оснований ВЕ становится положительным, а при снижении – отрицательным. В последнем случае лучше использовать термин «дефицит оснований». Этот параметр имеет значительное клиническое и диагностическое значение. Он позволяет:

- оценить степень метаболической компенсации дыхательных нарушений КОС;
- оценить степень недыхательных нарушений КОС.

Легочная система регуляции КОС. Летучие кислоты экскретируются из организма только через легкие. Если в результате обменных нарушений кислотность крови увеличивается, то повышение содержания H^+ приводит к возрастанию легочной вентиляции (гипервентиляции); при этом молекулы CO_2 выводятся в большем количестве и рН возвращается к нормальному уровню. Напротив, увеличение содержания оснований сопровождается гиповентиляцией; в результате напряжение CO_2 и концентрация ионов H^+ возрастает; сдвиг реакции крови в щелочную сторону частично или полностью компенсируется.

Дыхательные нарушения КОС часто связаны с заболеваниями легких. Первичная функция дыхательной системы – поддерживать оптимальный уровень напряжения кислорода (pO_2) и углекислого газа (pCO_2) в артериальной крови. При альвеолярной гиповентиляции повышается альвеолярное и артериальное pCO_2 и падает альвеолярное и артериальное pO_2 . Оценку альвеолярной вентиляции проводят путем измерения артериального pCO_2 . Параметрами, характеризующими функцию дыхательной системы, являются не только pO_2 и pCO_2 , но и насыщение гемоглобина кислородом (SO_2), общее содержание кислорода в крови (TO_2), фракция оксигемоглобина в общем гемоглобине (O_2Hb).

Почечная система регуляции КОС и электролитов. Нелетучие кислоты экскретируются только почками. Поставка в кровоток

дополнительных количеств ионов HCO_3^- , уравнивающих образование ионов H^+ в организме, относится к основным функциям почек. Как правило, компенсаторные механизмы КОС связаны с включением противоположных механизмов. В случае метаболического ацидоза компенсация происходит через дыхательный алкалоз. При дыхательном ацидозе – через метаболический алкалоз.

Почки поддерживают КОС двумя механизмами: 1) реабсорбция отфильтрованного в клубочках HCO_3^- и 2) выведения H^+ с мочой. Реабсорбция HCO_3^- происходит главным образом в проксимальных канальцах нефрона. Существует взаимосвязь между количеством реабсорбированного бикарбоната и ионами хлора. Так рост реабсорбции HCO_3^- при дыхательном ацидозе или метаболическом алкалозе сопровождается снижением реабсорбции Cl^- и ведет к гипохлоремии. Поэтому определение концентрации Cl^- в плазме и HCO_3^- в моче может предоставить дополнительную информацию о типе нарушения КОС. В дистальных отделах нефрона происходит образование дополнительных количеств HCO_3^- . Этот процесс возможен благодаря активной секреции и выведению ионов H^+ с мочой. В просвете канальца акцептором H^+ является аммиак и фосфаты. Минимальное значение рН мочи может быть 4,6, что эквивалентно концентрации ионов H^+ 25 мкмоль/л. Так как за сутки обычно выделяется примерно 1,5 л мочи, следовательно, в свободном виде выделяется только примерно тысячная часть общего экскретируемого количества ионов H^+ . Основным буфером мочи является фосфатный буфер. Так в гломерулярном фильтрате 80 % фосфатов присутствует в форме двувалентного аниона (HPO_4^{2-}). При взаимодействии с секретируемым ионом H^+ он превращается в одновалентный фосфат H_2PO_4^- . При минимальном рН мочи практически все фосфаты находятся в форме H_2PO_4^- . За сутки примерно 30 - 40 ммоль ионов H^+ нормально экскретируется этим путем.

Желудочно-кишечная система и ее роль в поддержании постоянства КОС. В регуляции рН крови и тканей роль желудка

заключается в торможении секреции соляной кислоты при защелачивании и усилении этого процесса при закислении. Этим желудок сохраняет для внутренней среды организма щелочные или кислые элементы в зависимости от сдвига КОС. Печень также активно участвует в регуляции КОС. В ней осуществляется нейтрализация молочной кислоты, кетокислот кислот в основном путем их дезаминирования. При поступлении в организм избытка кислот в печени усиливается их нейтрализация и одновременно тормозится мочевинообразование. В результате этого неиспользованный аммиак нейтрализует кислоты и увеличивается выведение аммонийных солей с мочой. При защелачивании, наоборот, мочевинообразование увеличивается, аммиогенез ослабевает. Поджелудочная железа активно участвует в регуляции рН крови. Она секретирует большое количество ионов гидрокарбоната, что является ее уникальной и исключительно важной физиологической функцией. Образование ионов гидрокарбоната тормозится при избытке кислот в межклеточной жидкости и усиливается при их недостатке.

Референтные показатели КОС, изменения КОС при патологических состояниях. Показатели крови при нормальном газообмене в покое при дыхании воздухом представлены в табл. 5.40.

Таблица 5.40

Показатели крови при нормальной функции легких

Показатель	Артериальная кровь	Венозная кровь
$[H^+]$	36-43 нмоль/л	35-45 нмоль/л
рН	7,35-7,45	7,35-7,45
pCO_2	38-42 мм Hg	36-50 мм Hg
pO_2	85-95 мм Hg	30-50 мм Hg

Отклонение pH_a за диапазон между 7,35 и 7,45 единиц рассматривается как нарушение кислотно-основного состояния (КОС). Значения рН ниже 7,35 свидетельствуют об «ацидемии» (выражение для крови) или «ацидозе» (выражение для ткани). Значения рН выше 7,45 указывают на развитие

«алкалемии» (выражение для крови) или «алкалозе» (выражение для ткани). Диапазон возможных изменений pH_a представлен на рис. 5.9.

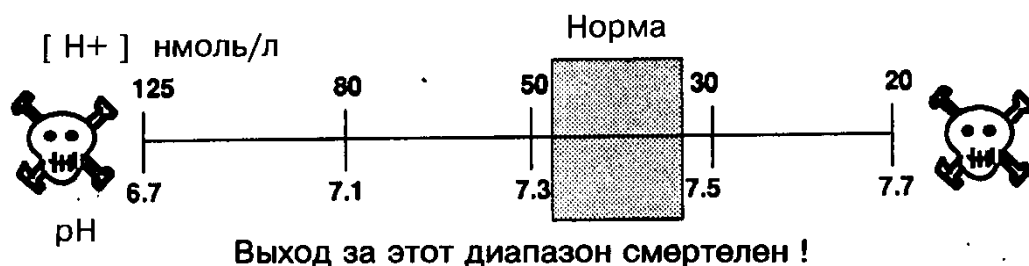


Рис. 5.9. Диапазон изменения концентрации ионов водорода и pH артериальной крови у человека

CO_2 образуется в процессе клеточного метаболизма и освобождается в кровь, в которой транспортируется до легких, где экскретируется из организма. Парциальное давление углекислого газа в пробах крови – pCO_2 отражает только одну из нескольких форм, в которых CO_2 присутствует в крови. CO_2 находится также в составе угольной кислоты (H_2CO_3), иона бикарбоната (HCO_3^-), в комбинации с разными белками плазмы и в связанном виде с гемоглобином (карбогемоглобин). При нормальной вентиляции pCO_2 артериальной крови находится в диапазоне 38-42 мм Hg (5,06-5,60 кПа). Некоторые авторы за нормальный диапазон принимают p_aCO_2 35-45 мм Hg. Патологическими являются отклонения за пределы < 30 и > 50 мм Hg (< 4 и $> 6,7$ кПа). Изменение pCO_2 первично отражает состояние дыхания, так как легкие контролируют уровень pCO_2 , изменяя частоту и глубину дыхания.

Показатели КОС на анализаторах. Современные анализаторы позволяют одновременно определять показатели газов крови, кислотно-основного состояния, электролитов и метаболитов. На основании измеряемых показателей проводится расчет параметров, отражающих метаболические и компенсаторные сдвиги. При анализе показателей КОС измеряемыми являются парциальное давление углекислого газа pCO_2 и pH . Расчетные показатели КОС:

НСО _{act}	– ион бикарбоната актуальный (истинный , реальный)
НСО _{std}	– ион бикарбоната стандартный
BE	– избыток буферных оснований внеклеточной жидкости
BB	– концентрация буферных оснований крови
ctCO ₂	– содержание двуокиси углерода в плазме крови

Клинико-диагностическое значение определяемых показателей

КОС. Первичное развитие метаболического ацидоза происходит при увеличении образования или снижении экскреции ионов H^+ или их комбинации. Непрямым механизмом нереспираторного ацидоза может быть потеря $НСО_3^-$ из организма. Наиболее общие причины метаболического ацидоза представлены в таблице табл. 5.41.

Таблица 5.41

Причины метаболического ацидоза

<p><i>Увеличение образования ионов H^+:</i> кетацидоз (диабетический , алкогольный); лактоацидоз при гипоксии; интоксикация этанолом, метанолом, этиленгликолем, салицилатами</p> <p><i>Снижение экскреции H^+:</i> кетацидоз (диабетический , алкогольный); лактоацидоз при гипоксии; интоксикация этанолом, метанолом, этиленгликолем, салицилатами</p> <p><i>Потеря $НСО_3^-$:</i> профузный понос кишечная фистула</p>

Практически единой причиной дыхательного ацидоза и роста pCO_2 является нарушение альвеолярной вентиляции. В результате увеличения pCO_2 растет образование H_2CO_3 с последующей диссоциацией на H^+ и $НСО_3^-$. К снижению альвеолярной вентиляции могут приводить множество причин, основные из которых представлены в табл. 5.42.

Во всех случаях при дыхательном ацидозе повышается pCO_2 . В организме практически на каждый образующийся ион H^+ формируется анион $НСО_3^-$. Ионы H^+ связываются внутриклеточными буферными системами, в частности, гемоглобиновым буфером. При остром повышении pCO_2 на

каждый 1 кПа (7,5 мм Hg) происходит увеличение концентрации HCO_3^- примерно на 1 ммоль/л и увеличение $[\text{H}^+]$ на 5,5 нмоль/л. При хроническом повышении $p\text{CO}_2$, когда максимальна почечная компенсация, $[\text{H}^+]$ повышается только примерно на 2,5 нмоль/л на каждые 1 кПа повышения $p\text{CO}_2$, при этом $[\text{HCO}_3^-]$ увеличивается на 3,5 ммоль/л. Дыхательный ацидоз может быть скорректирован восстановлением $p\text{CO}_2$ до нормы. Если же увеличенный уровень $p\text{CO}_2$ сохраняется, то компенсация осуществляется путем повышенной экскреции ионов H^+ с мочой.

Таблица 5.42

Причины, приводящие к нарушению альвеолярной вентиляции и дыхательному ацидозу

Обструкция дыхательных путей:

- хронические обструктивные заболевания (бронхиты, эмфизема, опухоли бронхов, гортани);
- бронхоспазм при бронхиальной астме;
- аспирация.

Снижение возбудимости дыхательного центра:

- передозировка анальгетических, седативных, анестезирующих средств, наркоза;
- инсульт, травма, опухоль мозга;
- заболевания, протекающие с повышением внутричерепного давления;
- длительная гипоксия.

Заболевания легких:

- тяжелые пневмонии;
- фиброз легких;
- дыхательный дистресс синдром;
- гидроторакс, пневмоторакс.

Внелегочные причины:

- полиомиелит, заболевания нервов дыхательной мускулатуры;
- заболевания дыхательной мускулатуры, трихинелез, тяжелый скалиоз.

Лабораторные показатели при ацидозах и алкалозах. Нарушения КОС классифицируются на дыхательные и метаболические (недыхательные) в соответствии с первичной причиной изменения $p\text{CO}_2$. В табл. 5.43 представлены изменения pH, $[\text{HCO}_3^-]$ и $p\text{CO}_2$ при разных типах нарушения КОС.

Соотношения между pH , HCO_3^- и pCO_2 при нарушениях КОС. Индекс «1» указывает на первичный, индекс «2» на вторичный характер изменения параметра

Нарушение	pH	HCO_3^-	pCO_2
Метаболический ацидоз	↓	↓ (1)	↓ (2)
Дыхательный ацидоз	↓	↑ (2)	↑ (1)
Метаболический алкалоз	↑	↑ (1)	↑ (2)
Дыхательный алкалоз	↑	↓ (2)	↓ (1)

Специфическое нарушение одного из параметров КОС вызывает компенсаторную реакцию, которая противодействует первичному нарушению. Значительная утрата HCO_3^- вызывает увеличение удаления CO_2 с выдыхаемым воздухом. Наоборот, повышение pCO_2 в крови вызывает увеличение концентрации HCO_3^- , что направлено на поддержание pH крови в нормальных границах. Компенсация может быть частичной или полной. О полной компенсации можно говорить в тех случаях, когда pH возвращается в пределы нормального референтного интервала. Частичная компенсация – это те случаи, когда pH остается за пределами референтного диапазона. Дыхательная компенсация, регулирующая pCO_2 , как правило быстрая, происходит в течение нескольких минут. Почечная компенсация, регулирующая $[HCO_3^-]$, медленная, продолжается в течение 2-3 дней. Поэтому нарушения КОС могут иметь место и при нормальном pH крови, что является показателем развития компенсаторных процессов.

Лабораторные показатели при метаболических и респираторных нарушениях КОС. Избыток H^+ связывается бикарбонатным буфером (уравнение 4) и другими буферными системами крови. Образующаяся угольная кислота диссоциирует до CO_2 и H_2O (уравнение 5) и CO_2 удаляется через легкие. Этот процесс сопровождается компенсаторной гипервентиляцией, которая уменьшает p_aCO_2 . При этом увеличивается отношение $[HCO_3^-]/p_aCO_2$ и это повышает $pH_{\text{крови}}$ (уравнение 11).

Гипервентиляция является прямым результатом стимуляции $[H^+]$ дыхательного центра. Однако дыхательная компенсация не может полностью нормализовать $[H^+]$, так как именно высокий уровень $[H^+]$ стимулирует дыхательный центр. Кроме того, усиленная работа дыхательной мускулатуры сама по себе генерирует дополнительное образование CO_2 .

Если причина метаболического ацидоза продолжает существовать, то может возникнуть новое устойчивое состояние с повышенной $[H^+]$ и низким уровнем HCO_3^- и pCO_2 . В устойчивом состоянии снижение pCO_2 за счет компенсаторной гипервентиляции на 0,17 кПа (1,3 мм Hg) сопровождается уменьшением HCO_3^- примерно на 1 ммоль/л. У здоровых людей гипервентиляция вызывает дыхательный алкалоз. Как правило компенсаторные механизмы КОС связаны с включением противоположных механизмов.

В случае метаболического ацидоза компенсация происходит через дыхательный алкалоз. При дыхательном ацидозе – через метаболический алкалоз.

Если функция почек нормальная, то при метаболическом ацидозе избыток ионов водорода может экскретироваться с мочой. Однако во многих случаях именно нарушение функции почек является причиной метаболического ацидоза. Полная коррекция метаболического ацидоза возможна только после устранения причины, вызывающего его. Так при диабетическом кетоацидозе это регидратация и введение инсулина или удаление салицилатов при отравлении ими. Важно поддерживать адекватную перфузию почек, чтобы добиться максимального выведения ионов H^+ с мочой.

Индикатором способности клеток утилизировать ионы H^+ является изменение калия в плазме. Это происходит в результате того, что поступление H^+ в клетку связано с перемещением K^+ из нее. Поэтому чаще всего ацидоз сопровождается гиперкалиемией, а алкалоз гипокалиемией.

5.6.4. Обмен порфиринов и желчных пигментов. Лабораторная диагностика нарушений обмена порфиринов

Обмен порфиринов лежит в основе образования гема, продуктами деградации которого являются желчные пигменты.

В процессе биосинтеза гемоглобина и миоглобина происходит образование тетрапиррольного кольца протопорфирина, включение в него железа и последующее соединение образовавшегося железопорфиринового комплекса (гема) с белком – глобином. В животном организме кольцо протопорфирина образуется из уксусной кислоты и глицина. При превращении порфириногена в порфирины образуются в основном протопорфирин III и только в небольшом количестве порфирин I, который не используется в организме и выделяется из него в виде копропорфирина I. Количество протопорфирина III, образующегося за сутки в организме, равно около 300 мг, суточное же выделение этого вещества в виде копропорфирина III составляет всего 0,1 мг. Таким образом, почти весь синтезирующийся протопорфирин III идет на построение гемоглобина, миоглобина и других хромопротеидов.

Содержание порфиринов в эритроцитах, моче, кале. В процессе биологического распада гемоглобина происходит высвобождение железа и глобина, которые используются для синтеза новых молекул пигмента крови. Протопорфирин же превращается в желчные пигменты. Все эти реакции протекают в купферовских клетках печени и фагоцитарных клетках ретикулоэндотелиальной системы. В начале разрушения гемоглобина и миоглобина образуются зеленые пигменты – вердогемоглобины. При превращении пигментов мышц и крови в вердогемоглобины происходит раскрытие кольца протопорфирина (сохраняющего свои связи с железом и глобином) в результате разрыва α -метинового мостика с одновременным окислением первого и второго колец пиррола. Вердогемоглобин, теряя железо и глобин, превращается в желчные пигменты: вначале образуется

биливердин, который затем под влиянием клеточных дегидраз восстанавливается и превращается в билирубин. Основным источником желчных пигментов является простетическая группа гемоглобина, а затем и миоглобина. Из печени биливердин и свободный билирубин выделяются в желчный пузырь, а оттуда в кишечник. В кишечнике билирубин под влиянием кишечных бактерий восстанавливается в уробилиноген и стеркобилиноген, бесцветные формы (лейкосоединения) пигментов мочи и кала. Из этих лейкосоединений при окислении образуются уробилин и стеркобилин.

Основная масса уробилиногена и стеркобилиногена выделяется из организма через кишечник, но некоторая часть всасывается, частично поступает в кровь и выделяется почками вместе с мочой в виде уробилина и стеркобилина (общий уробилин мочи, количество которого колеблется обычно в пределах 0,2-2 мг в сутки и в норме не превышает 4 мг). В противоположность билирубину, биливердин в кишечнике не подвергается воздействию микрофлоры и выделяется из организма в неизменном виде. Некоторая часть билирубина может окисляться и превращаться в биливердин.

Порфирии. Порфирии – группа заболеваний, обусловленных нарушениями биосинтеза порфиринов. Эти заболевания встречаются сравнительно редко, однако больные порфирией могут обратиться к дерматологам, гепатологам и психиатрам; сравнительно часто встречается желтуха, обусловленная повышением содержания в плазме билирубина крови.

При острой порфирии нарушается превращение порфобилиногена в порфириноген. Вследствие этого в начале приступа с мочой выделяются красный пигмент порфобилин и его бесцветная форма – порфобилиноген, который при стоянии спонтанно превращается в порфобилин. Кроме того, из организма выводятся небольшие количества уро- и копропорфиринов I и III типов в виде цинковых соединений. Врожденная порфирия характеризуется

усилением продукции уро- и копропорфиринов I типа. Кости и зубы у больных становятся красными или коричневыми из-за отложения в них порфиринов. В моче присутствуют свободные уро- и копропорфирины I и следы протопорфирина III, а в фекальных массах – копропорфирин I. В случае кожной формы порфирии в период ремиссий из организма выводится почками и через кишечник около 20% всего нормально образующегося в нем протопорфирина. Во время приступа порфирины выделяются только с мочой в виде уро- и копропорфиринов I и III типов. Порфиринурии наблюдаются и при некоторых заболеваниях как следствие увеличения в организме количества свободных порфиринов, являющихся побочными продуктами при биосинтезе гема. Так, при апластической анемии и полиомиелите преобладает выделение копропорфирина III, в то время как в случаях пернициозной анемии, лейкемии, гемофилии, инфекционного гепатита и некоторых других заболеваний в основном выделяется копропорфирин I.

Лабораторная диагностика эритропоэтических порфирий.

Эритропоэтическая уропорфирия (врожденная порфирия, порфирия Гюнтера) - наследуется аутосомно по рецессивному типу. У родителей, гетерозиготных носителей патологического гена, нет клинических проявлений болезни. Это редкое тяжелое заболевание с поражением кожи, гемолитической анемией, внутриклеточным разрушением эритроцитов, выделением с мочой изомера уропорфирина. У новорожденных обнаруживаются красная моча, повышенная чувствительность кожи к солнечному облучению, почти у всех больных выявляется увеличение селезенки. Для заболевания характерны признаки гемолитической анемии, сопровождающиеся внутриклеточным разрушением эритроцитов. При этом повышается уровень непрямого билирубина, увеличивается содержание ретикулоцитов, отмечается раздражение красного ростка костного мозга без повышения содержания свободного гемоглобина плазмы и гемосидерина в моче. Осмотическая устойчивость эритроцитов часто снижена. В отдельных

случаях наблюдается тромбоцитопения. При биохимическом исследовании в моче обнаруживается большое количество изомера уропорфирина и меньше изомера копропорфирина. В эритроцитах больных определяется много уропорфирина. Эритроциты светятся красным светом в ультрафиолетовых лучах.

Избыточное отложение уропорфирина в эритроцитах приводит к укорочению продолжительности их жизни, повышенному гемолизу. Из эритроцитов освобождается много уропорфириногена, окисляющегося в уропорфин и откладывающегося в коже, обуславливая фотосенсибилизацию.

Эритропоэтическая протопорфирия – наследственная болезнь, обусловленная сенсбилизацией к солнечному облучению. У больных после даже кратковременного пребывания под солнечным светом на открытых участках кожи появляются отек, зуд, покраснение, часто повышается температура. При более длительном пребывании на солнце возникают геморрагические высыпания. Эритропоэтическая протопорфирия в отличие от эритропоэтической уропорфирии в большинстве случаев протекает доброкачественно. Из осложнений иногда наблюдаются гипохромная анемия с высоким содержанием железа, предрасположенность к камнеобразованию в желчном пузыре, в более редких случаях в печени откладывается большое количество порфиринов, затем формируется печеночная недостаточность.

Биохимически при эритропоэтической протопорфирии отмечают повышение содержания протопорфирина IX в эритроцитах, а содержание уропорфирина и копропорфирина сохраняется в пределах нормы. В моче содержание порфиринов не увеличено, так как протопорфирии не проходит в мочу. Значительно увеличено количество протопорфирина и копропорфирина в кале, хотя не у всех больных. Характерным признаком эритропоэтической протопорфирии является повышение уровня протопорфирина эритроцитов в 20-100 раз.

Эритропоэтическая копропорфирия – заболевание крайне редкое. Болезнь наследуется по аутосомно-доминантному типу. Клинически проявляется так же, как и эритропоэтическая протопорфирия. Содержание копропорфирина в эритроцитах повышается в 30-80 раз по сравнению с нормой, в моче содержание порфиринов повышается незначительно, в основном за счет копропорфирина. Прогноз благоприятный.

Лабораторная диагностика печеночных порфирий. *Острая перемежающаяся порфирия* - генетически детерминированное заболевание, передается по аутосомно-доминантному типу. В основе болезни лежат нарушение активности фермента уropорфириноген 1-синтазы, а также повышение активности синтазы 6-аминолевулиновой кислоты. Клинически проявляется поражением центральной нервной системы, реже – периферической нервной системы, периодическими болями в области живота, повышением артериального давления и выделением мочи розового цвета в связи с большим количеством в ней предшественника порфиринов. Наиболее характерным признаком острой перемежающейся порфирии являются боли в животе. Иногда сильным болям предшествует задержка менструаций. При острой порфирии поражается нервная система по типу тяжелого полиневрита, начинается с болей в конечностях, затруднений в движениях, связанных как с болью, так и с симметричными двигательными нарушениями, прежде всего в мышцах конечностей.

Чаще болезнь поражает молодых женщин, девушек и провоцируется беременностью, родами. Также возможно развитие заболевания вследствие приема ряда лекарств, таких как барбитураты, сульфаниламидные препараты, анальгин.

Диагностика острой перемежающейся порфирии основывается на обнаружении в моче у больных порфобилиногена – предшественника синтеза порфиринов, а также 6-аминолевулиновой кислоты. Дифференциальная диагностика острой перемежающейся порфирии проводится с со свинцовым отравлением. При свинцовом отравлении характерны боли в животе,

полиневрит. Однако свинцовое отравление, в отличие от острой порфирии, сопровождается гипохромной анемией с базофильной пунктацией эритроцитов и высоким содержанием железа сыворотки. Для острой порфирии анемия не характерна. У женщин, страдающих острой порфирией и меноррагиями, возможна хроническая постгеморрагическая железодефицитная анемия. Клинические проявления болезни объясняются накоплением в нервной клетке токсического вещества δ -аминолевулиновой кислоты. Данное соединение концентрируется в гипоталамусе и тормозит активность мозговой натрий-калий-зависимой аденозинфосфатазы, что приводит к нарушению транспорта ионов через мембраны и нарушает функцию нерва.

В дальнейшем развиваются демиелинизация нервов, аксональная нейропатия, что и обуславливает все клинические проявления болезни.

Порфиринурии и их лабораторная диагностика. Порфиринурия может быть симптомом порфирии или заболеваний печени, интоксикации, цитостатической терапии, инфекции, железодефицитной и гемолитической анемий, лимфогранулематоза, лейкоза.

В норме с мочой выделяются небольшие количества уро- и копропорфиринов. Усиление экскреции порфиринов наблюдается при поражении печени. Здоровая печень способна окислять и выделять продукты метаболизма порфиринов в виде копро-и протопорфиринов с калом. При выключении этого пути пигменты возвращаются в кровяное русло, проходят почечный фильтр и выделяются в повышенном количестве с мочой.

Прием алкоголя, рентгеновское облучение, физическое напряжение, гемолиз эритроцитов, миоглобинурия ведут к повышению уровня порфиринов мочи. При почечной недостаточности содержание порфиринов в моче уменьшается. Выделение с мочой порфобилиногена (ПБГ) окрашивает мочу в красный или розовый цвет и характерно для острой перемежающейся порфирии, которая сопровождается поражениями мышечной, центральной и периферической нервной системы.

5.6.5. Лабораторная диагностика нарушений обмена желчных пигментов

Образование, транспорт и выделение желчных пигментов.

Билирубин образуется при распаде гемоглобина в клетках ретикулоэндотелиальной системы (РЭС), особенно в селезенке и в купферовских клетках печени. У взрослого человека в сутки образуется примерно 250-350 мг билирубина.

Билирубин в плазме крови связан с альбумином. Это неконъюгированный, свободный, непрямой билирубин. Неконъюгированный билирубин нерастворим в воде и не может проникнуть через неповрежденный почечный фильтр. В печени билирубин отделяется от альбумина и переходит на синусоидальную поверхность гепатоцитов. В клетках печени свободный билирубин подвергается энзиматической конъюгации с глюкуроновой кислотой и превращается в билирубинмоно- и билирубиндиглюкоронид (конъюгированный, прямой или связанный билирубин). Конъюгированный билирубин водорастворим, он поступает с желчью в желчный пузырь, где под воздействием дегидрогеназ частично восстанавливается в мезобилирубин и в *i*-уробилиноген. *I*-уробилиноген вместе с остальным билирубином поступает через общий желчный проток в двенадцатиперстную кишку, где теряет глюкуроновую кислоту, всасывается слизистой двенадцатиперстной кишки и проксимального отдела тонкой кишки. По системе воротной вены вновь возвращается в печень и в печеночных клетках окисляется до дипирролов.

Мезобилирубин и билирубин поступают в толстую кишку, где под воздействием нормальной кишечной флоры восстанавливаются до бесцветного стеркобилиногена. В дистальном отделе толстой кишки основное количество стеркобилиногена окисляется в стеркобилин, который окрашивает каловые массы в различные оттенки коричневого цвета. Незначительная часть стеркобилиногена всасывается слизистой толстой кишки и через геморроидальные вены попадает в кровь, по нижней поллой

вене поступает в почки и фильтруется через почечный фильтр в мочу. Минимальное количество конъюгированного билирубина (7-20 мкг/кг в сутки), выделяемое с мочой, не определяется качественными методами.

Клиническое значение определения билирубина, его фракций и продуктов обмена. В сыворотке крови содержится билирубин, связанный с глюкуроновой кислотой или прямореагирующий, и билирубин, не связанный с глюкуроновой кислотой или непрямореагирующий. При гипербилирубинемии прямой билирубин накапливается в эластической ткани, глазном яблоке, мукозных мембранах и коже. Непрямой билирубин имеет тенденцию к накоплению в жировой ткани. При повышении концентрации билирубина в сыворотке свыше 35 мкмоль/л появляется желтуха, повышение прямого билирубина сопровождается появлением его в моче. У новорожденных билирубин-конъюгирующая система несовершенна, чем объясняется физиологическая желтуха в первую неделю жизни.

Референтные значения: Общий билирубин	Новорожденные 1 сутки	6,8-68,0 мкмоль/л
	Новорожденные 3 сутки	17,7-171 мкмоль/л
	Новорожденные 1 мес.	5,2-17,1 мкмоль/л
	Дети и взрослые	3,4-17,0 мкмоль/л
Билирубин конъюгированный (прямой)	Взрослые	< 5 мкмоль/л

Гипербилирубинемии гемолитические (надпеченочные желтухи) билирубин неконъюгированный:

- Гемолитические анемии острые и хронические;
- В12-дефицитная анемия;
- Талассемия;
- Обширные гематомы.

Гипербилирубинемии печеночные (печеночные желтухи), билирубин неконъюгированный и конъюгированный:

- Острый вирусный гепатит;

- Вирусная цитомегалия, инфекционный мононуклеоз;
- Амебный абсцесс печени, описторхоз, актиномикоз;
- Сифилис вторичный, третичный;
- Цирроз печени, холангит;
- Первичный рак печени, метастатические поражения печени;
- Первичный билиарный цирроз печени;
- Токсическое повреждение печени: четыреххлористым водородом, хлороформом, трихлорэтиленом, галотаном, посталкогольная желтуха;
- Лекарственные отравления: парацетамол, изониазид, рифампицин, хлорпромазин.

Гипербилирубинемии печеночные (подпеченочные желтухи), билирубин конъюгированный и неконъюгированный

- Внепеченочная обтурация желчных протоков;
- Механическая желтуха, желчнокаменная болезнь;
- Новообразования поджелудочной железы;
- Гельминтозы.

Патологическая билирубинурия отмечается при следующих заболеваниях:

- вирусный (инфекционный) гепатит;
- цирроз печени;
- заболевания желчного пузыря и желчных протоков;
- рак печени и метастатическая карцинома печени;
- токсический гепатит.

С диагностической точки зрения билирубинурию можно расценить следующим образом:

1. Положительная реакция на билирубин в моче свидетельствует об увеличении концентрации конъюгированного билирубина в плазме крови и превышении почечного порога билирубина, что характерно для нарушения поступления желчи в двенадцатиперстную кишку (вне- или

внутрипеченочная желтуха). Почечный порог билирубина составляет 30-34 мкмоль/л.

2. Одновременное повышение уровня билирубина и уробилиногена в моче является признаком паренхиматозной желтухи на 7-12 день заболевания и в период выздоровления.

Дифференциальная диагностика желтух. Желтуха (иктеричность кожи и видимых слизистых) появляется тогда, когда количество билирубина в плазме крови превышает пороговое значение и составляет примерно 34 мкмоль/л (или 20 мг/л), при этом билирубин начинает связываться эластическими волокнами кожи и конъюнктивы.

В зависимости от механизма образования различают следующие виды желтух:

1. подпеченочная или механическая (обтурационная) - обусловленная обструкцией желчных путей;
2. печеночноклеточная или внутрипеченочная (паренхиматозная или гепатоцеллюлярная) – обусловленная поражением паренхимы печени;
3. гемолитическая – надпеченочная или внепеченочная.

Обтурационная (обструкционная, подпеченочная) желтуха обусловлена вне или внутрипеченочной обструкцией желчных путей, которая вызывает частичное или полное прекращение оттока желчи. При обтурации общего желчного протока (камень, воспаление, опухоль) из-за скопления желчи в печеночных капиллярах желчь (прямой, конъюгированный билирубин) проходит в кровеносные капилляры между оболочками печеночных клеток (гепатоцитов). Уровень конъюгированного билирубина в плазме крови нарастает, а затем превышает почечный порог. Почечный фильтр свободно пропускает прямой билирубин. Билирубинурия при обтурационных желтухах – явление постоянное. Снижение содержания билирубина в моче или его полное исчезновение указывает на частичное или полное восстановление проходимости желчных путей.

При **гепатоцеллюлярной (паренхиматозной) желтухе**, когда в результате интоксикации повреждается паренхима печени (печеночные клетки - гепатоциты), одновременно в крови повышается уровень конъюгированного и неконъюгированного билирубина. Первопричиной этого состояния может быть нарушение клиренса неконъюгированного билирубина из крови, нарушение выделения конъюгированного билирубина из печеночных клеток в желчные капилляры и последующее проникновение конъюгированного билирубина из печеночных капилляров, переполненных желчью, в кровеносные капилляры через разрушенные печеночные клетки. Гепатоцеллюлярная желтуха характерна для острого вирусного гепатита в токсической фазе, тяжелой бронхопневмонии, гриппа, токсикозов и других инфекционных заболеваний.

Повышенная концентрация конъюгированного билирубина в сыворотке крови больных инфекционным гепатитом сопровождается увеличенной экскрецией билирубина с мочой. При этой патологии интенсивность билирубинурии усиливается параллельно с тяжестью заболевания, достигая максимальных значений в разгар болезни, после чего начинает уменьшаться. В начале заболевания билирубин в моче практически не обнаруживается, а его высокая концентрация (моча цвета «темного пива») на фоне выраженной желтухи и бесцветных каловых масс является признаком разгара заболевания (интрагепатального застоя желчи).

Гемолитическая желтуха характеризуется чрезмерным образованием неконъюгированного билирубина, либо его задержкой в организме при нарушении выведения. В плазме крови больных повышается уровень общего билирубина за счет неконъюгированного. В моче же реакция на билирубин отрицательная, так как неконъюгированный, связанный с альбумином билирубин, не проходит через неповрежденный почечный фильтр. Такое состояние характерно для гемолитических анемий с внутриклеточным и внутрисосудистым или смешанным гемолизом, гемолитического криза при малярии, при V_{12} мегалобластической анемии, действии токсинов

(отравление грибами, змеиными ядами и т.д.), либо при трансфузии несовместимой крови.

Повышенный уровень неконъюгированного билирубина в плазме крови наблюдается при нарушении его метаболизма, в частности, при наследственном нарушении транспорта желчных пигментов (синдром Жильбера). У людей с этим синдромом почти постоянно отмечается незначительная желтушность кожных покровов, конъюнктивы и видимых слизистых. Причиной этого является неспособность гепатоцитов захватывать, конъюгировать и выделять билирубин в желчные капилляры. При физиологической желтухе новорожденных (*icterus neonatorum gravis*) наблюдается транзиторная недостаточность механизмов конъюгации за счет недостаточности функции печени новорожденных. При этом из-за повышенной проницаемости почечного фильтра неконъюгированный билирубин выделяется с мочой в виде мелких желто-коричневых зернышек.

5.7. Биохимические исследования при отдельных заболеваниях, их осложнениях, синдромах

5.7.1. Лабораторные маркеры заболеваний печени

Гепатиты, циррозы, дистрофия. Основным маркером гепатита является повышение в сыворотке активности АЛТ, причем при остром вирусном гепатите повышение АЛТ наблюдается за 3-4 дня по появления желтухи и увеличения билирубина. Для паренхиматозного гепатита характерно увеличесье в системе циркуляции конъюгированного непрямого билирубина. При длительном затяжном течении, наряду с непрямым повышается и прямой билирубин. При инфильтративных повреждениях гепатоцитов может в большей степени увеличиваться АСТ, чем АЛТ. При вовлечении в воспалительный процесс желчевыводящих путей маркером холестаза является повышение в сыворотке активности ЩФ. Совместное повышение в сыворотке ЩФ и ГГТ – четкий признак синдрома холестаза. В тоже время в педиатрии предпочтительнее определять активность ГГТ.

Уровень активности ЩФ помогает при дифференциальной диагностике внутри- и внепеченочного холестаза: при внутрипеченочной обтурации ЩФ может быть увеличенной более чем в 10 раз, при внепеченочной обтурации – в 2-3 раза, что объясняется меньшей степенью повреждения желчных протоков. Для синдрома холестаза характерно также повышение конъюгированного билирубина.

Цирроз печени – прогрессирующее заболевание, характеризующееся перестройкой нормальной структуры печени с нарушением функции и развитием в последующем печёночной недостаточности. Наиболее важные причины, приводящие к циррозу печени – вирусный гепатит (прежде всего, гепатиты В и С) и алкоголизм. Цирроз печени развивается, как правило, в течение длительного периода и биохимически проявляется неактивно: имеет место незначительное повышение АСТ и АЛТ. При алкогольном и билиарном циррозе относительное повышение ГГТ бывает более выраженным, чем повышение АСТ. Нарушается синтез белков альбумина и глобулинов, а также белков, необходимых для свертывания крови, в первую очередь протромбина.

Для оценки синтетической способности гепатоцитов используют определение в сыворотке концентрации альбумина, протромбина (протромбинового времени), активности холинэстеразы.

Время полужизни альбумина в плазме 15-20 дней, в день синтезируется 150-250 мг/кг массы тела. В организме содержится 310-330 г альбумина, из которых примерно 40% присутствует в кровяном русле. Поэтому в острых ситуациях уменьшение количества альбумина в сыворотке крови отражает перераспределение жидкости, потерю альбумина в выпотные жидкости, с мочой, а не снижение его синтеза. При хроническом гепатите гипоальбуминемия может быть результатом уменьшения синтеза. Протромбиновое время может удлиняться при холестазе, так как синтез протромбина зависит от наличия витамина К, а всасывание витамина К в кишечнике происходит в присутствии желчных кислот, без них он не

всасывается. Поэтому, если через 1 сутки после внутримышечного введения витамина К протромбиновое время нормализуется или уменьшается более чем на 30%, то это говорит о нарушении метаболизма витамина К, если - нет, то это свидетельство тяжелой патологии печени с нарушением синтетической способности.

Гепатоциты синтезируют холинэстеразу (ХЭ). В условиях паренхиматозного поражения печени ее синтез и активность в крови снижены. Наиболее часто снижение активности ХЭ является следствием токсического влияния лекарственных препаратов (цитостатики), инсектицидов, флюоридов.

Печеночная кома. Печеночная кома или печеночная энцефалопатия относится к группе тяжело протекающих заболеваний, сопровождающихся обширным поражением паренхимы печени и нарушениями функций центральной нервной системы, что приводит к состоянию комы. Причинами такого развития болезни могут служить гепатиты в тяжелых формах с быстрым острым течением, цирроз печени, различные отравления ядами токсического действия. При биохимическом анализе крови возможно выявить глубокие нарушения, которые приводят к печеночной коме. Обычно выявляются сниженный уровень белка, уменьшение протромбина, высокий уровень билирубина, повышаются продукты азотистого обмена. При печеночной энцефалопатии обязательно обнаружатся электролитные сдвиги резкого характера.

Издавна придается большое значение накоплению аммиака, что связано с его недостаточным обезвреживанием. Аммиак вызывает «отравление» церебральных клеток, он летучо может проникать внутрь клеток, так как растворим в липидах. Этим объясняется его избирательное накопление в клетках мозга. К церебротоксинам относят также свободные фенолы, низкомолекулярные жирные кислоты, пировиноградную и молочную кислоты. В крови больных увеличивается содержание фенилаланина, тирозина, триптофана, метионина. Первые три аминокислоты

являются предшественниками нейромедиаторов (допа, допамина, серотонина), а метионин – предшественником токсических метаболитов (метилмеркаптан, метионин-сульфоксид). Чрезмерное накопление серотонина, метионина и феноловых тел из-за нарушения обмена фенилаланина и тирозина, наряду с аммониемией, обуславливают тяжелое поражение центральной нервной системы. Пировиноградная и молочная кислоты накапливаются в большом количестве и вызывают внутриклеточный ацидоз, что, в свою очередь, увеличивает проницаемость клеточных мембран и создает условия для поступления в клетки печени и мозга токсических веществ и воды. В итоге развивается отек клеток мозга. Ответ на метаболический ацидоз у больных рефлекторно возникает компенсаторная гипервентиляция, при этом активно выводится угольная кислота, развивается гипокапния, что приводит к респираторному алкалозу. Гипокапния снижает потребление клетками головного мозга кислорода и глюкозы. Начинается перераспределение электролитов: электролиты начинают двигаться по градиенту концентрации, т. е. в межклеточное пространство уходит калий, а в клетку поступают натрий и ионы водорода.

Рак печени. К злокачественным опухолям печени относятся первичный рак, разлитые виды сарком, а также метастатическое поражение печени опухолями других локализаций. Частота метастатического поражения печени значительно преобладает над частотой первичных опухолей. Метастазы в печень обнаруживаются у 20-70% онкологических больных, в том числе у 50% больных, перенёсших резекцию толстой кишки по поводу рака.

Опухолевым маркером первичного рака печени является альфа-фетопротеин (АФП)

Тест на АФП помогает выявить злокачественный характер новообразования. Высокий уровень АФП может указывать на наличие опухоли. Исследование также проводится при уже выявленном раке печени. Врач может выбрать наиболее подходящий метод лечения по уровню АФП. Анализ так же помогает определить эффективность лечения; при успешном

лечении уровень АФП должен снизиться. Тест на АФП используется для оценки рецидивов.

5.7.2. Лабораторные маркеры заболеваний поджелудочной железы

Панкреатит, панкреонекроз. *Острый панкреатит* сопровождается активацией протеолитических ферментов и аутолизом поджелудочной железы, возможны некротическая и геморрагическая формы, которые представляют угрозу жизни больного. Амилаза начинает повышаться в крови через 3-12 ч после начала заболевания, максимум в крови достигается через 20-30 ч, затем активность фермента уменьшается, через 3-4 дня уровень фермента в сыворотке нормализуется. В моче уровень амилазы повышается на 6-10 ч позднее, чем в сыворотке. Между степенью повышения α -амилазы и тяжестью панкреатита жесткой связи нет, тем не менее, высокие цифры α -амилазы свидетельствуют о тяжелой форме заболевания. Примерно в 20 % случаев острый панкреатит, особенно при гиперлипидемии, протекает без повышения активности α -амилазы в сыворотке, тогда как липаза у этих больных повышается. Как правило, при остром панкреатите повышение амилазы в моче выше, чем в крови (за исключением случаев развития почечной недостаточности и наличия макроамилазы в крови), активность амилазы в моче держится повышенной дольше, чем в сыворотке. Только у 1/3 пациентов с острой болью в животе и повышением α -амилазы в сыворотке развивается панкреатит. Источником α -амилазы могут быть слизистая оболочка кишечника и некоторые ткани женской половой системы. Это говорит о низкой специфичности теста. Наиболее чувствительный ферментный индикатор обострений хронического панкреатита и более специфичный, чем альфа-амилаза, маркер острого панкреатита – повышение Р-изофермента (панкреатической) амилазы в сыворотке крови.

Хронический панкреатит сопровождается повышением α -амилазы и липазы при обострениях. В то же время поджелудочная железа является

единственным источником образования трипсина, определение его активности может дать ценную информацию об экзокринной функции органа. Исследуют активность трипсина в крови, а также содержание в крови его ингибитора – α 1-антитрипсина. Об обострении хронического панкреатита свидетельствует повышение в крови трипсина и уменьшение концентрации его ингибитора.

Активность химотрипсина и эластазы исследуют в кале, эти тесты применяют для оценки экзокринной функции поджелудочной железы и при дифференциальной диагностике хронического панкреатита с синдромом мальабсорбции.

При панкреонекрозе происходит отмирание клеток поджелудочной железы. Это случается при деструктивной форме острого панкреатита. Наиболее частая причина – употребление больших доз алкоголя вместе с жирной пищей. Некроз поджелудочной железы является следствием преждевременной активации пищеварительных ферментов. В норме они переходят в «рабочее» состояние при контакте с желчью. Если же пищеварительные ферменты активируются слишком рано, не в кишечнике, а в протоках поджелудочной железы, они начинают переваривать орган, который их производит.

Избыточное количество пищеварительных ферментов и повышение давления в протоках становится причиной заброса желчи в панкреатические протоки. Желчь, которая смешивается с панкреатическим соком и пищеварительными ферментами, попадает в поджелудочную железу. Первыми активируются ферменты, расщепляющие жиры. Они уничтожают мембраны здоровых клеток. Далее, если патологический процесс продолжает развитие, подключаются протеазы, расщепляются белки. Поджелудочная железа фактически самоуничтожается, переваривая саму себя. Так развивается панкреонекроз. В лабораторной диагностике в первую очередь обращают внимание на резко повышенный уровень амилазы в моче и крови, а также пищеварительных ферментов – трипсин, хемотрипсин.

Сахарный диабет. Сахарный диабет – группа метаболических заболеваний, характеризующихся гипергликемией. Поэтому основным маркером данного заболевания является повышенное содержание глюкозы в системе циркуляции. Однако, глюкоза крови – достаточно лабильный показатель, который отражает состояние углеводного обмена в течение последних нескольких минут, может меняться в зависимости от физического, эмоционального состояния пациента, приема лекарственных препаратов, в том числе инсулина. Поэтому имеются обоснованные предложения в качестве маркера сахарного диабета использовать определение гликированного гемоглобина (HbA_{1c}), содержание которого в системе циркуляции определяется уровнем гликемии и длительностью контакта гемоглобина с глюкозой. Уровень гликированного гемоглобина в эритроцитах является интегральным показателем углеводного обмена за предшествующие 6-8 недель и является достаточно стабильным маркером сахарного диабета.

5.7.3. Лабораторные маркеры заболеваний сердечно-сосудистой системы

Инфаркт миокарда. Диагноз инфаркта миокарда складывается из клинической картины, характерных изменений ЭКГ и динамики изменения с повышением и последующим снижением в крови биохимических маркеров повреждения миокарда.

Традиционными маркерами острого повреждения сердечной мышцы являются сердечная фракция креатинкиназа (МВ-КК), миоглобин, тропонин Т или тропонин I. В последнее время к этой группе маркеров раннего инфаркта миокарда присоединился белок, связывающий жирные кислоты.

Креатинкиназа (КК) – фермент, с молекулярной массой 85 кДа, осуществляет превращение фосфокреатина с образованием креатина и АТФ, который необходим для мышечного сокращения. Для ткани сердца характерен изофермент КК-МВ. Изофермент КК-МВ важно исследовать при ОИМ, так как эта изоформа в значительном количестве содержится

практически только в сердечной мышце. Активность и концентрация КК-МВ в сыворотке крови повышаются, начиная с 4-6 часов после повреждения миокарда, достигают пика через 12-24 часа и возвращается к исходному уровню через 48-72 часа. КК-МВ значительно более специфична при повреждении миокарда, чем общая активность КК в сыворотке. Однако активность гена, кодирующего субъединицу В, может повышаться в регенерирующей скелетной мышце, что снижает специфичность этого маркера.

Миоглобин – небольшой гем-содержащий растворимый белок скелетных мышц и миокарда (м.м. 17 500). Благодаря высокой растворимости и небольшому размеру, миоглобин быстро освобождается при поражении мышц и выводится почками. Это ранний маркер острого инфаркта миокарда, увеличивается в крови уже через 2-4 часа, и приходит к норме, как правило, за 24 часа. Повторные повышения уровня МГ в крови на фоне уже начавшейся нормализации говорит об образовании новых некротических очагов. Существенным недостатком этого маркера является его низкая специфичность. Нормальный уровень миоглобина помогает исключить диагноз инфаркта миокарда, но его повышение может быть связано и с различными поражениями скелетных мышц. При нарушении почечного кровотока и снижении фильтрации в почках уровень МГ в сыворотке крови может существенно повышаться.

Сердечный белок, связывающий жирные кислоты. Миокард единственная ткань, которая постоянно нуждается в свободных (неэтерифицированных) жирных кислотах (СЖК) для энергообразования. Поглощение СЖК кардиомиоцитами происходит путем активного транспорта, который осуществляет особый переносчик - сердечный белок, связывающий жирные кислоты – (сБСЖК). Этот белок связан с плазматической мембраной кардиомиоцитов. сБСЖК - маркер раннего выявления некроза миокарда. БСЖК, так же как и миоглобин, присутствует и в сердце, и в скелетных мышцах. За счет низкой молекулярной массы – 15

кДа, присутствия в цитоплазме кардиомиоцита и особенностей распределения в организме (основная часть содержится в миокарде) этот маркер обладает кинетикой освобождения в кровь, сходной с кинетикой МГ, однако является более специфичным. Определение сБСЖК используется для ранней диагностики ОИМ, выявления ранних рецидивов ИМ, оценки успеха реперфузионного лечения и рисков у больных с ОКС. Динамика нарастания уровня сБСЖК наиболее выражена в первые часы после развития ангинозного приступа (его уровень повышается через 1-2 часа после начала болевого приступа), достигая максимума через 4-6 часов. Возвращение к нормальному уровню сБСЖК происходит через 12-24 часа после начала ишемии.

Тропонин — белок сократительного аппарата мышц. Сердце и скелетные мышцы содержат разные изоформы тропонинов I и T, что позволило создать тесты, высокоспецифичные для поражения сердца. С точки зрения диагностики инфаркта миокарда, обе субъединицы тропонина I и T совершенно равнозначны, и все международные рекомендации не делают различия между ними. Оба маркера (ТnI и ТnT) могут быть обнаружены в крови пациента спустя 3-6 часов после начала боли в груди, достигая пикового уровня в течение 12-36 часов (а иногда и позже). Тропонин - наиболее специфичный маркер повреждения миокарда различной этиологии, позволяет оценить размер очага инфаркта миокарда. Это наиболее чувствительный поздний маркер острого инфаркта миокарда: измерение уровня тропонина T информативно в период до 14 дней заболевания. По уровню тропонина возможно оценить риск развития сердечно-сосудистых осложнений при нестабильной стенокардии, он позволяет выявить даже самые незначительные повреждения миокарда.

Высокочувствительный тропонин. Даже небольшое повышение сердечного тропонина (сТn) – свидетельство сердечно-сосудистых заболеваний. Низкий уровень сТn – свидетельство благополучия сердечно-сосудистой системы. В связи с этим было сформулировано достаточно

уникальное требование к тест-системам, предназначенным для определения сТп. Тест-система должна определять уровень тропонина в сыворотке у здорового со стороны сердечно-сосудистой системы человека. Была предложена схема для утверждения тест-систем на тропонин, согласно которой вводится понятие о 99-ой перцентили. Согласно этой схеме тест-система должна среди 100 здоровых человек без каких-либо патологий, затрагивающих сердечно-сосудистую систему, определять уровень сТп ниже установленного для этой тест-системы дискриминантного значения. Допускается, что только у 1 из 100 здоровых человек тест-система выявит уровень сТп выше установленного для этой тест-системы дискриминантного значения. Более того, тесты на кардиальные тропонины I или T должны иметь коэффициент вариации (CV) меньше 20%. Чем меньше значения CV, тем меньше отличия при повторных измерениях в одном и том же образце, выше точность и меньше ложноположительных диагнозов. Были разработаны, так называемые, высокочувствительные тесты – hs-cTn, чувствительность которых была повышена в 1000–10000 раз. hs-cTn у пациентов с симптомами острого коронарного синдрома – ранний маркер ИМ, который, по сравнению с «обычными» сТп тестами, выявляет большее количество пациентов с диагнозом ИМ без подъема сегмента ST и является независимым предиктором неблагоприятных исходов. Динамика уровней hs-cTn (повышение, постоянство, снижение концентрации в крови) дифференцирует острый некроз кардиомиоцитов от их хронического повреждения. С помощью серийного измерения hs-cTn диагноз ИМ можно исключить уже в первые часы после поступления в кардиологическую клинику.

Сердечная недостаточность. Сердечная недостаточность – синдром, приводящий к снижению насосной функции сердца, гиперактивации нейрогормональных систем и проявляющийся одышкой, сердцебиением, повышенной утомляемостью, ограничением физической активности и избыточной задержкой жидкости в организме.

Мозговой натрийуретический пептид (BNP) по содержанию в сыворотке крови коррелирует с функциональным классом сердечной недостаточности, эффективностью лечения пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями и предсказывает прогноз у пациентов с острым коронарным синдромом, сердечной недостаточностью и пороками сердца. Диагностически значимое повышение уровня BNP обнаружено у пациентов при стабильной и нестабильной стенокардии, остром инфаркте миокарда, пороках клапанов сердца. Измерение уровня NT-proBNP рекомендовано проводить всем пациентам с высоким риском развития сердечной недостаточности, прежде всего: перенесшим инфаркт миокарда, больным сахарным диабетом, пациентам с заболеваниями почек, пациентам с артериальной гипертонией, пациентам, имеющим наследственную предрасположенность к болезням сердца и сосудов, лицам старше 50 лет.

ST2 – член семейства рецепторов интерлейкина-1 (IL-1). Он имеет 4 изоформы, 2 из них непосредственно вовлечены в развитие сердечно-сосудистых заболеваний: растворимая форма (sST2) и мембран-связанная форма рецептора (ST2L). ST2 – маркер используемый для прогнозирования риска сердечной недостаточности, ишемической болезни сердца, а также летальности пациентов с ранее установленным диагнозом сердечно-сосудистого заболевания. Уровень sST2 тесно связан с тяжестью сердечной недостаточности: одним из главных преимуществ этого теста является возможность выявить сердечную недостаточность у больных еще на бессимптомной стадии. Повышение уровня sST2 является мощным предиктором развития осложнений сердечной недостаточности и последующей летальности вне зависимости от уровня других биомаркеров, в том числе NT-proBNP. Большое прогностическое значение имеет изменение уровня sST2 у пациентов после острого инфаркта миокарда: повышение концентрации sST2 у таких пациентов свидетельствует о неблагоприятном прогнозе. Концентрация sST2 в плазме крови больных не зависит от этиологии сердечной недостаточности и, в отличие от натрийуретических

пептидов, – от индекса массы тела и функции почек, что повышает его надежность и ценность в клинической практике.

Инсульт. Ишемические повреждения головного мозга – сопровождаются повышением активности в ликворе ферментов ЛДГ и КК-ВВ. Несмотря на то, что в отличие от КК-ВВ ЛДГ неспецифична для ткани ЦНС, а уровень ее в ликворе повышается позже, чем мозгового изофермента КК, тест на ЛДГ является более информативным для прогнозирования клинического течения мозгового инсульта; уже через 8 часов активность ЛДГ в ликворе пациентов с последующими осложнениями со стороны ЦНС значительно выше. Активность ЛДГ в ликворе напрямую зависит от размеров повреждения мозговой ткани. Концентрация белка S-100 в спинномозговой жидкости также повышается после инсульта, а его уровень зависит от размеров повреждения.

Липопротеин (а) [ЛП(а)] – сходная с ЛПНП, обогащенная холестерином (ХС) и белком частица, содержит молекулу апо(а) в дополнение к молекуле апо В. Апо(а) имеет гомологию с плазминогеном человека. В отличие от большинства липидных факторов риска, риск, связанный с повышенными уровнями ЛП(а), не зависит ни от возраста, ни от пола, ни от диеты и ни от условий жизни. Повышенные уровни ЛП(а) способствуют развитию сердечно-сосудистых заболеваний за счет проатерогенного характера ЛПНП и протромботических свойств аполипопротеина Апо(а). Измерение уровней ЛП(а) позволяет оценить риск ишемических инсультов независимо от других факторов риска. Измерять уровни ЛП(а) следует у пациентов с ранними случаями ССЗ, у тех, у кого в семейной истории часты случаи ССЗ и есть подозрение на генетическую предрасположенность. Референсные значения ЛП(а): целевой уровень <14 мг/дл, пограничный риск: 14-30 мг/дл, высокий риск: 31-50 мг/дл, очень высокий риск: >50 мг/дл.

Липопротеин-ассоциированная фосфолипаза А2 (ЛП-ФЛА2) *связана с циркулирующими в плазме атерогенными частицами ЛПНП и с ЛП(а).*

Комплексы ЛП-ФЛА2-ЛПНП способны проникают в интиму. Под действием оксидативного стресса происходит окисление фосфолипидов ЛПНП. ЛП-ФЛА2 гидролизует окси-фосфолипиды, при этом образуются лизофосфатидилхолин (лизо-ФХ) и окисленные жирные кислоты (окси-ЖК). Лизо-ФХ и окси-ЖК – это медиаторы воспаления, которые участвуют в дестабилизации атеросклеротической бляшки. Более того, в атеросклеротической бляшке ЛП-ФЛА2 синтезируется макрофагами de novo.

ЛП-ФЛА2 – высокоспецифический маркер сосудистого воспаления. Синтез ЛП-ФЛА2 особенно интенсивно происходит в бляшках сонной артерии, это ведет к высокой нестабильности бляшек бассейна сонной артерии. ЛП-ФЛА2 – предиктор ишемического инсульта, независимый от ЛПНП. Тест на ЛП-ФЛА2 был официально одобрен FDA для оценки риска ишемического инсульта и заболеваний коронарных артерий. Повышенный уровень ЛП-ФЛА2 свидетельствует о повышении риска ишемического инсульта в 2 раза. Особенно эффективно сочетанное измерение hsCRP и ЛП-ФЛА-2 для оценки рисков ишемического инсульта. Если повышена только ЛП-ФЛА-2, риск инсульта повышается в 2 раза. Если же ЛП-ФЛА2 и hsCRP повышены одновременно — риск инсульта возрастает более чем в 10 раз.

Артериальная гипертензия (гипертоническая болезнь).

Повышенные уровни CRP связаны с повышенным артериальным давлением. В широкомасштабных исследованиях показано, что как для мужчин, так и для женщин с гипертензией уровень CRP составлял $2,3 \pm 0,07$ мг/л, тогда как в конт рольной группе – $1,6 \pm 0,07$ мг/л. Однако повышенные уровни CRP причиной гипертензии не являются.

Ангиотензин-превращающий фермент (АПФ) несомненно вовлечен в развитие таких взаимосвязанных патологических состояний, как артериальная гипертензия, нарушение липидного обмена и метаболический синдром. Основная локализация АПФ в организме человека – эндотелий сосудистой стенки. Вследствие этого именно кровеносные сосуды являются

основным местом образования ангиотензина-2 и инактивации брадикинина, оказывающих противоположное действие на вазомоторные реакции, гемодинамику и водно-солевой баланс. Артериальное давление несомненно зависит как от концентрации, так особенно от удельной активности АПФ плазмы крови. Последнее обусловлено преобладанием в крови ингибиторного потенциала в отношении АПФ со стороны разных компонентов преимущественно пептидной природы. Вероятно, неспецифические эндогенные ингибиторы АПФ играют роль своеобразной буферной системы, способствуя стабилизации артериального давления.

Эндотелин (ЭТ) – полипептидная молекула, относящаяся к группе цитокинов. Является главным вазоконстрикторным пептидом. Синтез и высвобождение эндотелина стимулируется тромбином, адреналином, ангиотензином, вазопрессином, интерлейкинами, клеточными ростовыми факторами. В большинстве случаев ЭТ секретируются из эндотелия «внутри», к мышечным клеткам, где расположены чувствительные к пептиду рецепторы. В физиологических концентрациях ЭТ действует на эндотелиальные рецепторы, вызывая высвобождение факторов релаксации, а в более высоких активизирует рецепторы на гладкомышечных клетках, стимулируя стойкую вазоконстрикцию. Таким образом, при помощи одного и того же фактора реализуются две противоположные сосудистые реакции - сокращение и расслабление, определяется это концентрацией биомаркера. Нарушение процессов синтеза и деградации ЭТ при различных патологических состояниях в конечном итоге отражается на изменении тонуса сосудов. Дисбаланс эндотелий-зависимой сократимости и релаксации сосудов при артериальной гипертензии может способствовать повышению общего периферического сопротивления сосудов и появлению сердечно-сосудистых осложнений. Характерно увеличение ЭТ крови с возрастом. Наиболее высокий уровень ЭТ отмечен при атеросклерозе, неспецифическом аортоартериите, облитерирующем тромбангите, т.е. при заболеваниях, протекающих с повреждением эндотелия. Для действия ЭТ характерна

медленно нарастающая вазоконстрикция, что обуславливает ишемию миокарда.

Атеросклероз. Аполипопротеины А и В. Все липопротеиды, несущие липиды к периферическим тканям, имеют в своей структуре АпоВ-белок. Рецепторы к АпоВ-белку имеются практически во всех клетках тканей, за исключением клеток нервной системы и эритроцитов. Транспорт холестерина из клеток периферических тканей в печень (обратный транспорт холестерина) осуществляется ЛПВП. Основными белковыми компонентами ЛПВП является АпоА-1 (65%) и АпоА-II (30%). Определение в крови АпоА и АпоВ имеет значение для выявления риска атеросклероза коронарных артерий в популяции, а отношение АпоВ/АпоА-1 превосходит прогностическое значение отдельных АпоЛП. Это связано с тем, что измерение содержания АпоА-I и Апо В в сыворотке дает более точную информацию о содержании молекул липопротеидов, чем концентрация холестерина липопротеидов, так как концентрация холестерина липопротеидов зависит как от состава, так и их количества.

Измерение концентраций апоВ и апоА – ключевых белков ХС-ЛПНП и ХС-ЛПВП – это наиболее точное и однозначное определение баланса проатерогенных и антиатерогенных холестерина, которое оценивает риск фатальных и нефатальных инфарктов миокарда в течение последующих пяти лет. Рекомендуемое значение АпоВ/АпоА1 – менее 1,1. Чем больше в сыворотке АпоА1 и меньше АпоВ, тем ниже вероятность развития сердечно-сосудистой патологии.

Окисленные липопротеины низкой плотности *Окислительный стресс – усиление продукции высоко реактивных форм кислорода (H_2O_2 , O_2^- и OH) является одним из системных повреждающих факторов клеточных мембран, усиливающих эффекты факторов риска. Окисленные формы липопротеинов низкой плотности (окЛПНП) оказывают выраженное проатерогенное действие. Окислительный стресс в клетках сосудистой стенки сопровождается накоплением в атеросклеротической бляшке*

продуктов, которые могут образовываться только в результате взаимодействия свободных радикалов кислорода с белками и липидами. Увеличение концентрации перекисей липидов в крови отмечается сразу после курения табака. Липиды могут быть модифицированы под влиянием ферментов липоксигеназы и миелопероксидазы, которые присутствуют в атеросклеротической бляшке.

В окЛПНП происходит модификация липидов и апоВ-белка, сопровождающаяся структурной и функциональной дезориентацией, делающей невозможными обычную утилизацию окЛПНП через апоВ-рецепторы. В виде модифицированных продуктов окЛПНП являются не просто балластом в интимае сосудов, а оказывают раздражающее действие на близлежащие клетки. Результатом является включение механизмов защиты, восприятие модифицированных липопротеидов как чужеродной субстанции. Макрофаги поглощают модифицированные липопротеины, используя для этого севенджер-рецепторы. Перенаполненные модифицированными липопротеинами макрофаги превращаются в пенистые клетки, являющиеся морфологическим субстратом липидной атеросклеротической бляшки. Перекисная модификация ЛПНП сопровождается существенным повышением их иммуногенности. Образование антител к окЛПНП, захватываемым клетками артериальной стенки, является дополнительным фактором повреждения артерий. Антитела против окЛПНП могут использоваться как параметр, точно отражающий окислительные процессы, происходящие *in vivo*. Повышенные уровни аутоантител против окЛПНП были обнаружены в циркулирующей крови у пациентов с ишемической болезнью сердца, выявлена корреляция между ауто-антителами против окЛПНП и прогрессированием коронарного атеросклероза.

C-реактивный белок. При остром коронарном синдроме дестабилизацию (разрыв) атеромы и образование тромба связывают с процессами воспаления. У больных нестабильной стенокардией повышенный базовый уровень СРБ встречается значительно чаще (у 70% пациентов), чем при

стенокардии напряжения (у 20% больных). Среди больных с нестабильной стенокардией, у которых развился острый инфаркт миокарда, уровень СРБ был повышен (>3 мг/л) практически у всех (98%) пациентов.

Высокочувствительный С-реактивный белок. Вялотекущее воспаление в интиме сосуда отражает уровень С-реактивного белка, определяемый высокочувствительным методом (hsСРБ). Этот показатель проспективно определяет риск развития сосудистых осложнений, дополняя прогностическую информацию, которую дают классические факторы риска, такие как курение, ожирение, инсулинорезистентность, уровень холестерина и ЛПНП. Базовый уровень С-реактивного белка означает концентрацию СРБ, которая стабильно выявляется у здоровых лиц, а также у пациентов при отсутствии острого воспалительного процесса или вне обострения заболевания. Именно для определения базового уровня СРБ используют методы высокочувствительного анализа. Величина базового уровня СРБ непосредственно связана с риском развития тяжелых сердечнососудистых заболеваний и их осложнений – острого инфаркта миокарда и мозгового инсульта. Базовый уровень СРБ измеряется не ранее, чем через 2 недели после исчезновения симптомов любого острого заболевания или обострения хронического заболевания и в стабильности которого можно убедиться, повторив измерение. Данные, основанные на результатах различных исследований связи величины базового уровня СРБ с риском сосудистых осложнений, представлены в таблице 5.44.

Таблица 5.44

Риск сердечнососудистых заболеваний в зависимости от базового уровня СРБ

Концентрация СРБ, мг/л	Риск сосудистых осложнений (инсульт, ОИМ)
<1	Минимальный
1.1-1.9	Низкий

2.0-2.9	Умеренный
>3	Высокий

Базовый уровень СРБ может определять эффективность первичной и вторичной профилактики сердечнососудистых заболеваний и их осложнений.

Гипергомоцистеинемия. Повышенное содержание гомоцистеина является независимым фактором риска атеросклероза, деменции и болезни Альцгеймера. Гомоцистеин – это серусодержащая аминокислота, которая является промежуточным продуктом обмена аминокислот метионина и цистеина. Ключевую роль в обмене гомоцистеина играют витамины В₆, В₁₂ и фолиевая кислота. Содержание гомоцистеина в плазме крови здорового человека составляет 5-15 мкмоль/л. Гипергомоцистеинемия (ГГЦ) диагностируется в случае превышения уровня 15 мкмоль/л. При концентрации гомоцистеина в плазме крови 15-30 мкмоль/л степень ГГЦ считают умеренной, 30-100 мкмоль/л – средней, более 100 мкмоль/л – тяжелой.

Гомоцистеин ускоряет развитие атеросклероза с помощью трёх основных эффектов: токсического действия на эндотелий сосудов, усиления адгезии тромбоцитов, неблагоприятного воздействия на факторы свёртывания крови. В основе развития оксидативного стресса при ГГЦ лежат ферментативные окислительно-восстановительные реакции. В процессе окисления ГЦ образуются перекисные ионы (O_2^-) и H_2O_2 , что инициируют перекисное окисление липидов и приводит к повреждению поверхности эндотелиальных клеток и образованию окисленных липопротеинов плазмы крови. ГЦ нарушает сосудорасширяющую функцию эндотелия за счет того, что перекисные радикалы $O_2^{\cdot-}$, образовавшиеся при аутоокислении ГЦ, могут переводить вазодилататор NO в форму пероксинитритов $OONO^-$ (NO^-), не обладающую вазодилатирующими свойствами. Через окислительный стресс ГЦ инициирует каскад воспалительных реакций. ГГЦ также способствует повышенному тромбообразованию. Увеличение концентрации ГЦ в плазме

крови повышает агрегационную способность тромбоцитов и их адгезивные свойства. Эффективным средством снижения уровня гомоцистеина в плазме являются добавки фолиевой кислоты, одной или в комбинации с витаминами В₆ и В₁₂.

5.7.4. Лабораторные маркеры заболеваний почек

Нефриты. Анализ крови может показать понижение уровня общего белка в крови, лейкоцитоз, увеличенную СОЭ, повышение уровня С-реактивного белка, увеличение содержания мочевины, холестерина и креатинина. В связи с развитием иммунохимических методов с высокими аналитическими характеристиками появилось несколько маркеров, отражающих разные функциональные характеристики деятельности почек.

Симметричный диметиларгинин (SDMA) является метилированным производным аминокислоты L-аргинина (симметричного диметиларгинина), выделяется преимущественно почками, поэтому концентрация SDMA в плазме отражает почечную функцию. Как взрослые, так и дети с ранними стадиями почечной недостаточности (стадии 2-3 от легкой до средней) уже имеют значительно повышенный уровень SDMA, который строго коррелирует с СКФ. У пациентов с гепаторенальным синдромом уровень SDMA сильно повышен по сравнению со здоровыми лицами и с пациентами с циррозом и без гепаторенального синдрома

Альфа-1-микроглобулин (α 1-мГ) синтезируется в печени, метаболизируется в почках, у здоровых лиц обнаруживается в моче только в малых концентрациях. Если гломерулярная фильтрация снижена, наблюдается рост α 1-мГ в сыворотке. Показания: ранняя диагностика воспалительных почечных заболеваний, острая почечная недостаточность, ренальная тубулярная протеинурия.

Бета-2-микроглобулин (β 2-мГ) имеет М.м. 12 кДа, относится к части легкой цепи мембраносвязанных HLA-антигенов. β 2-мГ синтезируется в лимфатической системе, фильтруется клубочками и реабсорбируется в

канальцах. Наличие $\beta 2$ -мГ в моче свидетельствует о нарушении почечной фильтрации. Множественные миеломы, болезнь Ходжкина, хронический лимфлейкоз и другие злокачественные неходжкинские лимфомы повышают концентрацию $\beta 2$ -мГ в крови. Другие заболевания с активацией клеточного иммунитета также вызывают повышение $\beta 2$ -мГ в сыворотке. В моче с кислым рН молекулы белка неустойчивы. Одновременное измерение $\beta 2$ -мГ в сыворотке и моче позволяет провести дифференциацию между активацией лимфатической системы и нарушением функции почек. Показания: изменения гломерулярной и тубулярной фильтрации, тубулярные нарушения, связанные с отравлением тяжелыми металлами (кадмий, ртуть), отторжение пересаженной почки, заболевания иммунной системы.

α -Глутатион S-трансфераза (α GST) локализуется в проксимальных канальцах нефрона, тогда как π GST содержится в основном в дистальных канальцах. α GST экскретируется в мочу здоровых людей и повышается при повреждении проксимальных канальцев при нефротоксичности, связанной с внешними факторами, ишемической реперфузией, диабетом, острой почечной недостаточностью, транс-плантацией почки. Уровень GSTs в моче – очень чувствительный индикатор текущего повреждения почки и может выявлять патологию почек тогда, когда другие маркеры, например, креатинин или азот мочевины сыворотки крови, остаются неизменными.

π -Глутатион S-трансфераза (π GST) в почках локализуется в дистальных канальцах, в норме экскретируется в мочу. Повышенные уровни π GST в моче являются индикаторами повреждения дистальных канальцев при отторжении трансплантата почки, нефротоксичности, инфекции, диабете и хронических заболеваниях почек. Одновременное определение концентраций π -GST и α -GST позволяет проводить дифференциальную диагностику повреждений проксимальных и дистальных канальцев.

Нефрозы. Основным признаком нефротического синдрома – протеинурия. Различают клубочковую, тубулярную и смешанную ренальную протеинурию.

Клубочковая (гломерулярная) протеинурия характерна для всех заболеваний почек, протекающих с поражением коркового вещества. Это острый и хронический гломерулонефрит, нефропатия при сахарном диабете, нефропатия беременных, нефрозы, опухоль почки, поражение почек при гипертонической болезни, подагра. Протеинурия при этих патологических процессах связана с нарушением принципа относительной селективности в почечных клубочках.

Селективная гломерулярная протеинурия – развивается при нарушении фильтрации вследствие изменения поверхностного заряда сиалогликопротеинов на гломерулярной мембране или изменения поверхностного заряда белков. Типичным примером такого эффекта является гликирование альбумина (фруктозамин) и поверхностных белков гломерулярного фильтра при сахарном диабете. В результате на ранних стадиях диабетической нефропатии развивается микроальбуминурия, а затем, по мере прогрессирования заболевания, протеинурия. При селективной гломерулярной протеинурии электрофореграмма белков мочи не соответствует электрофореграмме белков сыворотки крови. Гломерулярный фильтр не пропускает высокомолекулярные глобулины. Это характерно для компенсированной стадии хронического гломерулонефрита. Такие больные поддаются лечению стероидными препаратами и иммуносупрессорами.

Неселективная (низкоселективная) гломерулярная протеинурия возникает когда почечный фильтр практически отсутствует и пропускает плазменные белки разной молекулярной массы. При неселективной протеинурии в моче обнаруживаются белки с молекулярной массой более 100 кДа (IgA, IgG), за исключением белков с очень большой массой (IgM, α -2 макроглобулин). Электрофореграмма мочевого белка идентична электрофореграмме плазменного белка. Эта форма протеинурии характерна

для нефротического синдрома, при котором больные не чувствительны к лечению стероидными гормонами.

Тубулярная протеинурия проявляется нарушением реабсорбции белков в проксимальном отделе нефрона или усиленной продукцией белка (белок Тамма-Хорсфалла) клетками почечного эпителия дистального отдела нефрона. Характерным является выведение с мочой белков низкомолекулярной массы (менее 40 кДа), таких как бета-2-микроглобулин, ретинол-связывающий белок или лизоцим и уропротеин Тамма-Хорсфалла. Эта форма протеинурии встречается при тубулярной нефропатии, развивающейся при отравлениях солями тяжелых металлов (ртуть, свинец, кадмий), токсическими веществами (этиленгликоль, четыреххлористый углерод), нефротоксическими препаратами (антибиотики из группы аминогликозидов, фенацитин). Тубулярная протеинурия возникает при острой почечной недостаточности, сопровождающейся тубулярным некрозом, как осложнение при трансплантации почек, интерстициальном нефрите, при тяжелых ожогах, при синдроме Фанкони, врожденном почечном ацидозе.

Смешанная (гломерулярно-тубулярная) протеинурия является признаком нескольких типов почечной недостаточности: нарушения фильтрации в клубочках и нарушения реабсорбции в канальцах. Это, обычно, манифестная стадия всех нефропатий, при которой в моче могут быть обнаружены практически все белки плазмы крови (низкоселективная протеинурия). За сутки с мочой может теряться до 1г белка. Причиной смешанной протеинурии могут быть острая почечная недостаточность, пиелонефрит, тромбоз почечных вен.

Острое почечное повреждение. ОПП – комплекс синдромов, характеризующихся быстрым и резким падением скорости клубочковой фильтрации (СКФ). Совершенствование методов диагностики и прогнозирования ОПН связано с обнаружением биомаркеров для ранней диагностики ОПН.

Нейтрофил-желатиназа-ассоциированный липокалин (липокалин-2, neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL)) является компонентом острой фазы воспалительного ответа в почках. Его основные функции заключаются в стимулировании пролиферации поврежденных клеток, в первую очередь эпителиальных, а также в противодействии бактериальным инфекциям. Повышение синтеза NGAL в клетках проксимальных канальцев почек вызывается нарушениями, связанными с ишемией почечной паренхимы и ее поражениями нефротоксическими соединениями. У человека в ответ на повреждение почечных канальцев уровень NGAL резко возрастает как в плазме крови (уровень сывороточного NGAL (s-NGAL) повышается в 7–16 раз), так и в моче (уровень NGAL в моче (u-NGAL) увеличивается в 25–1000 раз). При этом экскреция NGAL с мочой на 24–48 часов опережает повышение концентрации креатинина в сыворотке крови. Уровни NGAL в плазме и в моче тесно коррелируют как друг с другом, так и с тяжестью ренальных нарушений, однако уровень NGAL именно в моче является особенно высоким после ишемических ренальных повреждений, тяжесть которых достаточна для того, чтобы вызвать ОПП.

Кальпротектин образуется из кальций-связывающих белков. Определение его в моче перспективно в качестве биомаркера для дифференциации преренального ОПП и внутреннего ОПП. Средняя концентрация кальпротектина значительно ниже в случае преренальных причин ОПП, чем в случае почечных причин. Пиурия увеличивает концентрацию кальпротектина независимо от почечной недостаточности поэтому только после исключения пиурии по уровню кальпротектина можно различать преренальное и внутреннее ОПП.

Хроническое почечное повреждение. Важнейшим показателем хронического почечного повреждения (ХПП) считается значительное снижение скорости клубочковой фильтрации (СКФ) до 25% (<30 мл/мин). В развитии хронической почечной недостаточности (ХПН) наиболее важным моментом является постепенное и бессимптомное нарушение функции

почек. В рекомендациях по скринингу хронических болезней почек (ХБП) основное внимание, как правило, уделяется лицам с гипертензией. Клинически выраженные признаки почечной недостаточности появляются при гибели 60-75% нефронов. Ранние бессимптомные стадии заболевания почек можно выявить лабораторными методами: в настоящее время чаще всего определяют креатинин сыворотки и рассчитывают СКФ.

Клиренс эндогенного креатинина. Почечный клиренс – это выраженное в миллилитрах количество плазмы, которое при прохождении через почки очищается от какого-либо вещества в течение 1 мин. Величину клиренса рассчитывают по концентрации данного вещества в плазме крови и в моче с учетом минутного диуреза. Почки в норме в минуту вырабатывают фильтрат примерно из 120 мл плазмы. Поэтому, если величина клиренса вещества меньше этой величины, значит оно реабсорбируется, если же выше, значит оно секретировано. Клиренс эндогенного креатинина составляет 85-125 мл/мин. Зная величину клиренса, можно оценить функцию клубочков. При хронических нефритах по величине клубочковой фильтрации определяют массу действующих нефронов.

Определяют концентрацию креатинина в сыворотке крови. Собирают суточную мочу, определяют объем мочи и концентрацию в ней креатинина. Рекомендуется начинать сбор мочи с 8-00, затем собирать всю выделившуюся за сутки мочу, включая мочу, собранную в 8-00 следующего дня. Хранить мочу следует в холодильнике или на льду, после окончания сбора необходимо мочу сразу же отнести в лабораторию.

$$\text{Клиренс креатинина (мл/мин)} = \frac{\text{Объем мочи (мл/мин)} \times [\text{креатинин}] \text{ в моче}}{[\text{креатинин}] \text{ в сыворотке}} \times \frac{1,73}{A},$$

где А – площадь поверхности тела

Нормальные значения:

Женщины до 40 лет: 75-115 мл/мин

За каждую следующую декаду снижение

Мужчины до 40 лет: 85-125 мл/мин

примерно на 6,5мл/мин

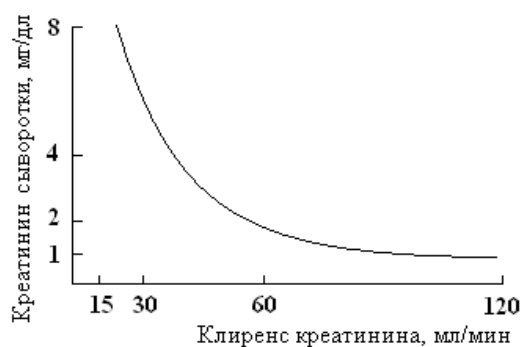


Рис. 5.10. Соотношение между концентрацией креатинина в сыворотке и клиренсом креатинина. Концентрация креатинина в сыворотке повышается в тех случаях, когда клиренс креатинина снижается. Почечная недостаточность связана с клиренсом креатинина: значительное нарушение гломерулярной фильтрации соответствует клиренсу креатинина > 50 мл/мин, почечная недостаточность – клиренсу креатинина 20-50 мл/мин, почечная недостаточность с уремией – клиренсу креатинина 5-20 мл/мин.

Примерно клиренс креатинина можно оценить по уровню креатинина сыворотки по формуле:

$$\text{Клиренс креатинина} = \frac{98 - (4/5)(\text{Возраст} - 20)}{\text{Концентрация креатинина в сыворотке}}$$

Допустимо, также применение, т. н. «краткой» формулы MDRD:

$$\text{СКФ, мл/мин/1,73 м}^2 = 186 \times (\text{креатинин})^{-1,154} \times (\text{Возраст})^{0,203}$$

В данном представлении этой формулы концентрация креатинина крови выражается в мг/дл. Для пересчета *мг/100мл* в *мкмоль/л* необходимо величину, выраженную в *мг/100 мл* разделить на 88,4. У женщин, полученную величину следует умножить на 0,742.

Цистатин С (ЦсС). Цистатин С – относительно новый маркер скорости клубочковой фильтрации. У человека ЦсС - негликозилированный протеин с м.м. 13 кДа продуцируется на постоянном уровне всеми ядродержащими клетками и присутствует в больших количествах во всех биологических жидкостях и выводится из организма только почками. ЦсС свободно фильтруется в клубочках (Имеет 100% клиренс), не секретируется в канальцах, реабсорбируется и расщепляется в клетках почечных канальцев. Уровень в плазме и в моче не зависит от мышечной массы, возраста, пола, этнической принадлежности.

Концентрация ЦсС в сыворотке крови обратно коррелирует с СКФ и может быть чувствительнее сывороточного креатинина для оценки СКФ. Определение цистатина С в сыворотке рекомендуют для скрининга ХБП (особенно на начальных стадиях, когда креатинин сыворотки малочувствителен), оценки СКФ у пациентов со сниженной мышечной массой, у детей и пожилых лиц.

5.7.5. Лабораторные маркеры метаболических заболеваний костной ткани

Кость – специализированная соединительная ткань, которая, как и все соединительные ткани, содержит клетки и внеклеточный матрикс. Внеклеточный матрикс состоит из органического и неорганического материала. Органическая часть представлена белками, из которых 95% приходится на коллаген I типа, входящего в состав фибрилл. Неколлагеновые белки – это остеокальцин, остеоонектин и остеонектин. Неорганический материал сформирован кальцием, фосфатом, магнием, гидроксиапатитом. На протяжении жизни происходит замена минерализованного матрикса на вновь образованную кость. Этот процесс получил название ремоделирования или «костного оборота». Нарушения цикла ремоделирования или регуляции активности костных клеток происходят при метаболических заболеваниях костной ткани, в том числе остеопорозе, гиперпаратиреозе, опухолевых процессах в костной ткани, остеомалации, болезни Педжета.

Иммунохимические маркеры формирования и резорбции кости представлены в табл. 5.45. Маркеры формирования кости включают костный изофермент щелочной фосфатазы (КЩФ), остеокальцин (ОК), карбокси- и аминотерминальные фрагменты проколлагена I типа (КТППК1 и АТППК1). Маркерами резорбции кости считаются пиридинолин и дезоксипиридинолин (ПИД и ДПИД), карбокси- и аминотерминальные телопептиды коллагена I типа (КТТК1 и АТТК1), оксипролин (ОП), тартратрезистентная кислая фосфатаза.

Биохимические маркеры ремоделирования кости

Маркер	Тканевая специфичность	Метаболизм
Маркеры формирования кости		
Костная щелочная фосфатаза (КЩФ)	Синтезируется остеобластами; синтез возрастает в процессе дифференциации остеобластов. Уровень КЩФ в крови коррелирует с интенсивностью формирования кости, измеренным радиоактивным Са ⁴⁷ .	Выводится почками; время полужизни в крови ($t_{1/2}$) 1-2 дня.
Остеокальцин (ОК)	Синтезируется остеобластами и одонтобластами. Уровень ОК в крови коррелирует с состоянием формирования кости.	Выводится почками; в крови присутствуют интактные молекулы ОК и их фрагменты; $t_{1/2}$ несколько минут.
Карбокси- и аминотерминальные пропептиды проколлагена I типа (КТППКІ и АТППКІ)	Находятся в тканях, содержащих коллаген I типа (преимущественно в костях и коже). Образуются в результате отщепления от молекулы проколлагена I типа под воздействием специфических пептидаз. Отражают синтез остеобластами коллагена I типа.	КТППКІ метаболизируется в печени; $t_{1/2}$ в крови 6-8 минут.
Маркеры резорбции кости		
Пиридиновые поперечные связи -пиридинолин (ПІД) и дезоксипиридинолин (ДПІД)	Формируются между концевой областью одной молекулы коллагена и спиралевидной областью другой. Способствуют стабилизации коллагена. ПІД в основном присутствует в коллагене II типа в хрящах и в меньшей степени в костной ткани. ДПІД присутствует преимущественно в кости, освобождается только при резорбции кости.	Экскретируются с мочой; не метаболизируются в печени.
Карбокси- и аминотерминальные телопептиды коллагена I типа (КТТКІ, АТТКІ)	Присутствуют во всех тканях, содержащих коллаген I типа. Выбрасываются из костей только в процессе резорбции кости.	Выводятся с мочой
Оксипролин (ОП) Костная тартрат-резистентная кислая фосфатаза (ТРКФ)	Присутствует в молекулах коллагена и эластина. Появляется в экстрацеллюлярной жидкости при формировании и при резорбции кости. Присутствует в остеокластах и других макрофагах.	Метаболизируется в печени; 10-15% выводится почками.

Остеопороз. В основе патогенеза развития остеопороза лежит дисбаланс процессов костного ремоделирования: либо преобладает ускоренная резорбция, либо сниженное костеобразование, либо замедление

обеих составляющих костного обмена. Основная цель ранней биохимической диагностики остеопороза состоит в оценке интенсивности костного метаболизма. Наибольшее значение в дифференциальной диагностике заболеваний скелета метаболического характера имеет оценка гормонального статуса больных, в частности паратиреоидного гормона (ПТГ), половых стероидных и гонадотропных гормонов, а также витамина Д, участвующего с ПТГ в регуляции обмена кальция. Определение концентрации кальция, фосфора и общей активности щелочной фосфатазы сыворотки крови используются в оценке общего статуса больного и имеет вспомогательное, но не диагностическое значение.

Остеокальцин – основной неколлагеновый белок костного матрикса. Синтез остеокальцина зависит от витаминов К и D, что до некоторой степени снижает чувствительность и специфичность определения остеокальцина, как маркера метаболизма костной ткани. Но его концентрация в крови отражает метаболическую активность остеобластов костной ткани, поскольку остеокальцин крови – результат нового синтеза, а не освобождения при резорбции кости.

Деоксипиридинолин (ДПИД). На сегодняшний день ДПИД считают самым адекватным маркером резорбции кости. Костный коллаген характеризуется наличием поперечных связей между отдельными молекулами коллагена, которые играют большую роль в его стабилизации и представлены в виде деоксипиридинолина. Выход ДПИД в сосудистое русло из кости происходит в результате его разрушения остеокластами. ДПИД не подвергается дальнейшим метаболическим превращениям и выводится с мочой в неизменном виде. Уровень ДПИД в моче у женщин несколько выше, чем у мужчин и повышается с возрастом. У женщин в период менопаузы экскреция ДПИД с мочой в 2-3 раза выше, чем у женщин детородного возраста, причем экскреция не зависит от диеты и физической активности. Как у женщин, так и у мужчин экскреция ДПИД увеличивается при первичном гиперпаратиреозе (примерно в 3 раза), гипертиреозе (примерно в

5 раз). Менее значимо, тем не менее, достоверно экскреция ДПИД увеличивается при остеопорозе, остеоартритах и ревматоидном артрите. Экскреция во всех случаях снижается при успешном лечении. Для оценки эффективности лечения остеопороза используют, как правило, маркеры резорбции, поскольку их снижение под влиянием терапии начинается уже через 2-3 недели и достигает плато через 3-6 месяцев. Выявление нормального или значительно повышенного уровня маркера резорбции при однократном определении уже имеет диагностическое значение.

Карбокситерминальные телопептиды коллагена I типа (КТТКИ) образуются в тканях, которые содержат коллаген I типа. Молекулярная масса телопептидов составляет от 9 до 20 кД, они эффективно выводятся с мочой. Концентрация КТТКИ в сыворотке тесно коррелирует со скоростью резорбции кости. Для определения КТТКИ используют иммуноферментный анализ с моноклональными антителами против поперечносвязанных молекул коллагена I типа (CrossLaps). CrossLaps можно использовать для определения телопептидов коллагена как в сыворотке, так и в моче. В период менопаузы маркер CrossLaps увеличивается в сыворотке почти в 2 раза. Динамическое определение уровня телопептидов имеет важное значение для прогнозирования восстановления минеральной плотности кости при проведении антирезорбционной терапии у женщин в постменопаузальный период, у пациентов с остеопенией и полезью Педжета. Преимущество использования CrossLaps состоит в том, что данный маркер костной резорбции позволяет быстро оценить эффективность всех видов терапии остеопороза уже через 3 месяца после начала лечения. Увеличение CrossLaps от среднего значения нормы на 2SD ассоциируется с 2-х кратным повышением риска переломом шейки бедра.

Рахит, остеомаляция. Рахит – заболевание, при котором нарушенный кальциевый обмен приводит к формированию дефектов костного скелета. Определяющая роль в развитии рахита принадлежит экзо- или эндогенному дефициту витамина D: недостаточному образованию холекальциферола в

коже, недостаточному поступлению витамина D с пищей и нарушению его метаболизма. Основными физиологическими функциями витамина D, точнее – его активных метаболитов 25-гидроксиколекальциферола [25(OH)D, кальцидиол] и 1,25-дигидроксиколекальциферола [1,25(OH)2D, кальцитриол] в организме служат: усиление всасывания солей кальция (Ca) и фосфора (P) в кишечнике; препятствие выведению Ca и P с мочой за счет усиления их реабсорбции в канальцах почек; минерализация костной ткани. Вследствие гипокальциемии по принципу обратной связи развивается вторичный гиперпаратиреоз. Увеличение продукции паратиреоидного гормона обуславливает выход Ca из костей и поддержание его достаточно высокого уровня в крови.

Со стороны лабораторных данных проявляются:

- содержание кальция – нормальное или снижение концентрации общего кальция до 2 ммоль/л и ниже, ионизированного кальция до 1 ммоль/л и менее; исследование ионизированного кальция более информативно, так как, в случае изменения концентрации белков изменяется и уровень общего кальция (независимо от уровня ионизированного);
- характерно снижение концентрации неорганических фосфатов до 0,6-0,8 ммоль/л;
- резкое повышение щелочной фосфатазы.

Остеомаляция – нарушение минерализации костной ткани, это рахит взрослого. Заболевание наблюдается у женщин приблизительно в 10 раз чаще, чем у мужчин. В основе остеомаляции лежит недостаток в организме витамина D. Кроме того к дефекту процесса костной минерализации приводят также оперативные вмешательства на желудке и кишечнике, хронические заболевания поджелудочной железы и печени, муковисцидоз. При анализе лабораторных данных в зависимости от результатов можно предположить ту или иную форму остеомаляции. Так, например, при снижении уровня фосфатов в крови ниже нормы, снижении концентрации кальцидиола и увеличении паратгормона можно предположить, что

первопричиной остеопороза выступает дефицит витамина D, который может быть алиментарным или возникнуть в результате нарушения его всасывания в пищеварительном тракте. Если количество фосфатов в крови снижено наряду с увеличенным клиренсом фосфатов, можно предположить первичную потерю фосфатов или синдром Фанкони.

Метастазы опухоли в кость. Злокачественные заболевания – достаточно частая причина гиперкальциемии у больных, особенно при метастазировании в кость. Известно 2 действующих механизма гиперкальциемии. Первый – локальная остеолитическая гиперкальциемия, при которой продукты жизнедеятельности опухолевых клеток, например цитокины, стимулируют локальную резорбцию кости остеокластами. Эта форма бывает при обширном поражении костей опухолью; чаще всего при метастазах рака молочной железы, миеломной болезни и лимфоме. При втором механизме – гуморальной паранеопластической гиперкальциемии – опухолевые метаболиты оказывают общее действие, стимулируя резорбцию кости и снижая обычно экскрецию Ca. Гиперкальциемия часто развивается при солидных опухолях из-за секреции опухолью ПТГ-подобных пептидов. Эти пептиды имеют участки аминокислотной последовательности, подобные ПТГ, они действуют через рецепторы этого гормона, но не выявляются методом иммуноанализа. Эти пептиды могут иметь значение в метаболизме Ca в тубертатный период у подростков, у взрослых роль этих пептидов не ясна. У больных с метастазами в кость часто отсутствует зависимость между степенью метастазирования и тяжестью гиперкальциемии. Это может быть связано с вовлечением гуморальных факторов в патогенез гиперкальциемии. Эффектом по стимуляции резорбции кости обладают ростовые факторы, простагландины и особенно цитокины, активирующие остеокласты, которые часто повышаются при лейкозах.

Лабораторные исследования для диагностики метаболических заболеваний костной ткани:

Скрининг-методы (сыворотка, кровь):

- Альбумин – для коррекции результатов общего кальция.
- Щелочная фосфатаза – повышение активности при одновременном уменьшении уровня Са в сыворотке указывает на увеличение активности остеобластов (формирование костной ткани).
- Креатинин – позволяет оценить, являются ли изменения Са и/или $\Phi_{\text{неорг}}$ результатом недостаточности почек, а также определить, как длительная гиперкальциемия повлияла на функции почек.
- Кислотно-основное соотношение (КОС) – для коррекции результатов определения общего и ионизированного Са.
- Общий кальций (скоррегированный).
- Ионизированный Ca^{2+} .
- Фосфор неорганический.

Исследования, применяемые с целью исключения новообразований как причины гиперкальциемии:

- Морфологическое исследование крови.
- Электрофорез белков.

Дополнительные тесты:

- ц-АМФ-нефрогенный – тест измерения активности ПТГ, применяемый для дифференцировки причин гиперкальциемии. Потенциально полезен в дифференциальной диагностике гиперкальциемии, так как с помощью этого теста можно разделить гиперкальциемию, связанную с образованием ПТГ, или с гиперкальциемией, вызванной секрецией опухолью фактора, аналогичного по действию ПТГ (ПТГ-подобный пептид). При этом гиперкальциемия может быть выявлена без установления первичного опухолевого очага или метастазов в кости.

- ПТГ в сыворотке. Наиболее распространенные методы иммуноанализа основаны на выявлении средних молекул или С-концевого фрагмента. Методы позволяют в большинстве случаев дифференцировать первичный гиперпаратиреоз от других причин гиперкальциемии. Однако

при почечной недостаточности в сыворотке накапливаются С-концевые фрагменты ПТГ, и определяемый уровень ПТГ оказывается искусственно завышенным. В подобных случаях прибегают к более современному и специфическому иммуноферментному определению нативного 1-84 ПТГ (определяется по 2 фрагментам молекулы).

- Тест гипокальциемического действия гидрокортизона, используется для дифференциации гиперкальциемии, обусловленной первичной гиперфункцией паращитовидных желез, от гиперкальциемии, вызванной новообразованиями. Этот тест имеет меньшую диагностическую ценность, чем тест непосредственного определения ПТГ и нефрогенного цАМФ.

- Выделение с мочой гидроксипролина и пептидов, содержащих гидроксипролин – повышенное выделение гидроксипролина свидетельствует о распаде коллагена костной ткани.

- $25(\text{OH})\text{D}_3$ – в плазме – уменьшается при дефиците витамина D_3 (за исключением противосудорожной терапии и применении барбитуратов), увеличивается в результате отравления витамином D_3 .

- Выделение Ca с мочой – диагностическая ценность для определения причин гиперкальциемии мала. Исключение составляют врожденная гипокальциуретическая гиперкальциемия.

- Тест инфузии ПТГ – измерение выделения фосфора и нефрогенного цАМФ с мочой в результате инфузии ПТГ. Тест помогает определению типа недостаточности паращитовидных желез.

- Магний – гипوماгнемия может быть причиной дефицита фосфора. Гипомагниемия является причиной недостаточности паращитовидных желез.

5.8. Контрольные материалы к главе 5

Контрольные вопросы:

1. Каково клинико-диагностическое значение определения общего белка и альбумина?
2. Дифференциально диагностическое значение определения мочевины и креатинина в сыворотке крови?
3. Диагностическое значение парапротеинемий.
4. Какие индивидуальные белки составляют основную массу α_1 - и α_2 -глобулинов?
5. В чем преимущество С-реактивного белка по сравнению с СОЭ как показателя воспалительной реакции?
6. Каково диагностическое значение компонентов комплемента?
7. В чем диагностическое значение определения ферритина и трансферрина при анемиях?
8. Сопоставьте диагностическое значение апо А, апоВ и липопротеинов низкой и высокой плотности при сердечно-сосудистых заболеваниях?
9. Какие маркерные белки используются для диагностики острой сердечной недостаточности, клинико-диагностическое значение каждого из них?
10. Каково диагностическое значение метаболитов костной ткани?
11. Каковы органоспецифичность аминотрансфераз ?
12. По какой причине при патологии печени одновременно определяют активность нескольких ферментов?
13. Какие из ферментов имеют наибольшую диагностическую значимость при патологии поджелудочной железы и почему?
14. В чем различия диагностических возможностей определения глюкозы в венозной и капиллярной крови?
15. Диагностические критерии метаболического синдрома?
16. Каковы особенности лабораторных показателей при сахарном диабете I и II типов
17. Что такое диабет LADA?

18. В чем причина широкой токсичности гипергликемии?
19. Охарактеризуйте основные лабораторные критерии гликогенозов?
20. Какие липопротеиды присутствуют в сыворотке крови, их диагностическое значение?
21. Каково диагностическое значение липидограммы?
22. Охарактеризуйте каскадный принцип и механизм обратной связи гормональной регуляции?
23. Диагностическое значение определения тропных гормонов?
24. Что определяет эндокринная и экзокринная функция поджелудочной железы?
25. Какова роль печени в гормональной регуляции у мужчин и женщин?
26. За счет каких механизмов осуществляется реабсорбция воды в почках?
27. Почему недопустимы кратные изменения активности калия в крови?
28. Основные интерферирующие факторы значения общего и ионизированного кальция в крови?
29. Основные показатели метаболического ацидоза и метаболического алкалоза.
30. Каковы возможности легочной и почечной регуляции кислотно-основного состояния?
31. Диагностическое значение прямого и непрямого билирубина.
32. Диагностическое значение биохимических показателей при заболеваниях печени.
33. Диагностическое значение биохимических показателей при заболеваниях почек.
34. Диагностическое значение биохимических показателей при заболеваниях сердечно-сосудистой системы.
35. Диагностическое значение биохимических показателей при панкреасе.

ТЕСТЫ

Инструкция: Выбрать один правильный ответ

05.01. К белкам плазмы относят :

- А) кератины
- Б) эластин
- В) глобулины
- Г) склеропротеины
- Д) коллагены

05.02. Определение альфа-фетопротеина имеет диагностическое значение при :

- А) эхинококкозе печени
- Б) первичном раке печени
- В) инфекционном гепатите
- Г) раке желудка
- Д) осложненном инфаркте миокарда

05.03. Гипоальбуминемия наблюдается при :

- А) гепатите
- Б) панкреатите
- В) беременности
- Г) нефротическом синдроме
- Д) гиперпротеинемии

05.04. Гамма-глобулины снижаются при:

- А) ишемической болезни сердца
- Б) гастрите
- В) лучевой болезни
- Г) опухоли пищевода
- Д) ревматоидном артрите

05.05. Белок Бенс-Джонса можно идентифицировать:

- А) реакцией агглютинации
- Б) диализом мочи
- В) электрофорезом белков мочи
- Г) концентрированием мочи
- Д) реактивом Фолина

05.06. С-реактивный белок:

- А) присутствует в норме, но при воспалении снижается
- Б) наибольшее повышение наблюдается при бактериальном воспалении
- В) снижается при вирусном воспалении

- Г) появляется при хроническом воспалении
- Д) исчезает при осложнениях в постоперационном периоде (раневой абсцесс, тромбофлебит, пневмония)

05.07. Основная физиологическая роль гаптоглобина

- А) связывание гемоглобина
- Б) антипротеолитическая активность
- В) участие в реакции иммунитета
- Г) участие в свертывании крови
- Д) участие в синтезе гемоглобина

05.08. Основная физиологическая роль церулоплазмينا:

- А) участие в свертывании крови
- Б) создание антипротеолитической активности
- В) активация гемопоэза
- Г) транспорт меди
- Д) транспорт железа в организме

05.09. При использовании оптического теста Варбурга для кинетического определения активности фермента учитывают:

- А) скорость превращения пирувата в лактат
- Б) скорость превращения лактата в пируват
- В) скорость превращения НАДН в НАД
- Г) скорость превращения α -кетоглутарата в пируват
- Д) скорость превращения паранитрофенил фосфата (p-NPP) в паранитрофенил (p-NP)

05.10. Наиболее показательным при усилении резорбции кости является повышение сывороточной активности:

- А) ГГТП
- Б) аминотрансфераз
- В) каталазы
- Г) тартратрезистентной кислой фосфатазы
- Д) лактатдегидрогеназы

05.11. При панкреатитах в сыворотке повышается:

- А) кислая фосфатаза
- Б) глутаматдегидрогеназа
- В) ГГТП
- Г) щелочная фосфатаза
- Д) липаза

05.12. Понижение глюкозы в крови может наблюдаться при:

- А) гиперпаратиреозе

- Б) инсуломе
- В) феохромоцитоме
- Г) гипертиреозе
- Д) синдроме Иценко-Кушинга

05.13. Гликированный гемоглобин – это:

- А) Hb A1c
- Б) Hb F
- В) Hb AO
- Г) Hb A1a
- Д) Hb A1b

05.14. Антиатерогенным эффектом обладают:

- А) триглицериды
- Б) холестерин
- В) пре-бета-липопротеиды
- Г) липопротеиды низкой плотности (ЛПНП)
- Д) липопротеиды высокой плотности (ЛПВП)

05.15. При повышении уровня альдостерона в крови наблюдается:

- А) повышение натрия в сыворотке крови
- Б) уменьшение объема внеклеточной жидкости
- В) повышение уровня калия сыворотки
- Г) снижение уровня кальция
- Д) повышение натрия мочи

05.16. В крови содержание глюкокортикоидов повышается при:

- А) хронической надпочечниковой недостаточности
- Б) феохромоцитоме
- В) болезни Аддисона
- Г) болезни Иценко-Кушинга
- Д) длительном приеме цитостатических средств

05.17. Общий тироксин повышен при :

- А) миксидеме
- Б) при лечении трийодтиронином
- В) гипертиреозе
- Г) значительном дефиците йода
- Д) акромегалии

05.18. Показатель насыщения гемоглобина кислородом, это :

- А) процентное отношение оксигемоглобина к общему содержанию гемоглобина
- Б) объем связанного кислорода одним граммом гемоглобина

- В) отношение физически растворенного кислорода к кислороду оксигемоглобина
- Г) напряжение кислорода, при котором весь гемоглобин находится в форме оксигемоглобина
- Д) гематокрит

05.19. О тканевой гипоксии свидетельствует :

- А) гипоальбуминемия
- Б) увеличение в сыворотке лактата
- В) увеличение активности АЛТ, АСТ
- Г) гиперкоагуляция
- Д) снижение потребления кислорода

05.20. Основным ионом, определяющим перенос воды в организме, является:

- А) калий
- Б) натрий
- В) кальций
- Г) хлор
- Д) полиэлектролиты белков

05.21. «Голодные» отеки связаны с:

- А) задержкой натрия в организме
- Б) белковым истощением
- В) увеличением альдостерона в сыворотке
- Г) недостатком вазопрессина
- Д) гипогликемией

05.22. Постоянство кислотно-основного состояния преимущественно поддерживается:

- А) синовиальной жидкостью
- Б) лимфатической жидкостью
- В) почками и легкими
- Г) костной тканью
- Д) миокардом и скелетными мышцами

05.23. Показатель pO_2 отражает:

- А) общее содержание кислорода в крови
- Б) связанный с гемоглобином кислород
- В) фракцию растворенного кислорода
- Г) насыщение гемоглобина кислородом
- Д) доставку кислорода тканям

05.24. Фракция конъюгированного билирубина в крови превалирует при :

- А) внутрипеченочном холестазае

- Б) посттрансфузионном гемолизе
- В) физиологической желтухе новорожденных
- Г) синдроме Жильбера
- Д) внутрисосудистом гемолизе

05.25. Больной 25 лет, поступил в клинику в коматозном состоянии. В выдыхаемом воздухе запах ацетона. Наиболее вероятный диагноз:

- А) сахарный диабет 1 типа
- Б) сахарный диабет 2 типа
- В) алкогольная интоксикация
- Г) передозировка наркотиков
- Д) острая печеночная недостаточность

05.26. В дифференциальной диагностике абсолютного и относительного (перераспределительного) дефицита железа поможет определение :

- А) железа сыворотки крови
- Б) общей железосвязывающей способности
- В) коэффициента насыщения трансферрина железом
- Г) содержание ферритина
- Д) эритроцитарных индексов (MCV, MCH, MCHC, RDW)

05.27. Содержание гликированного гемоглобина является показателем:

- А) качества контроля гликемии
- Б) качества контроля развития атеросклероза
- В) развития нефропатии
- Г) развития ретинопатии
- Д) развития сердечно-сосудистых осложнений

05.28. Метод турбидиметрического измерения основан на:

- А) измерении прошедшего света через дисперсную среду
- Б) измерении интенсивности излученного в процессе анализа света мутными средами
- В) измерении интенсивности отраженного в процессе анализа света мутными средами
- Г) измерении показателя преломления отраженного в процессе анализа света мутными средами
- Д) измерении изменения угла вращения отраженного в процессе анализа поляризованного света мутными средами)

05.29. Флуориметрия основана на :

- А) измерении угла преломления света
- Б) измерении вторичного светового потока
- В) поглощении электромагнитного излучения веществом
- Г) рассеивании света веществом

Д) измерения угла вращения света

05.30. В основе метода ПЦР лежит:

- А) синтез молекулы ДНК на матрице РНК
- Б) многократный копияный синтез определенного фрагмента ДНК
- В) сшивание фрагментов ДНК
- Г) разрезание молекулы ДНК
- Д) синтез белка

05.01	05.02	05.03	05.04	05.05	05.06	05.07	05.08	05.09	05.10
В	Б	Г	В	В	Б	А	Г	В	Г

05.11	05.12	05.13	05.14	05.15	05.16	05.17	05.18	05.19	05.20
Д	Б	А	Д	А	Г	В	А	Б	Б

05.21	05.22	05.23	05.24	05.25	05.26	05.27	05.28	05.29	05.30
Б	В	В	А	А	А	А	А	Б	Б

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

Литература к главе 1:

1. Федеральный закон от 21.11.2011 N 323-ФЗ (ред. от 03.07.2016) «Об основах охраны здоровья граждан в Российской Федерации».
2. Сергеев Ю.Д. Основы медицинского права России
Медицинское информационное агентство, 2016, – 416 с.
3. PubMed [Электронный ресурс]. – Электрон. база данных. – Режим доступа: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
4. Сайт кафедры клинической лабораторной диагностики РМАПО <http://www.labdiag.ru>.
5. Обеспечение безопасности в клинико-диагностических лабораториях: справочное пособие. – М.: Лабора, 2006. – 336 с.

Литература к главе 2:

6. Гудер ВГ., Нарайанан С., Виссер Г., Цавта Б. Диагностические пробы: от пациента до лаборатории. М., Лабора, 2010.
7. Клиническая лабораторная диагностика. Национальное руководство. Т.1, 2. Под ред. В.В. Долгова, В.В. Меньшикова. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2012.
8. Кишкун, А.А. Клиническая лабораторная диагностика: учебное пособие. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2010.
9. Кишкун А.А. Справочник заведующего клинико-диагностической лабораторией [Текст]. – М. : ГЭОТАР-Медиа, 2010. – 704 с.
10. Клинико-лабораторные аналитические технологии и оборудование: учеб. пособие / под ред. В.В. Меньшикова. – М.: Академия, 2007.
11. Клиническое руководство Тица по лабораторным тестам. М. Лабора, 2013.
12. Мошкин А.В., Долгов В.В. Обеспечение качества в клинической лабораторной диагностике. М.: Медиздт, 2004.
13. Руководство по лабораторным методам диагностики: учеб. пособие для системы послевузовского профессионального образования врачей /

Ассоциация медицинских обществ по качеству (М.); ред. А.А. Кишкун. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2007.

Литература к главе 3:

14. Луговская С.А., Почтарь М.Е. Гематологический атлас. М.-Тверь, Триада. 2011, С. 368.

15. Луговская С.А., Почтарь М.Е., Долгов В.В. Гематологические анализаторы. Интер-претация анализа крови: методические рекомендации. М. – Тверь, 2007. – 122 с.: ил.

16. Долгов В.В., Луговская С.А., Морозова В.Т., Почтарь М.Е., Лабораторная диагностика анемий. – М. – Тверь, 2009, 148 с.

17. Луговская С.А., Морозова В.Т., Почтарь М.Е., Долгов В.В. Лабораторная гематология 3-е изд. – М. : Триада, 2014.

18. Хоффбранд В., Дж. Петтит., Гематология. Атлас-справочник: пер. с англ. – М.: Практика, 2007.

Литература к главе 4:

19. Долгов В.В., Шабалова И.П., Миронова И.О., Джангирова Т.В., Коротаев А.Л. Выпотные жидкости. Лабораторное исследование. – М. – Тверь: Триада, 2006.

20. Долгов, В.В., Луговская С.А., Фанченко Н.Д. и др. Лабораторная диагностика мужского бесплодия. – М. – Тверь: Триада, 2006.

21. Миронова И.О., Романова Л.А., Долгов В.В. Общеклинические исследования: моча, кал, ликвор, мокрота. – М. – Тверь: Триада, 2012.

22. Миронова И.И., Романова Л.А. Атлас осадков мочи. М. – Тверь: 2009, 171с., 653 ил.

23. В.Т. Морозова, И.И. Миронова, Р.Л. Марцишевская, Л.А. Романова. Копрологические синдромы. Лабораторная диагностика патологии пищеварительной системы

Литература к главе 5:

- 24.** Биомаркеры в лабораторной диагностике. Под ред. В.В. Долгова, О.П. Шевченко, А.О. Шевченко. М.: Триада», 2014. 288 с.
- 25.** Долгов В.В., Селиванова А.В. Биохимические исследования в клинико-диагностических лабораториях ЛПУ первичного звена здравоохранения. Спб. Витал Диагностикс СПб, 2006, 231 с.
- 26.** Долгов В.В., Шевченко О.П., Шарышев А.А., Бондарь В.А. Турбидиметрия в лабораторной практике. – М.: Реафарм, 2007. 176 с.
- 27.** Долгов В.В., Эммануэль В.Л., Ройтман А.П. Лабораторная диагностика нарушений водно-электролитного обмена., 2012, – М.: Триада, 120 с.
- 28.** Иммунохимический анализ в лабораторной медицине. Учебное пособие / Под. ред. В.В. Долгова / – М. – Тверь: Триада, 2015, 408 с.
- 29.** Кишкун, А.А. Клиническая лабораторная диагностика: учебное пособие. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2010.