

СПРАВОЧНИК

Лабораторные методы исследования в клинике

Под редакцией
профессора В.В.Меньшикова



МОСКВА „МЕДИЦИНА“
1987

ББК 53.4

М51

УДК 616-074/-078:061.6

В. В. МЕНЬШИКОВ, Л. Н. ДЕЛЕКТОРСКАЯ, Р. П. ЗОЛОТНИЦКАЯ,
З. М. АНДРЕЕВА, А. С. АНКИРСКАЯ, И. С. БАЛАХОВСКИЙ,
Д. В. БЕЛОКРИНИЦКИЙ, С. Д. ВОРОПАЕВА, Е. Н. ГАРАНИНА,
Т. И. ЛУКИЧЕВА, Н. Г. ПЛЕТНЕВА, А. Я. СМОЛЯНИЦКИЙ

Составители: *Л. Н. Делекторская*, докт. мед. наук, зав. Всесоюзным научно-методическим и контрольным центром по лабораторному делу МЗ СССР при I ММИ им. И. М. Сеченова; *Я. П. Золотницкая*, канд. мед. наук, сотрудник того же института.

Рецензенты: *В. А. Макаров*, докт. мед. наук, зав. лабораторией патологии гемостаза ЦНИИГиПК; *Ю. И. Ткач*, доцент, зав. кафедрой клинической лабораторной диагностики Украинского института усовершенствования врачей.

Лабораторные методы исследования в клинике:
М51 Справочник/Меньшиков В. В., Делекторская Л. Н.,
Золотницкая Р. П. и др.; Под ред. В. В. Меньшикова.—
М.: Медицина, 1987,—368 с.: ил.

В справочнике представлены основы лабораторной аналитики: правила проведения и оценка лабораторных анализов, контроль качества исследований. Описаны унифицированные методы исследования биологических материалов: мочи, мокроты, кала, экссудатов и трансудатов, спинномозговой жидкости, а также желудочной секреции; исследования крови, в том числе и системы гемостаза. Подробно изложены методы клинической биохимии, иммунологии и микробиологии. Исследования описаны по единой схеме: принцип метода, реактивы, оборудование, ход исследования, показатели у здоровых людей, оценка надежности метода. Книга предназначена врачам-лаборантам и врачам различных специальностей.

4109000000—268

039 (0.)—87

ББК 53.4

ПРЕДИСЛОВИЕ

Клинический потенциал лабораторной диагностики имеет три источника. Патофизиология и патобиохимия предоставляют сведения об изменениях химического и клеточного состава биологических жидкостей при патологических состояниях организма. Физика, химия, биология являются источником методических приемов для выявления и количественного определения компонентов биологических жидкостей, а тесное взаимодействие с клинической медициной позволяет проверить на практике реальную диагностическую ценность теоретических представлений и аналитические качества лабораторных методов исследования. Рациональное использование этих методов позволяет строить стратегию и тактику получения лабораторной информации о состоянии организма и применять ее в интересах диагностики болезней, а также контроля за лечением больных.

Опубликованное в 1982 г. издательством «Медицина» «Руководство по клинической лабораторной диагностике» было посвящено преимущественно теоретическим и клинико-диагностическим аспектам лабораторной медицины. Настоящий справочник имеет своей целью осветить современное состояние клинической лабораторной аналитики.

Одним из направлений научно-технического прогресса в клинической медицине 60—80-х годов стало ускоренное развитие методов и средств клинической лабораторной диагностики. В результате активного восприятия достижений физики, химии, молекулярной биологии значительно повысились исследовательские возможности во всех разделах деятельности клинических лабораторий: клинической биохимии, гематологии, иммунологии, микробиологии, токсикологии, паразитологии, возник ряд новых разделов лабораторной аналитики.

Применение новых препаративных и измерительных приборов и готовых аналитических форм существенно повышает надежность результатов лабораторных исследований, уменьшает трудовые затраты лабораторных работников. Внедрение микрометодов в клиническую биохимию, иммунологию, паразитологию, предусмотренное постановлением ЦК КПСС и Совета Министров СССР от 1982 г. «О дополнительных мерах по улучшению охраны здоровья населения», является новым шагом в совершенствовании клинической лабораторной диагностики. Значительное расширение круга методов лабораторной диагностики имеет и обратную сторону. В условиях, когда известны десятки методов исследования одного и того же компонента биологической жидкости, лаборатории нередко бывает трудно выбрать оптимальный метод. Влияние случайных обстоятельств может привести к разному в методах, применяемых

в различных лабораториях, и затруднить сопоставление результатов исследований, проведенных одному и тому же пациенту в различных лабораториях. Чтобы избежать негативных последствий стихийного выбора методов, начиная с 1968 г. в лабораторной службе здравоохранения проводится унификация методов исследования.

Одна из задач данного справочника — систематизированное описание методов исследования, наиболее приемлемых для практических лабораторий. Значительная часть приводимых методов являются унифицированными, и применение их в лабораториях лечебно-профилактических учреждений предписано приказами Министерства здравоохранения СССР: № 290 от 11.04.72 г. «Об унификации клинических лабораторных методов исследования», № 960 от 15.10.74 г. «Об унификации клинических лабораторных методов исследования», № 250 от 13.03.75 г. «Об унификации методов определения чувствительности микроорганизмов к химиотерапевтическим препаратам», № 558 от 08.06.78 г. «Об унификации микробиологических методов исследования при туберкулезе», № 1175 от 21.11.79 г. «Об унификации клинических лабораторных методов исследования». Год издания приказа об унификации методов указан в тексте в скобках рядом с описанием этого метода.

Описание методов также в различных разделах по возможности унифицировано. Оно содержит наименование исследуемого компонента, принцип метода исследования, перечень необходимых материалов и оборудования, ход определения, результаты у здоровых людей, клиническое значение результатов исследования. Описание метода содержит сведения, позволяющие его воспроизвести в условиях лаборатории с достаточно высокой степенью надежности результатов. Вслед за описанием метода или группы методов приводятся ссылки на работы, содержащие существенную дополнительную информацию.

Естественно, что в зависимости от специфики методических приемов между разделами справочника существуют понятные различия в описаниях методов. Так, в разделе «Методы клинической иммунологии» значительное внимание уделяется приготовлению материалов для исследования.

Настоящая книга адресована не только работникам лабораторий. Полезный справочный материал найдут в ней и клиницисты, по заданию которых выполняются лабораторные исследования.

Хотя представленные описания методов исследования и не исчерпывают всего методического арсенала, накопленного клинической ла-

бораторной диагностикой, тем не менее их перечень отражает сферу возможных действий современной лаборатории крупного лечебно-профилактического учреждения. К сожалению, рамки данного издания не позволяют привести описание методов клинической паразитологии и токсикологии.

Авторский коллектив справочника представлен преимущественно сотрудниками I Московского медицинского института им. И. М. Сеченова, на базе которого уже 15 лет действует Всесоюзный научно-методический и контрольный центр по лабораторному делу Министерства здравоохранения СССР. В подготовке 1-го раздела участвовали доктора медицинских наук И. С. Балаховский, Л. Н. Делекторская, В. В. Меньшиков и кандидат биологических наук Е. Н. Гаранина, 2-го раздела — кандидат медицинских наук Н. Г. Плетнева, 3-го раздела — кандидат медицинских наук Р. П. Золотницкая,

4-го раздела — кандидат медицинских наук А. Я. Смолянцкий, 5-й раздел подготовлен докторами медицинских наук И. С. Балаховским, Л. Н. Делекторской, В. В. Меньшиковым, 6-й раздел — кандидатом медицинских наук Д. В. Белокрыницким, 7-й раздел — докторами медицинских наук С. Д. Воропаевой, З. М. Андреевой, кандидатом медицинских наук А. С. Анкирской.

Авторы справочника — опытные специалисты в соответствующих отраслях клинической лабораторной диагностики, что позволило обеспечить необходимый профессиональный уровень отбора и описания лабораторных методов исследования.

Тем не менее как набор методов исследования, так и характер их описания открыты для обсуждения читателями, мнения которых будут с вниманием встречены авторами, составителями и редактором этой книги.

В. В. МЕНЬШИКОВ,

*лауреат Государственной премии СССР,
заслуженный деятель науки РСФСР, профессор*

Раздел 1

ОСНОВЫ ЛАБОРАТОРНОЙ АНАЛИТИКИ

1.1. ПРИНЦИПЫ УНИФИКАЦИИ И СТАНДАРТИЗАЦИИ КЛИНИЧЕСКИХ ЛАБОРАТОРНЫХ МЕТОДОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

Унификация клинических лабораторных методов исследования означает научно обоснованный выбор и внедрение в практику работы клиничко-диагностических лабораторий единых аналитических процедур, в наибольшей мере удовлетворяющих современному уровню развития медицинской науки и потребностям практики, обеспечивающих надежность и сопоставимость результатов диагностических исследований, выполняемых в различных лабораториях.

Унификация клинических лабораторных методов в нашей стране проводится в соответствии с системой унификации, утвержденной приказом Министерства здравоохранения СССР в 1971 г. Система включает следующие этапы: анализ литературы по методам исследования определенного вещества, сравнение методов-кандидатов, выбор методов в соответствии с изложенными ниже критериями, обсуждение предлагаемого метода на Комиссии по унификации и контролю качества клинических лабораторных методов исследования. Унифицированный метод отрабатывается экспериментально, проводится оптимизация условий его определения, после чего методы публикуются в виде специальных выпусков «Унификация клинических лабораторных методов исследования». Они рассылаются в клиничко-диагностические лаборатории и научно-исследовательские институты с целью испытания рекомендуемых методов и получения отзывов на них. Длительная проверка метода и его экспериментальная отработка — необходимые условия точного воспроизведения методов в клиничко-диагностических лабораториях.

Система унификации методов — это непрерывный, динамичный процесс, позволяющий совершенствовать методические приемы. В работе по унификации методов участвует широкий круг специалистов, ученых, практических работников лабораторий.

В основе выбора унифицированного метода лежат аналитические, медицинские и технико-экономические критерии, что позволяет учитывать достижения в области лабораторной диагностики, современный уровень развития методологии, а также практические возможности клиничко-диагностических лабораторий, без чего невозможно реальное внедрение унифицированных методов в практику.

К аналитическим критериям относятся: специфичность, правильность, воспроизводимость,

чувствительность. Преимущество должно отдаваться методу, имеющему наиболее высокие аналитические показатели. Однако, учитывая, что унифицированные методы предназначены для работы в практических лабораториях, выбор метода не может основываться только на аналитических критериях.

Вторую группу критериев, имеющих медицинский характер, составляют: диагностическая значимость показателей с учетом применения выбранного метода; длительность процесса анализа по отношению к допустимым срокам установления диагноза; способ взятия материала для исследования, например кровь из вены или пальца; количество биологического материала, необходимого для исследования. Например, при диспансеризации населения большим преимуществом является возможность получения крови не из вены, а из пальца. Время, которое требуется для выполнения анализа и получения лабораторной информации клиничстами, должно быть сопоставимо с допустимыми сроками установления диагноза, с темпом развертывания патологического процесса, вытекающими отсюда сроками принятия диагностического и лечебного решения. В этом плане иммуноферментные (гомогенные) исследования по медицинским критериям имеют преимущество перед другими методами, так как позволяют получить результат за несколько минут.

Среди критериев технико-экономического характера выделяют: расход рабочего времени на производство одного исследования; стоимость реактивов и доступность их широкому кругу практических лабораторий; влияние реактивов на здоровье исследователя, их токсичность и канцерогенность; наличие необходимых для исследования аппаратуры и приборов; достаточная квалификация исполнителя лабораторного исследования; возможность адаптации метода к автоанализаторам. Появление этой группы критериев обусловлено массовым применением методов клинической лабораторной диагностики. В масштабе страны предпочтительнее выбирать более экономичные методы при прочих равных условиях.

При выборе унифицированных методов предпочтение следует отдавать микрометодам. Постановлением ЦК КПСС и Совета Министров СССР от 19.08.82г. «О дополнительных мерах по улучшению охраны здоровья населения» предус-

мотрено развитие медицинского микроанализа, в том числе фотометрического, иммуноферментного и радиоиммунологического.

Приказами министра здравоохранения СССР «Об унификации клинических лабораторных методов исследования» до 1984 г. утверждены в качестве унифицированных около 300 методов.

Унификация методов способствует повышению качества работы лабораторий, улучшению сопоставимости результатов исследования, обеспечивает рационализацию лабораторного обследования, повышает эффективность работы лабораторий в диагностическом и экономическом отношении, способствует более быстрому и организованному внедрению научных достижений в лабораторную практику и улучшению материально-технического оснащения лабораторий (разработка готовых аналитических форм реактивов, составление перечня оборудования для клинико-диагностических лабораторий, разработка контрольных материалов, адаптация методик к автоанализаторам, осуществление

межлабораторных экспериментов по контролю качества). Кроме того, унификация методов является этапом для перехода к более высокой ступени — стандартизации методов.

Принципы стандартизации клинических лабораторных методов исследования предусматривают разработку ряда научных проблем, касающихся системы единых требований к методу и направленных на улучшение аналитических качеств метода и сравнимости результатов исследования. К первоочередным проблемам стандартизации методов относятся: стандартизация аналитических качеств метода или оценка аналитической надежности метода, разработка референтных методов, требований к сравнению методов, разработка требований к построению калибровочных кривых, составление требований к характеристике метода, унификация терминологии, стандартизация единиц измерения, разработка требований к стандартным и калибровочным материалам. Решение перечисленных проблем создает теоретические основы стандартизации методов.

1.2. ОСНОВНЫЕ ПРАВИЛА ПРОВЕДЕНИЯ ЛАБОРАТОРНЫХ АНАЛИЗОВ

1.2.1. Подготовка рабочего места и реактивов

Для каждой методики должно быть подготовлено рабочее место, на котором собраны нужные реактивы и посуда. Пипетки устанавливаются в пробирках, которые стоят в штативах; на каждой пробирке (или гнезде штатива) делают надпись, для какого реактива или операции пипетка предназначается: например, «Цветной реактив» или «Отсасывание надосадочной жидкости». На флаконы с реактивами приклеивают этикетки с названиями реактивов и датами приготовления. Очень удобно на рабочем месте иметь пропись методики, написанную так, что каждая новая процедура начинается с новой строки. После окончания анализа посуду и реактивы убирают, чтобы освободить рабочую поверхность стола для других работ.

Налаживание методики — один из самых ответственных этапов лабораторной работы, он начинается после того, как выбран метод, адекватный задачам лечебного учреждения и возможностям лаборатории (см. раздел 1.1). Прежде всего надо выписать прописи всех реактивов и переписать методику, пронумеровав рабочие процедуры по порядку. Когда реактивы готовы, приступают к анализу калибровочных проб, по данным которых строят калибровочный график. Если он получился линейным и результаты воспроизводимы, можно переходить к исследованию биологического материала.

В некоторых методах рекомендуют проводить расчет по результатам исследования одной калибровочной пробы, используя правило пропорций. Однако и в этом случае при налаживании методики, а также при смене реактивов и длительном перерыве в работе желательно построить калибровочный график, захватываю-

щий как нормальные, так и патологические величины.

Удобнее и проще всего налаживать методику при наличии готового набора реактивов нужного качества заводского изготовления; в лаборатории остается только приготовить растворы согласно заводской инструкции. Однако таких наборов часто нет или они оказываются слишком дорогими и приходится использовать реактивы, полученные из разных источников, при этом иногда точно неизвестно, соответствуют ли они по качеству требованиям данной методики. Это наиболее сложный этап налаживания методики, во время которого приходится проявлять определенную гибкость, не опасаясь в случае необходимости взяться за проверку качества, а если надо, то и за очистку и синтез некоторых простейших соединений.

Посуду, в которой выполняются анализы, — пробирки или пенициллиновые флакончики — не надо надписывать карандашом по стеклу, так как такие надписи потом трудно удалить, кроме того, карандаш по стеклу при нагревании расползается и надпись терется. Лучше всего пронумеровать гнезда в штативе и работать так, чтобы анализ пробы с определенным номером всегда выполнялся в одном и том же гнезде. Для этого все образцы биологического материала, поступившие в этот день в клиническую биохимическую лабораторию для исследования, нумеруют подряд и в дальнейшем всю работу выполняют под номерами. Если же возникает необходимость надписывать пробирки или колбы, используемые во время анализа, можно это сделать, обычным мягким карандашом, предварительно обработав участок посуды наждачной бумагой.

На образовавшийся участок матовой поверхности хорошо ложится обычный графито-

вый карандаш, надпись не расплывается, но легко удаляется обычной резинкой.

Подавляющее большинство анализов можно с равным успехом проводить как в пробирках, так и в пенциллиновых флакончиках, однако флакончики удобнее, так как могут стоять на столе без штатива и легко закрываются пробками.

1.2.2. Мытье посуды

Чтобы анализ был успешным, посуда должна быть чисто вымыта, причем для разных исследований требования к чистоте посуды и, следовательно, способы мытья неодинаковы. Наиболее широко распространена обработка стеклянной посуды хромовой смесью, или, как ее сокращенно называют, хромпиком. Для ее приготовления в большую фарфоровую ступку насыпают кристаллы оихромата калия ($K_2Cr_2O_7$) и растворяют с концентрированной серной кислотой, постепенно увеличивая ее количество, так, чтобы раствор был насыщенным. Смесь должна иметь красноватый оттенок и нагреваться, если ее налить в мокрую посуду. Когда хромпик приобретает зеленый цвет и перестает нагреваться, это будет означать, что его способность к окислению органических соединений исчерпана, в связи с чем он не может более применяться для мытья посуды. Хромовую смесь наливают в колбы, цилиндры и т. д. или погружают в нее более мелкие предметы — пипетки, флакончики и т. п. Перед тем как обрабатывать посуду хромпиком, надо тщательно удалить все видимые на глаз загрязнения, в том числе надписи карандашом по стеклу. В противном случае хромовая смесь быстро портится, но, главное, при взаимодействии с органическим веществом могут образовываться ядовитые пары и выделяться тепло, что таит в себе опасность взрыва.

Хромовая смесь — очень едкий реактив: он прожигает одежду, а попадая на кожу, вызывает ожоги. Поэтому, если возможно, лучше пользоваться менее едкими средствами — содой, мылом, стиральным порошком. Если посуду моют, погружая ее в моющие-растворы, то сначала надо удалить грязь и надписи с внешней поверхности и вымыть ее теплой водой с мылом; если надписи сделаны стеклографом (карандашом по стеклу), их удаляют ватой, смоченной в органическом растворителе (хлороформ, эфир и т. д.). Грязь на внешней поверхности не только портит моющие растворы, но и может попасть с ними на внутреннюю поверхность посуды.

Каждый способ мытья посуды имеет свои преимущества и недостатки; он должен быть адекватен тому виду анализа, для выполнения которого посуда предназначается, поэтому желательно всегда использовать один и тот же комплект посуды. Мытье хромпиком обеспечивает степень чистоты, достаточную практически для всех видов лабораторных клинических работ, но способ этот трудоемок и требует соблюдения мер предосторожности. Стиральные порошки безопаснее и работать с ними проще, но надо иметь в виду, что они прочно адсорбируются на стекле и могут быть удалены только при

многократном промывании посуды водой. Для каждого вида анализов надо отработать адекватный — не слишком трудоемкий, но достаточно надежный метод мытья, убедиться, что он не искажает результаты исследования и всегда пользоваться одним и тем же моющим средством. Какие-либо однозначные советы тут дать трудно, так как поступающие в продажу стиральные порошки, помимо основного детергента — алкилсульфоновых кислот, содержат различные добавки, а разные сорта стекла по-разному выщелачиваются и адсорбируют моющие средства.

Надо постоянно заботиться также о чистоте той посуды, которую не моют перед каждым анализом (пипетки и флаконы для реактивов). Иногда вновь приготовленную порцию реактива можно налить во флакон, в котором еще сохранились остатки предыдущей порции этого же реактива, но, как правило, остатки выливают и флакон моют с хромпиком. Делают это потому, что существует угроза развития грибов и микробов, для которых многие реактивы оказываются если не идеальной, то подходящей средой. Мытье флаконов с хромпиком и высушивание в горячем сушильном шкафу хотя и не обеспечивают полную стерильность, но значительно уменьшают микробную обсемененность и способствуют лучшей сохранности реактивов. То же относится и к пипеткам, которыми реактивы отмеривают.

1.2.3. Приготовление реактивов и проверка их чистоты

Теоретически совершенно чистых реактивов не существует, в каждом препарате есть какое-то количество примесей. Практически важно только, чтобы они не препятствовали данному анализу. В связи с тем что разные партии могут содержать различные примеси, не всегда оговоренные в стандарте на данный реактив, может оказаться, что одна партия для конкретного вида исследования пригодна, а другая непригодна, хотя обе имеют одинаковую квалификацию. По этой причине следует с определенной осторожностью решать, что препарат такой-то квалификации для данного исследования непригоден. Некоторые способы проверки пригодности реактивов и их очистки приведены в соответствующих разделах справочника.

Приготовление реактива начинается с взвешивания. Надо готовить такое его количество, которое может быть израсходовано за месяц (самое большое — за 2 мес), но в то же время навеска не должна быть менее 20—30 мг, так как иначе точное взвешивание весьма осложняется. При приготовлении калибровочных растворов в прописях обычно указывают круглые числа, например 100 мг или 0,2 ммоль, которые должны быть растворены в 50 или 100 мл растворителя. Если реактив дефицитен или навеска мала, удобнее точно взвесить то количество реактива, которое сразу же попало на весы: допустим, вместо 10 мг взять 9,3 мг и растворить их в меньшем количестве воды (в данном случае не в 100 мл, а в 93 мл). Растворы обычно отмерива-

ют с помощью мерной посуды — мерных колб и цилиндров, но иногда бывает удобно взвесить растворитель на весах, особенно если нужно отмерить большие и некруглые количества (например, 1450 мл). Это часто оказывается точнее, чем отмеривание нескольких объемов; не надо только забывать, что относительная плотность многих растворов отлична от 1.

Часто в прописях используют понятие «процентный раствор»; оно не совсем точно, поэтому в настоящем справочнике везде приведены соответствующие разъяснения. Строго говоря, процент — это одна сотая часть среди качественно одинаковых частей. Поэтому когда говорят о 3 % растворе, формально следует понимать такой раствор, в 100 г которого содержится 3 г данного вещества и 97 г каких-то других составных частей. Однако в химической литературе иногда неправильно называют процентным такой раствор, в 100 мл которого содержится 3 г данного вещества. Молярные растворы действительно готовят так, чтобы 1 л содержал столько-то молей растворенного вещества; этот принцип неправильно распространяют и на процентные растворы.

Иногда используют понятие «объемные проценты», которое предполагает, что данный раствор получен путем смешивания А объемов растворенного вещества и 100-А объемов растворителя. В связи с тем что при смешивании жидкостей суммарный объем смеси обычно меняется, такой способ выражения нельзя считать удачным. Правильнее обозначать соотношение частей знаком «двоеточие» (:). Так, запись «вода : спирт : ацетон 1:2:3» означает, что данная смесь получена путем смешивания 1 объема воды, 2 объемов спирта и 3 объемов ацетона.

Растворы с точными концентрациями, особенно калибровочные и буферные, надо готовить в мерных колбах; мерные цилиндры можно использовать только при отсутствии высоких требований к точности. Некоторые работники, пытаясь сэкономить время, при приготовлении раствора насыпают навеску непосредственно в мерную колбу, растворяют ее там и доводят объем до метки. Так можно поступать лишь в исключительных случаях, так как мерная посуда значительно дороже немерной, а когда насыпают вещество через узкое горлышко, а затем перемешивают и нагревают для растворения, колбу легко разбить.

Навеску вещества растворяют в широкогорлой колбе или в химическом стакане в количестве растворителя, которое составляет от 30 до 80 % окончательного объема, а затем переливают в мерную колбу, споласкивают посуду, в которой готовили раствор, новой порцией растворителя, добавляют его в мерную колбу, а затем уже доводят объем до метки.

1.2.4. Отмеривание растворов, взвешивание, центрифугирование

Для отмеривания растворов применяют пипетки различных конструкций (в том числе автоматические) и дозаторы. Наиболее перспек-

тивны автоматические пипетки со сменными наконечниками для фиксированных или изменяемых объемов. В такой пипетке имеется поршень, при перемещении которого засасывается или выдавливается определенный объем воздуха, в результате чего в сменный наконечник пипетки сначала засасывается, а затем вытесняется оттуда определенный объем жидкости. Существуют автоматические пипетки с тремя или большим числом наконечников, которые по существу представляют собой несколько пипеток, объединенных в один блок, с единой системой управления, так что одновременно заполняются или опорожняются несколько наконечников. Это позволяет ускорить розлив реактивов.

Автоматический дозатор представляет собой поршень с цилиндром, который через систему клапанов соединен с резервуаром реактива и наконечником. За один рабочий ход дозатор заполняет рабочий цилиндр реактивом, а за второй выпускает отмеренную порцию через наконечник. Заполнение и опорожнение цилиндра может производиться либо вручную, либо с помощью электропривода. Аналогично дозатору устроен и дилютер, который отличается лишь тем, что сначала через наконечник засасывает определенный объем разводимой жидкости (обычно сыворотки), а затем через тот же наконечник выпускает больший объем разводящей жидкости (реактива), при этом происходит разведение и перемешивание.

При отмеривании растворов стеклянной пипеткой с делениями нижний мениск жидкости должен быть на уровне соответствующего деления пипетки, которую располагают строго вертикально. Пипетку заполняют и опорожняют с помощью резиновой груши или шприца, соединенного с пипеткой резиновой трубкой. Недопустимо засасывать растворы ртом, так как при этом в рот могут попасть ядовитые жидкости, слюна же почти неизбежно попадает в пипетку, а из нее в реактивы и опытные пробы.

После того как пипетка заполнена с помощью резиновой груши, ее можно отсоединить, закрыть отверстие пипетки пальцем и осторожно выпускать раствор, но при соответствующем навыке удобнее регулировать вытекающие объемы жидкости, надавливая на грушу. Оправдывает себя и такая система, когда пипетка вертикально укреплена в штативе Бунзена, а с помощью другой лапки на том же штативе укреплены шприц или резиновая груша. Перемещая поршень шприца, можно заполнять пипетку и выпускать нужные порции реактива.

Сухие вещества для приготовления реактивов взвешивают на аналитических, аптечных или технических весах, работа с которыми описывается в соответствующих заводских инструкциях и специальных руководствах. Заметим только, что аналитические весы должны быть установлены на капитальных стенах по возможности дальше от нагревательных и отопительных приборов, а также шахт лифтов; устанавливает и юстирует весы метрологическая служба, которая выдает соответствующий документ (паспорт). Необходимо систематически проверять разновесы и делать об этом запись в паспорте.

Взвешивание — вполне надежная процедура, которая, как правило, не служит источником ошибок, однако и здесь необходимы тщательность и определенный навык.

Лабораторные центрифуги могут иметь два типа роторов: угловые и с подвесными стаканчиками; часто одна и та же центрифуга снабжается несколькими сменными роторами, рассчитанными на разное количество пробирок. В угловом роторе гнезда для пробирок неподвижные, расположены под углом около 45° как во время установки пробирок, так и во время вращения, поэтому граница осадка идет косо, что затрудняет отсасывание последних порций надосадочной жидкости.

В роторе с подвесными стаканчиками до начала вращения пробирки стоят вертикально, а во время вращения располагаются гори-

зонтально, поэтому осадок ложится точно на дно пробирки и его граница строго перпендикулярна длинной оси. Это облегчает количественное отделение осадка от надосадочной жидкости, однако если осадок неплотный, то вследствие толчков при остановке центрифуги может образоваться муть.

Каждая центрифуга обязательно снабжается прочным защитным кожухом, крышка которого должна быть закрыта во время работы. Если пробирка длиннее, чем гнездо ротора, она мешает крышке закрываться. У неопытных работников возникает искушение включать центрифугу с открытой крышкой; этого делать ни в коем случае нельзя, так как под действием центробежной силы пробирка может сломаться и осколки стекла с большой силой разлететься и поранить окружающих.

1.3. ЕДИНИЦЫ СИ В КЛИНИЧЕСКОЙ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКЕ

В 1960 г. Генеральная конференция по мерам и весам приняла Международную систему единиц — СИ (Systeme Internationale—SI) как единую универсальную систему для всех отраслей науки, техники и производства. Стандарт СЭВ СТ СЭВ 1052-78 «Единицы физических величин» предусматривает введение Международной системы единиц в странах — членах СЭВ с 1980 г. XXX сессия Всемирной ассамблеи здравоохранения, состоявшаяся в 1974 г., рекомендует применять СИ во всех областях медицины, включая практическое здравоохранение. В основу СИ (табл. 1) положена метрическая система. Название системы происходит от греческого слова «метрон», что означает — мера. СИ состоит из единиц трех типов: основных (7), дополнительных (2), производных (табл. 2).

Т а б л и ц а 1. Основные единицы СИ

Величина	Единица		
	наименование	обозначение	
		международное	русское
Длина	метр	m	м
Масса	килограмм	kg	кг
Время	секунда	s	с
Сила электрического тока	ампер	A	А
Термодинамическая температура	кельвин	K	К
Количество вещества	моль	mol	моль
Сила света	кандела	cd	кд

Дополнительные единицы — радиан и стерадиан.

Производные единицы образуются из основных в соответствии с правилами Международной системы единиц. Сочетая две или более

Т а б л и ц а 2. Примеры производных единиц СИ

Величина	Единица		
	наименование	обозначение	
		международное	русское
Площадь	квадратный метр	m ²	м ²
Объем, вместимость	кубический метр	m ³	м ³
Давление	паскаль	Pa	Па
Удельный объем	кубический метр на килограмм	m ³ /kg	м ³ /кг
Массовая концентрация	килограмм на кубический метр	kg/m ³	кг/м ³
Плотность	килограмм на кубический метр	kg/m ³	кг/м ³
Молярная концентрация	моль на кубический метр	mol/m ³	моль/м ³
Моляльность (растворенного компонента)	моль на килограмм	mol/kg	моль/кг
Активность катализатора (фермента)	моль в секунду	mol/s	моль/с
Скорость химической реакции	моль в секунду на кубический метр	mol/(s·m ³)	моль/(с·м ³)

основных единиц, путем умножения или деления можно получить производные единицы.

Сочетание основных единиц для образования производных иллюстрирует одно из основных преимуществ СИ. Внутри системы нет ни одного коэффициента перевода, кроме 1. Поэтому такая система называется когерентной (согласован-

Таблица 3. Множители и приставки для образования десятичных кратных и дольных единиц и их наименований

Множитель	Приставка	Обозначение приставки		Множитель	Приставка	Обозначение приставки	
		международное	русское			международное	русское
10 ¹⁸ 10 ¹⁵ 10 ¹²	экса пета тера	Е Р Т	Э П Т	10 ⁻¹ 10 ⁻²	деци санти	d с	д с
10 ⁹ 10 ⁶ 10 ³	гига мега кило	G M k	Г М к	10 ⁻³ 10 ⁻⁶ 10 ⁻⁹ 10 ⁻¹²	милли микро нано пико	м μ п р	м мк н п
10 ² 10 ¹	гекто дека	h da	г да	10 ⁻¹⁵ 10 ⁻¹⁸	фемто атто	f a	ф а

ной) системой. Некоторым производным единицам даны специальные названия — паскаль, ньютон, джоуль и др. Единицы СИ, как основные, так и производные, могут быть для практических целей неудобными по размерности. Поэтому в табл. 3 приводятся 16 приставок, при помощи которых возможно образование десятичных кратных и дольных единиц.

Наряду с единицами СИ допускается применение ряда единиц без ограничения срока наравне с единицами СИ, в том числе тонна, минута, час, сутки, литр. Другая группа единиц, не принадлежавших СИ, была принята Генеральной конференцией по мерам и весам для использования на ограниченный период времени: мм рт. ст., калория и др.

В клинической лабораторной диагностике Международную систему единиц рекомендуется применять в соответствии со следующими правилами.

1. В качестве единиц объема следует применять литр. Не рекомендуется в знаменателе применять дольные или кратные от литра (1 мл, 100 мл).

2. Концентрация измеряемых веществ указывается как молярная (моль/л) или как массовая концентрация (г/л).

3. Молярная концентрация используется для веществ с известной относительной молекулярной массой. Ионная концентрация указывается в виде молярной.

4. Массовую концентрацию используют для веществ, относительная молекулярная масса которых неизвестна.

5. Плотность указывается в г/л; клиренс — в мл/с.

6. Активность ферментов на преформированное количество веществ по времени и объему выражается как моль/(с-л); мкмоль/(с-л); нмоль/(с-л).

При переводе единиц массы в единицы количества вещества (молярные) коэффициент пересчета $K = \frac{1}{M_r}$, где M_r — относительная молекулярная масса. При использовании данной формулы получаются следующие единицы количества вещества.

Исходная единица массы	Соответствующая единица количества вещества (молярная)
грамм (г)	моль (моль)
миллиграмм (мг)	миллимоль (ммоль)
микрограмм (мкг)	микромоль (мкмоль)
нанограмм (нг)	наномоль (нмоль)

1.4. ОЦЕНКА АНАЛИТИЧЕСКОЙ НАДЕЖНОСТИ КЛИНИЧЕСКИХ ЛАБОРАТОРНЫХ МЕТОДОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

Качество результата лабораторного исследования зависит от многих факторов (качества реактивов, оборудования, квалификации лаборантов), важное значение имеет также и качество метода. Для объективной оценки аналитических качеств метода рекомендуется оценка его аналитической надежности.

В отличие от системы контроля качества работы лабораторий, которая должна давать ежедневную информацию о качестве получаемых в лаборатории результатов, оценка аналитической надежности метода — продолжительный процесс, во время которого постепенно накапливается информация об аналитических качествах метода. При оценке надежности метода задача состоит в выявлении погрешностей, зависящих от метода; поэтому важно оценку

надежности метода проводить не в одной, а в нескольких точно работающих (референтных) лабораториях с соблюдением всех указаний по применению метода.

Количественные аналитические методы клинических лабораторных исследований разнообразны и используются для определения различных веществ, поэтому описываемые способы оценки надежности метода могут быть пригодны не для всех методов. Оценке аналитической надежности должны подвергаться методы, рекомендуемые для официального утверждения, новые и существенно модифицированные методы.

Основными критериями, по которым оценивается метод, являются следующие: воспроизводимость, правильность, специфичность, чувствительность.

1.4.1. Воспроизводимость

Воспроизводимость результатов — соответствие результатов повторных определений в одном и том же материале. Воспроизводимость не имеет числовой величины, она определяется степенью разброса результатов. Воспроизводимость аналитического метода определяется воспроизводимостью результатов, полученных этим методом.

Понятие, обратное воспроизводимости, — разброс результатов, или аналитическая вариация, зависит от наличия случайных погрешностей и может быть охарактеризовано количественно. В зависимости от условий определения различают аналитическую вариацию в серии, во времени и межлабораторную. Воспроизводимость метода зависит от случайных погрешностей, обусловленных количеством процедур метода (осаждение, центрифугирование, пипетирование), а также стабильностью окрашенного комплекса и другими причинами. Воспроизводимость рассчитывают либо по двум параллельным результатам при исследовании различных образцов, либо по результатам повторных определений на одном и том же контрольном материале в течение не менее 20 дней, следующих друг за другом. Контрольный материал должен быть стабильным в течение всего периода проверки. Можно использовать пригодный слитый биологический материал.

Статистическим показателем разброса результатов является среднеквадратическое отклонение S и относительный показатель разброса результатов — коэффициент вариации V . Сравнивают аналитическую вариацию метода с помощью F -теста.

$$X = \frac{\sum_{i=1}^n X}{n}; \quad S = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (X - \bar{X})^2}{n-1}};$$
$$S = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n d^2}{n}}; \quad V = \frac{S}{\bar{X}} \cdot 100\%; \quad F = \frac{S_1^2}{S_2^2},$$

где X — результат отдельного определения; \bar{X} — средняя арифметическая; $\sum_{i=1}^n$ — знак суммирования; d — разница между параллельными определениями; n — число определений; S — среднеквадратическое отклонение; V — коэффициент вариации; F — тест оценки вариации методов.

Воспроизводимость определяют на разных уровнях концентрации — нормальном и патологическом. Это позволяет более полно охарактеризовать воспроизводимость метода на всем диапазоне измеряемых концентраций. Чем меньше коэффициент вариации, тем выше воспроизводимость результатов, получаемых тем или иным методом.

Такой способ оценки воспроизводимости позволяет объективно оценивать и сравнивать воспроизводимость различных методов.

1.4.2. Правильность

Правильность результатов — соответствие среднего значения результатов повторных определений одного и того же материала должной (номинальной) величине. Правильность не имеет числовой величины, она определяется неправильностью.

Правильность метода определяется правильностью результатов, полученных этим методом, и зависит от наличия систематических погрешностей метода. Систематическая погрешность метода может быть обусловлена рядом причин: неспецифичностью метода или неправильным способом построения калибровочной кривой, использованием калибровочного материала недостаточной степени чистоты, неправильной постановкой холостой пробы и т. д.

Статистическим критерием правильности является средняя арифметическая (X) и степень ее отклонения от должного (номинального) значения. Способами определения правильности могут быть следующие.

Способ добавки — внесение в биологическую жидкость точно взвешенного количества анализируемого вещества и определение его с помощью исследуемого метода.

Способ смешивания проб — биологическая жидкость с низкой и с высокой концентрацией исследуемого вещества смешивается в различных соотношениях.

Способы добавки и смешивания проб (последний может быть применим в методах определения активности ферментов, где невозможно использовать способ добавки) не всегда позволяют определить систематическую погрешность метода. Например, добавленное количество креатинина, определенное по реакции Яффе, может дать хороший процент выявления, однако методы, основанные на реакции Яффе, дают неправильные результаты за счет низкой специфичности метода. Процент выявления вещества, равный 90—110, считается удовлетворительным для клинических лабораторных методов.

Исследование контрольного материала с известным содержанием компонентов — наиболее простой способ оценки правильности. Однако он может быть использован только для быстрой ориентировочной оценки правильности метода. Обязательным условием, ограничивающим возможности этого способа, является использование метода, который указан в аннотации к контрольному материалу. Процедура изготовления контрольного материала, хранение его, вид используемой сыворотки могут в значительной степени изменить истинное содержание компонента. Особенно большим изменениям могут подвергнуться ферменты.

Сравнение методов. Наиболее информативным способом является способ сравнения методов, который позволяет определять общую систематическую погрешность метода.

Смысл сравнения методов состоит в сравнении результатов, полученных методом-кандидатом (т. е. методом, правильность которого исследуется) и сравнительным методом, который должен давать правильные результаты. Поэтому крайне важную роль играет правильность метода, используемого для сравнения. Оптимальным для этих целей является применение референтного метода.

Референтный (эталонный) метод — это метод, обладающий максимальной специфичностью, правильностью и воспроизводимостью результатов определения без учета экономических затрат. Он служит главным образом для сравнения методов при оценке аналитической надежности унифицированных и других методов. Однако референтные методы могут быть недоступны лабораториям, и для определения ряда компонентов они еще не разработаны. Поэтому в качестве сравнительных могут использоваться методы, правильность которых исследована и результаты не дают существенного отклонения от истинных величин.

Для более точной оценки правильности метода-кандидата сравнение методов следует проводить в соответствии с правилами сравнения методов. Эти правила предусматривают точное соблюдение всех письменных указаний по применению метода, проведение исследований под контролем качества с применением единого контрольного материала для гарантии стабильности условий исследования. В сравниваемых методах должны быть проверены точность и линейность калибровочных кривых, по возможности применяться одни и те же реактивы, приборы, работа должна проводиться с одними и теми же лабораториями. Правильность метода оценивается на всем диапазоне измеряемых концентраций, поэтому рекомендуется исследовать образцы с низкими, нормальными и повышенными концентрациями вещества. Сравнение методов можно проводить на контрольном материале и на биологическом материале, полученном от больных и здоровых лиц; очень важным является выбор метода для сравнения.

1.4.3. Статистическая оценка правильности результатов

Статистическая обработка результатов состоит в оценке степени совпадения результатов, полученных методом-кандидатом и сравнительным методом. Ниже приводится статистический способ оценки результатов сравниваемых методов, не требующий специальной вычислительной техники и позволяющий судить о правильности метода-кандидата.

Для оценки правильности определяются достоверность различий результатов и наличие статистической связи.

Определение достоверности различий результатов. Для этого применяют тест Стьюдента:

$$\frac{\bar{X} - \bar{Y}}{\sqrt{m_x^2 + m_y^2}}$$

где \bar{X} , \bar{Y} — средние арифметические результатов сравниваемых методов; m_x — ошибка средней арифметической.

Наиболее достоверные результаты тест Стьюдента дает при нормальном распределении результатов. Поэтому в тех случаях, когда распределение результатов не является нормальным или вид распределения невозможно определить из-за малого числа наблюдений, рекомендуется использовать непараметрические критерии статистики — критерий знаков, тест Вилкоксона (F. Wilcoxon).

Преимуществом непараметрических критериев является их независимость от вида распределения результатов и простота расчета. Критерий знаков эффективен при большом числе определений. Он учитывает не степень различий в каждой паре, а лишь их направленность (знак) и основан на подсчете числа разностей между результатами X и F со знаком $+$ или $-$.

Если число наблюдений невелико и критерий знаков не выявил различий, целесообразно применить критерий T — парный критерий Вилкоксона. Критерий T более чувствителен, чем критерий знаков. Заключение строят на достигнутом уровне значимости.

Для целей лабораторной диагностики достаточен уровень значимости $p = 0,05$. Полученные значения сравнивают с табличными. Если $p < 0,05$, то различия между методом-кандидатом и сравнительным методом достоверны, т. е. метод-кандидат имеет систематическую ошибку. Если $p > 0,05$, то различия на достигнутом уровне значимости недостоверны, т. е. метод-кандидат может быть правильным. Дальнейшая обработка результатов состоит в оценке статистической связи.

Для оценки статистической связи можно использовать корреляционный метод и метод регрессии. Корреляционный метод менее информативен, чем метод регрессии. Корреляция указывает на степень связи двух рядов чисел, т. е. изучается зависимость между результатами X и Y двух методов. Для определения корреляции рассчитывают линейный коэффициент корреляции r и коэффициент ранговой корреляции r_s при расчете которого результаты оценивают порядковыми номерами — рангами от меньших результатов к большим. Порядковый номер каждого результата является его рангом.

Формула расчета коэффициента корреляции:

$$r = \frac{\sum_{i=1}^n (X - \bar{X}) \cdot (Y - \bar{Y})}{\sqrt{\sum_{i=1}^n (X - \bar{X})^2 \cdot \sum_{i=1}^n (Y - \bar{Y})^2}}$$

где X , Y — результаты отдельных определений; \bar{X} , \bar{Y} — средние арифметические каждого ряда определений; $(X - \bar{X})$, $(Y - \bar{Y})$ — отклонения каждого из определений от средней арифметической.

Формула расчета коэффициента ранговой корреляции:

$$\rho = 1 - \frac{6 \cdot \sum_{i=1}^n (r_X - r_Y)^2}{n(n^2 - 1)}$$

где r_X , r_Y — ранги ряда „ X “, „ Y “; n — число пар сравниваемых величин; $\sum_{i=1}^n$ — знаксуммирования.

Коэффициенты корреляции могут колебаться от 0 до +1 при положительной корреляции и от 0 до -1 — при отрицательной корреляции.

При хорошем совпадении результатов сравниваемых методов значение r будет около 1 (0,9—0,99). Чем ниже величина коэффициента корреляции, тем меньше степень совпадения результатов сравниваемых методов. При отсутствии связи между результатами $r=0$. Если корреляция отрицательна, при изменении результатов группы X результаты группы Y будут изменяться в противоположном направлении.

Метод регрессии. Если корреляция указывает на степень связи, то регрессия позволяет определить, как количественно меняется один результат по мере изменения другого. Для построения эмпирической линии регрессии на диаграмму наносят парные результаты в виде точек: на оси абсцисс — сравнительного метода, на оси ординат — метода-кандидата. Диаграмма дает первое представление о типе связи между двумя методами. При линейной регрессии точки располагаются вокруг прямой линии. Если регрессия нелинейна, то требуется дальнейшая доработка метода-кандидата, т. е. он непригоден для целей лабораторной диагностики.

Линейную регрессию рассчитывают по формуле:

$$y = a + vx,$$

где x — результаты сравнительного метода; y — результаты метода-кандидата; a — значение y при x , равном 0; v — коэффициент пропорциональности или регрессии.

Если a статистически отличается от 0, то метод-кандидат имеет систематическую погрешность по отношению к сравнительному методу. Эта ошибка может быть приемлемой и неприемлемой.

1.4.4. Специфичность

Аналитическая специфичность метода — способность метода измерять лишь тот компонент или те компоненты, для определения которых он предназначен. Низкая специфичность приводит к получению неправильных результатов и должна быть указана в описании метода. Оценка специфичности не имеет завершения, поскольку любое вещество может повлиять на результаты. Для оценки аналитической специфичности следует использовать примеси, которые, исходя из химической структуры, являются

репрезентативными представителями тех групп веществ, которые с физиологической точки зрения имеют практическое значение.

Интерференция в отличие от неспецифичности обусловлена влиянием веществ на ход реакции. Способ влияния (повышение, понижение) и степень влияния могут быть различными.

Важным аспектом этой проблемы является интерференция лекарств. Лекарственные вещества в зависимости от вида, дозы, способа применения могут воздействовать на результаты лабораторных исследований различными путями: различают фармакологическую интерференцию в организме и техническую интерференцию в ходе выполнения анализа.

Низкая специфичность, интерференция снижают правильность метода. Поэтому предпочтительнее следует отдавать более специфичным методам и свободным от интерференции!

1.4.5. Чувствительность

Аналитическая чувствительность метода определяется его способностью выявлять наименьшие различия между двумя концентрациями исследуемого вещества. В процессе калибровки устанавливается диапазон линейности калибровочной кривой, что является частью аналитической характеристики метода. В диапазоне линейности аналитическая чувствительность определяется наклоном калибровочной кривой.

Нижний предел чувствительности метода — это концентрация исследуемого вещества, которая соответствует наименьшему результату определения, статистически достоверно отличающемуся от показателей холостой пробы. Нижний предел чувствительности метода может быть охарактеризован количественно.

Практически определить нижний предел чувствительности для фотометрических методов можно следующим образом: проводят многократное исследование (не менее 20) холостой пробы и проб с низкой концентрацией анализируемого вещества и устанавливают с заданным уровнем значимости статистически достоверные различия между результатами холостой и опытной проб с низким значением анализируемого вещества, которое и будет количественно соответствовать нижнему пределу чувствительности метода.

Экспериментально установлено, что обычно нижний предел чувствительности в фотометрических методах равен среднему значению холостой пробы плюс 3 средних квадратических отклонения ($X+3S$).

1.4.6. Принципы определения допустимых погрешностей результатов лабораторных исследований

Проблемы, связанные с повышением аналитической надежности результатов лабораторных исследований, направлены не только на улучшение их аналитических качеств, но и на повышение диагностической информативности лабора-

торных тестов. В этом основной смысл работы, которая проводится в области лабораторной аналитики. Однако будет неправильно и экономически не оправдано стремиться к необоснованной, наибольшей точности результатов лабораторных исследований. Необходимый уровень точности, соответствующий клиническим целям, или допустимый предел погрешности результатов лабораторных исследований должен быть установлен на научной основе.

Общая погрешность результатов, анализа, получаемая количественными аналитическими методами, зависит от наличия систематической погрешности, характеризующей неправильность, и случайной погрешности, характеризующей аналитическую вариацию (разброс).

П р и н ц и п ы определения допустимой аналитической вариации базируются на следующем. Прежде всего должна быть установлена аналитическая вариация метода, что позволит реально оценить разброс результатов, получаемых тем или иным методом. Далее величину полученной аналитической вариации сравнивают с биологической вариацией. Смысл такого сравнения состоит в определении степени влияния аналитической вариации на биологическую, тем самым определяется степень влияния аналитической вариации на расширение диапазона нормальных или референтных величин.

Соотношение между различными видами вариации определяется следующим уравнением:

$$S_{\text{общ}}^2 \pm S_{\text{ан}}^2 + S_{\text{биол}}^2,$$

где $S_{\text{общ}}^2$ — общая вариация; $S_{\text{ан}}^2$ — аналитическая вариация; $S_{\text{биол}}^2$ — биологическая вариация.

Биологическая вариация имеет два источника: внутрииндивидуальная и межиндивидуальная вариации:

$$S_{\text{биол}}^2 = S_{\text{межинд}}^2 + S_{\text{внутринд}}^2.$$

Установлено, что при отношении $S_{\text{ан}}$ к $S_{\text{биол}}$ меньше 0,4 влияние аналитической вариации на общую будет незначительным.

Существуют и другие способы определения соотношения аналитической и биологической вариаций. Например, по D. Tonks (1968), коэффициент вариации метода не должен превышать 1/8 области нормальных пределов в процентах от средней величины нормы. При этом нормальные величины рассматриваются как совокупность аналитической и биологической вариаций.

Следовательно, для достижения точности, необходимой для клинических целей, важна не только величина аналитической вариации, но и ее соотношение с биологической вариацией. Степень же биологической вариации определяется физиологической ролью веществ в организме. В связи с этим можно выделить группу веществ, имеющих наилучшую гомеостатическую регуляцию, т. е. имеющих наименьшую биологическую вариацию. К ним относятся такие вещества, как натрий, хлор, общий белок, калий. Результаты определения таких веществ

должны соответствовать наибольшей точности; Более высокая степень биологической вариации обнаруживается у веществ, участвующих в процессах анаболизма. К этой группе веществ относятся глюкоза, холестерин. Наибольшую биологическую вариацию имеют вещества, являющиеся конечными продуктами катаболизма, — мочевина, мочевая кислота, креатинин и вещества, выделяющиеся из тканей, например лактатдегидрогеназа, аминотрансферазы и др. К точности определения веществ этой группы предъявляются менее высокие требования, так как указанные вещества в норме имеют широкую биологическую вариацию.

Таким образом, во всех случаях при расчете допустимых пределов погрешности метода индивидуально для каждого вещества устанавливаются необходимая точность или допустимые пределы ошибок. Каждое вещество в конечном счете исследуется для определенных клинических целей — установления диагноза, контроля за лечением, обследования здоровых. В зависимости от поставленной цели будут меняться и требования к точности результатов. Поэтому окончательный критерий в оценке допустимой погрешности должен основываться на определении влияния аналитической вариации на диагностическую информативность результатов анализа, т. е. носить медицинский характер. Медицински допустимые пределы погрешностей в различных клинических ситуациях будут различными; например, при повторном исследовании лабораторного показателя у одного и того же больного медицински допустимые пределы погрешности будут более строгими — они включают внутрииндивидуальную и аналитическую вариации изо дня в день. При диспансеризации здоровых наибольшее значение для разделения нормы и патологии будет иметь межиндивидуальная вариация, при этом медицинские требования к точности могут быть снижены.

Для оценки медицински допустимых пределов погрешностей может быть использован опрос мнений врачей-клиницистов и лабораторных работников [Меньшиков В. В., Делекторская Л. Н., 1980; Barnett R., 1968, 1977]. С этой целью лечащие врачи для определенного вида патологии, например сахарного диабета, устанавливают концентрацию исследуемого компонента (глюкозы) выше верхнего предела нормальных значений, за пределами которого начинается, по их мнению, определенный вид патологии (сахарный диабет), например для глюкозы в сыровотке крови — 110 мг/100 мл (18 мг/100 мл — 1 ммоль/л) при верхнем пределе нормы 90 мг/100 мл.

Величина, превышающая верхний предел нормальных значений (20 мг/100 мл в нашем примере) является мерой медицински допустимого отклонения. Эту величину можно использовать для расчета медицинского допустимого коэффициента вариации и последующего его сравнения с аналитической вариацией, получаемой при определении тех же компонентов. Если 110 мг/100 мл в приведенном примере являются средней величиной (\bar{X}), полученной на основании ответов лечащих врачей, то 20 мг/100 мл

характеризуют медицински допустимый разброс, который при 95 % доверительной вероятности можно принять за 2S, следовательно, в приведенном примере S равно 10 мг/100 мл. Отсюда величина медицински допустимой аналитической вариации, выраженной в V, равна:

$$\frac{10}{110} \cdot 100 \approx 9\%.$$

Определение медицински допустимых пределов погрешностей позволит в ряде случаев, не добываясь большей точности, чем она требуется в определенных клинических обстоятельствах, тем самым избежать увеличения расходов на Проведение анализов.

Количественная характеристика аналитических качеств метода и определение допустимых пределов погрешностей метода направлены на повышение диагностической значимости, экономической эффективности лабораторных тестов.

Ниже приведены допустимые пределы аналитической вариации в процентах для ряда веществ, принятые рабочей группой экспертов стран — членов СЭВ по научной разработке и унификации методов и средств клинической лабораторной диагностики.

Клиническая биохимия

Адреналин	7	Креатинин	5
Алаанинаминотрансфераза	7	Креатинкиназа	7
Альбумин	3	Лактатдегидрогеназа	7
а-Амилаза	10	Лейцинаминопептидаза	10
Аммиак	5	Липиды общие	5
Аспаратамино-трансфераза	7	Магний	2
Белок общий	3	Медь	5
Белковые фракции	8	Мочевая кислота	7
Билирубин	10	Мочевина	7
Глюкоза	5	Натрий	7
Глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназа	8	Норадреналин	7
у-Глутамилтранс-пептидаза	10	Триглицериды	7
Железо	5	Фосфор	5
Иммуноглобулины	7	Фосфатаза щелочная -	7
Калий	2	Хлор	7
Кальций	2	Холинэстераза	7
Кортнзол	7	Холестерин	7

Гематология

Гемоглобин	2
Гематокрит	3
Лейкоциты	10
Эритроциты	10

1.5. КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА КЛИНИЧЕСКИХ ЛАБОРАТОРНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

1.5.1. ВнутрILAбораторный контроль качества

Контрольные материалы. Прямой контроль качества в лаборатории невозможен, так как истинная величина исследуемого компонента в пробе больного неизвестна. Однако точность и правильность техники анализа можно контролировать, исследуя пробы специального контрольного материала. Такие образцы биологических препаратов, именуемые в зависимости от их квалификации стандартными, эталонными, контрольными и т. п., имеют ряд преимуществ перед другими способами контроля. Как правило, их можно изготовить в относительно больших количествах, что позволяет применять их сразу во многих лабораториях, обеспечивая в течение длительного времени единство измерения. Кроме того, образцы готовят идентичными анализируемым веществам, что уменьшает погрешности, обусловленные несоответствием образцов и анализируемых проб. К настоящему времени разработано несколько видов контрольных материалов: слитая сыворотка (замороженная или лиофилизированная, приготовленная в лаборатории), сыворотка, изготовленная промышленным путем с неисследованным и с исследованным содержанием компонентов.

Приготовление слитой сыворотки. Клиническая лаборатория каждый день собирает остатки сыворотки от проб больных с целью контроля качества. Количество нормальной и патологической контрольной сы-

воротки, необходимое на день работы (от 10 до 30 мл каждой), находится в зависимости от объема работы лаборатории.

Этапы приготовления сыворотки: остающуюся от ежедневных проб сыворотку от больных сливают и хранят в пластиковых бутылках при -20°C . Последующие порции сыворотки сливают на замороженную смесь прямо в бутылку. Гемолизированную, желтушную, липемическую и загрязненную сыворотку, а также сыворотку больных с подозрением на гепатит отбрасывают.

За 2 нед перед розливом сыворотку оттаивают при комнатной температуре, тщательно перемешивают стеклянной палочкой или при помощи магнитной мешалки. Слив центрифугируют при 3000 об/мин в течение 10—20 мин в нескольких удобных бутылках для оседания фибрина, который может присутствовать (ие подвергать действию света). Сыворотку фильтруют и разливают в соответствии с ежедневной потребностью (по 3, 5, 10, 15 мл) в пузырьки и плотно укупорируют. Хранят пузырьки в вертикальном положении при -20°C . Этот слив можно использовать как нормальную контрольную сыворотку для биохимических исследований.

Контроль воспроизводимости (метод контрольных карт. Установление контрольных пределов). После приготовления контрольной сыворотки устанавливают содержание в ней различных компонентов. В связи с тем что невозможно получить одну и ту же величину для каждого компонента из-за изменчивости лабораторных результатов, определяют допустимую

область, или контрольные пределы исследований. Для этого каждый компонент, исследуемый в лаборатории, определяют в контрольной сыворотке 20 раз в течение 2–3 нед.

Полученные результаты подвергают статистическому анализу на каждый компонент по следующей схеме:

- 1) определение средней (А) и среднеквадратического отклонения (S);
- 2) исключение сомнительных значений с помощью критерия Т или если они попали за пределы $X \pm 2S$;
- 3) перерасчет средней и среднеквадратического отклонения;
- 4) определение контрольных пределов $X \pm 2S$.

Приготовление контрольных карт. После установления статистических параметров строят карту контроля качества, откладывая на оси абсцисс дни исследования, а на оси ординат — концентрацию компонента в соответствующих единицах. Через середину ординаты параллельно абсциссе проводят прямую (она означает среднюю и обозначается \bar{X}), а

вверх и вниз от средней и параллельно ей проводят (в соответствии с масштабом) прямые, которые обозначают $+1S$, $+2S$, $+3S$, $-1S$, $-2S$ и $-3S$ (см. пример построения контрольной карты для определения хлоридов).

Каждый результат, полученный при исследовании контрольного материала той же серии в последующие дни, отмечается на карте в виде точки и служит для оценки воспроизводимости лабораторных исследований.

Интерпретация результатов контрольных исследований. 95% аналитических результатов исследования контрольной сыворотки должны находиться внутри контрольных пределов, т. е. результаты 19 из 20 анализов должны оказаться внутри $X \pm 2S$, причем результаты должны распределяться примерно с одинаковой частотой на каждой стороне от линии средней.

Контрольная карта дает возможность в очень наглядной форме своевременно выявить и предотвратить ошибки в выполнении методики и тогда, когда результаты анализов контроля не выходят за принятые границы.

Построение контрольной карты для определения хлоридов

Дата	\bar{X}	$X - \bar{X}$	$(X - \bar{X})^2$
01.01.75	98	2	4
02.01.75	102	2	4
03.01.75	100	0	0
04.01.75	101	1	1
05.01.75	95	5	25
06.01.75	105	5	25
07.01.75	101	1	1
08.01.75	99	1	1
09.01.75	97	3	9
10.01.75	100	0	0
11.01.75	103	3	9
12.01.75	99	1	1
13.01.75	102	2	4
14.01.75	100	0	0
15.01.75	98	2	4
16.01.75	104	4	16
17.01.75	101	1	1
18.01.75	97	4	16
19.01.75	99	1	1
20.01.75	100	0	0
Всего . . .	2000		122

$$n=20$$

Среднее арифметическое

$$\bar{X} = \frac{2000}{20} = 100 \text{ ммоль/л.}$$

Сумма квадратов отклонений от среднего:

$$\sum(X - \bar{X})^2 = 122.$$

Среднеквадратическое отклонение:

$$S = \sqrt{\frac{\sum(X - \bar{X})^2}{n - 1}} = \sqrt{\frac{122}{19}} = 2,5.$$

Коэффициент вариации:

$$V = \frac{S \cdot 100}{\bar{X}} = 2,5 \%$$

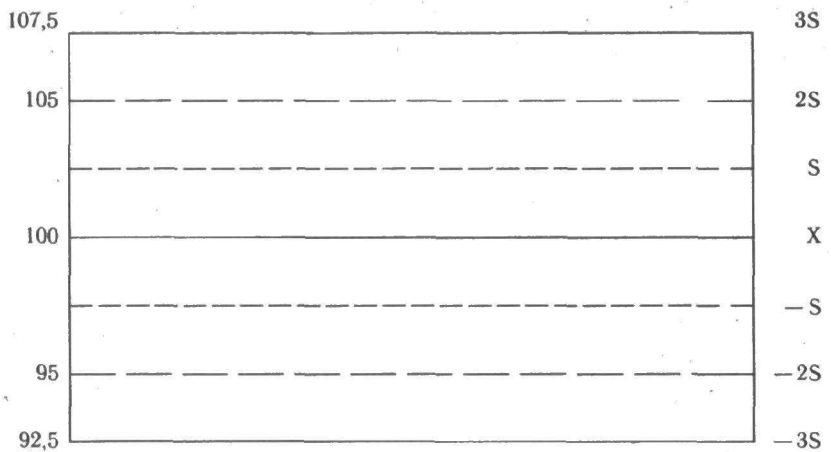
$$\bar{X} = 100 \text{ ммоль/л.}$$

$$\bar{X} + 1S = 100 + 2,5 = 102,5 \text{ ммоль/л.}$$

$$\bar{X} + 2S = 100 + 5,0 = 105,0 \text{ ммоль/л.}$$

$$\bar{X} - 1S = 100 - 2,5 = 97,5 \text{ ммоль/л.}$$

$$\bar{X} - 2S = 100 - 5,0 = 95,0 \text{ ммоль/л.}$$



Ниже приведены характерные примеры предупредительных и контрольных критериев, ориентируясь на которые можно даже без расчетов обнаружить изъяны в работе лабораторий, О недостатках предупреждают следующие признаки:

- а) шесть результатов подряд — по одну сторону от линии средней;
- б) три результата подряд — за пределами одного среднеквадратического отклонения;
- в) один результат — за пределами двух среднеквадратических отклонений;
- г) шесть результатов подряд обнаруживают тенденцию однообразного отклонения по одну сторону от средней.

При наличии этих признаков результаты исследований можно выдавать в клинические отделения, однако необходимо тщательно проверить стандартные или калибровочные растворы, работу измерительных приборов.

При наличии контрольных признаков результаты исследований ставят под сомнение и до исправления недостатков в отделение не выдают. К числу таких признаков относятся следующие:

- а) восемь результатов подряд — по одну сторону от линии средней;
- б) пять результатов подряд — за линией одного среднеквадратического отклонения;
- в) три результата выходят за пределы двух среднеквадратических отклонений;
- г) один результат выходит за пределы трех среднеквадратических отклонений.

Когда аналитическая система функционирует должным образом, результаты контрольной сыворотки не нарушают вышеуказанные статистические правила. Когда распределение результатов нарушает эти правила, то анализ вышел из-под контроля.

Контроль правильности. Кроме слитой сыворотки собственного приготовления, лаборатории могут использовать контрольные сыворотки промышленного изготовления. Эти сыворотки бывают двух видов: с исследуемыми и неисследо-

ванным содержанием компонентов. Сыворотка с исследованным содержанием используется так же, как и неисследованная; различие состоит только в том, что в ней среднюю и среднеквадратическое отклонение определяет производство и все исследованные значения для каждого теста с указанием метода исследования представлены в паспорте, прилагаемом к сыворотке.

Ежедневный анализ контрольной сыворотки с неисследованным содержанием помогает поддерживать на должном уровне сходимость и воспроизводимость исследований. Применение контрольной сыворотки с исследованным содержанием позволяет гарантировать также и правильность результатов, получаемых в лаборатории.

Исследование правильности целесообразно проводить в условиях хорошей сходимости результатов. Контроль правильности осуществляет периодически работник лаборатории в следующих случаях: а) если результаты исследования контрольного материала выходят за пределы $\pm 2S$; б) при налаживании нового метода; в) при использовании новой измерительной аппаратуры, новой партии реактивов и т. д. При этом следует сделать не менее 10 параллельных исследований методом, указанным в инструкции, прилагаемой к контрольной сыворотке. Эти же данные могут быть использованы для оценки сходимости. Контроль правильности должен осуществляться во всем диапазоне прямолинейного хода калибровочного графика. Для этого используют контрольную сыворотку с нормальным и патологическим содержанием Компонентов.

Статистическим критерием правильности исследований является средняя арифметическая (X) и степень ее отклонения от истинного (номинального) значения μ . Для оценки правильности можно использовать также следующие методы:

- 1) метод добавки — внесение в биологическую жидкость точно взвешенного количества анализируемого вещества и последующее его определение;

2) метод смешивания проб — в разных соотношениях смешивается биологическая жидкость с низкой и высокой концентрацией компонентов;

3) метод, использующий биожидкости здоровых людей: изменение нормальных показателей отражает изменение правильности определений. Этот метод особенно ценен для оценки правильности всех компонентов, которые отсутствуют или нестабильны в контрольных пробах.

Удобным способом оценки правильности исследований является карта кумулятивных сумм («сисум»). В отличие от обычной контрольной карты на карте «сисум» откладывают алгебраическую сумму положительных и отрицательных отклонений результатов от их ожидаемой величины. Пока наносимые на карту результаты колеблются около линии постоянного отклонения, правильность исследований под контролем.

Методы, не требующие контрольных материалов. Исследование параллельных проб позволяет оценить воспроизводимость результатов исследований с помощью образцов крови больных. Для этого отбирают 10 случайных проб и каждую пробу исследуют дважды. Результаты таких параллельных анализов используются для характеристики качества исследований.

Пример. Для оценки воспроизводимости результатов подсчета лейкоцитов исследовали в параллельных определениях 10 образцов цельной крови с антикоагулянтном. Результаты представлены в табл. 4.

Таблица 4. Определение воспроизводимости с помощью подсчета количества лейкоцитов в параллельных пробах

№ образца	A	B	A-B	(A-B) ²
1	7970	7400	570	324900
2	9470	9230	240	57600
3	7410	7230	180	32400
4	14820	15410	590	345100
5	3610	4690	1080	1 166400
6	4590	6280	1690	2856100
7	4490	3700	790	624100
*	9980	10870	890	792100
9	14890	14260	630	396900
10	5240	5540	300	90000

$$\sum d^2 = 6\ 688\ 600$$

$$\text{Делим на } 20 = 334\ 430.$$

$$S = \sqrt{\frac{\sum d^2}{2n}}; \quad S = \sqrt{334\ 430} = 578,3.$$

Сначала находят разницу между значениями каждой пары, опуская знаки; затем разницу возводят в квадрат, все складывают и делят на 2n (n — число пар), так как каждая пара представляет собой индивидуальную переменную

и каждый член пары имеет свою собственную вариабельность. Затем рассчитывают средне-квадратическое отклонение различий и строят контрольную карту для оценки воспроизводимости, аналогичную описанной выше для контрольных проб. Разницу между двумя анализами, сделанными для одной и той же пробы, отмечают каждый день на карте. Результаты, попадающие за границы контрольных пределов, с 95 % вероятностью покажут существование каких-то нарушений в аналитической системе. В этом случае выявляют возможную причину большого разброса результатов, и исследование повторяют более тщательно.

Исследование случайной пробы. Метод этот аналогичен предыдущему методу параллельных проб. Разница заключается в том, что вместо анализа всех проб лаборант выбирает исследует повторные пробы (одну или две пробы за неделю). Эти пробы могут быть случайно выбраны заведующим лабораторией без ведома лаборанта. Таким путем заведующий лабораторией оценивает воспроизводимость результатов, получаемых лаборантами.

Исследование повторных проб. Принцип метода состоит в повторном исследовании нескольких случайно выбранных проб. Сравнивая соответствующие пары результатов, получают объективные данные о качестве проведенных исследований. Повторные исследования проб должны проводиться после выполнения анализов текущего дня.

Метод повторных определений дает возможность оценить качество работы аппаратуры и лаборанта во время исследований. Метод может использоваться в любой лаборатории независимо от количества производимых анализов. Недостатком его является невозможность контроля правильности полученных результатов.

Исследование смешанной пробы. При оценке воспроизводимости методом дублированных проб получают более близкие значения, чем обычно получают при наличии случайных ошибок. В методе смешанной пробы это исключено. Метод состоит в следующем: из группы образцов случайно выбирают два — А и В; из каждого образца А и В берут равные объемы и смешивают (образец С); исследуют все три образца (табл. 5).

Таблица 5. Определение воспроизводимости по смешанным пробам

Компонент	A	B	C	$\frac{A+B}{2}$	Различие *
Гемоглобин	12,5	14,2	13,0	13,35	0,35
Гематокрит	47,0	52,0	50,0	49,5	0,5

* Различие между величиной, полученной в смешанной пробе (С), и теоретической величиной $\frac{A+B}{2}$

Использование постоянных величин (констант). Некоторые гематологические показатели у здоровых людей колеблются в незначительных пределах, и эти пределы колебаний используют в целях контроля качества исследований.

Для этого требуется отобрать не менее 11 проб крови здоровых взрослых людей. Пробы считаются нормальными, если отвечают следующим условиям: число эритроцитов — 4×10^6 /л и выше, гематокрит — 36 или выше, эритроциты в мазке — норма; среднее содержание гемоглобина в эритроците (ССГЭ) — 26–32 пг или средняя концентрация гемоглобина в эритроците (СКГЭ) — 32–36 %, определяется также общее содержание гемоглобина. При соблюдении этих условий средние величины (константы) вышеперечисленных параметров в 11 отобранных пробах (или для большего количества проб) должны быть следующими: для ССГЭ — 29–30 пг; для СКГЭ — 32–33 %.

Кроме того, в область $X \pm 2S$ должны входить приблизительно нормальные величины. Контрольную карту готовят с использованием этих пределов.

Для каждой серии проб, содержащей достаточно данных, рассчитывают среднюю арифметическую и среднеквадратическое отклонение; если один из двух параметров окажется вне контроля, то проводят соответствующие мероприятия по выявлению причин ошибок. Метод очень чувствителен даже к небольшим постоянным ошибкам и помогает выявлять слишком суженные нормальные области.

Метод средних нормальных величин (по данным обследования больных) основан на статистическом анализе результатов проб больных. Предполагается, что средняя величина, полученная по данной методике за один день или за определенное время, при большом объеме работы лаборатории (не менее 30 определений) приблизительно постоянна изо дня в день. Если при выполнении анализа будет допущена систематическая ошибка, то это выразится в сдвиге средней величины результатов.

Для построения контрольной карты необходимо в течение 20 дней ежедневно рассчитывать среднюю нормальных величин данного компонента (не менее 16 величин), где нормальную область рассматривают в пределах $X \pm 2S$. Величины, выходящие за эти пределы, отбрасывают. Затем следует рассчитать среднюю арифметическую и среднеквадратическое отклонение средних за 20 дней. Стандартную ошибку средних для группы нормальных величин рассчитывают по формуле:

$$m = \frac{S}{\sqrt{n}},$$

где n — число нормальных величин в группе.

Затем рассчитывают контрольные пределы $X \pm 2m$. Выбор пределов $2m$, а не $3m$ делает метод более чувствительным и увеличивает частоту выявления внеконтрольных величин. После построения контрольной карты ежедневно находят

среднюю арифметическую нормальных результатов данного компонента и откладывают на карте. Чем больше результатов входит в расчет средней, тем более эффективной становится средняя в определении действительной области.

Метод средней арифметической нормальных величин дает возможность обнаруживать ошибки, не выявленные другими методами контроля, и является достаточно эффективным контролем на всех этапах исследования проб больных.

Межлабораторные эксперименты по контролю качества. Лаборатории, систематически участвующие в межлабораторных экспериментах по контролю качества исследований, могут использовать результаты контроля для оценки качества своей работы. Особенно ценными являются долгосрочные контрольные опыты.

1.5.2. Межлабораторный контроль качества

Цель межлабораторного контроля качества: выявление систематических и случайных ошибок при контрольных определениях; достижение сравнимых результатов, получаемых участвующими лабораториями.

Анализ контрольных проб должен включаться в обычный ход работы лабораторий, производиться тем же персоналом, который выполняет повседневные исследования, и принципиально теми же методами, которые лаборатория использует в повседневной практике.

Статистическая обработка результатов исследования участвующих лабораторий. Основная цель статистической обработки — определение пределов выполнения контрольных исследований и выявление систематических и случайных ошибок. Статистическая обработка результатов проводится для выявления погрешностей, допущенных в работе лабораторий, и для оценки сравнимости участвующих лабораторий. Для этого производят следующее.

1. Результаты группируют по методам, используемым для определения того или иного компонента, и по типу системы (ручной или автоматической). Цель — снизить до минимума влияние различия самих методов и иметь возможность сравнения этих методов.

2. В каждой группе рассчитывают: X — среднюю арифметическую величину; S — среднеквадратическое отклонение. Рассчитывают пределы $X \pm 2S$.

3. Применяют метод исключения: все результаты, попавшие за пределы $X \pm 2S$, исключают из дальнейших расчетов, а остальные служат для повторного вычисления новых средней арифметической и среднеквадратического отклонения (X_1 и S_1).

4. Если после повторного пересчета найдутся результаты вне пределов $X_1 \pm 2S_1$, то их также исключают, как и в первый раз. Исключение и пересчет X и S повторяют до тех пор, пока во всем массиве не будет ни одного результата, выходящего за допустимые пределы $X_n \pm 2S_n$.. Вычисленные после окончательного исключения

средняя арифметическая и среднеквадратическое отклонение множества результатов служат для оценки сравнимости всех лабораторий в целом, а также для отдельных лабораторий (в случае, когда используется материал с неисследованным содержанием компонентов).

Пример расчета и исключения результата!

№ п/п	Содержание глюкозы крови, полученное лабораториями в контрольном образце (мг в 100 мл)	№ п/п	Содержание глюкозы крови, полученное лабораториями в контрольном образце (мг в 100 мл)
1	75	14	89,0
2	70	15	72,0
3	34	16	76,0
4	33	17	76,0
5	98	18	83,0
6	82	19	82,0
7	94	20	102,3
8	89	21	99,1
9	76	22	73,6
10	88	23	63,6
11	92	24	103,0
12	86	25	103,5
13	87		

$\bar{X} = 81$; $S = 17,3$; $\bar{X} + 2S = 115,6$; $\bar{X} - 2S = 46,4$. Исключаем два значения: под № 3 и 4, так как они выходят за пределы $\bar{X} \pm 2S$. Снова пересчитываем: $\bar{X}_1 = 85,6$; $S_1 = 11,1$; $\bar{X}_1 + 2S_1 = 107,8$; $\bar{X}_1 - 2S_1 = 63,4$. Результатов, выходящих за пределы $\bar{X}_1 \pm 2S_1$, больше нет; следовательно, исключений далее производить не надо, а вычисленные в последний раз \bar{X}_1 и S_1 можно использовать для дальнейшей оценки результатов.

Оценка отдельных лабораторий. Результаты, полученные из каждой лаборатории, оценивают по отдельным параметрам путем сравнения их значений с допускаемыми пределами $\bar{X} \pm 2S$, рассчитанными для всего множества результатов после окончательного исключения. Критерием оценки могут служить также паспортные данные контрольного материала и результаты референтной лаборатории. По результатам контроля можно определить частоту использования разных методов исследования и сравнить их воспроизводимость.

В настоящее время разработана количественная оценка качества результатов отдельных лабораторий. Для этого результат каждой лаборатории выражают в единицах среднеквадратического отклонения по формуле:

$$IS = \frac{X_{\text{лаб}} - \bar{X}_{\text{множ}}}{S_{\text{множ}}}$$

где IS — индекс среднеквадратического отклонения; $X_{\text{лаб}}$ — результат данной лаборатории; $\bar{X}_{\text{множ}}$ — средняя арифметическая величина, полученная для множества результатов исследуемого компонента после последнего исключения; $S_{\text{множ}}$ — значение среднеквадратического отклонения для множества результатов (после исключения).

Принята следующая градация оценки по величине IS :

- $0 = IS \leq 1$ — результат хороший;
- $1 \geq IS \leq 2$ — результат удовлетворительный;
- $IS > 2$ — результат непригоден.

Например, если при контрольных определениях глюкозы о-толуидиновым методом получены следующие данные: $X_{\text{множ}} = 5,32$ ммоль/л $S_{\text{множ}} = 0,16$ ммоль/л; $X_{\text{лаб}} = 5,66$ ммоль/л (результат в какой-то выборочной лаборатории) то:

$$IS = \frac{5,66 - 5,32}{0,16} = \frac{0,34}{0,16} = 2,1; \quad IS = 2,1,$$

следовательно, результат непригоден.

Чем ближе величина IS к нулю, тем лучше сравнимость лаборатории с другими участниками, тем лучше качество результатов.

Указывая результаты, выраженные в IS для отдельных лабораторий и компонентов, можно классифицировать все участвующие лаборатории по качеству выполнения контрольных исследований.

Метод Юдена. Кроме статистической обработки, возможно графическое изображение результатов межлабораторного исследования, которое позволяет лаборатории сравнить свои данные с результатами референтных лабораторий, а также дает некоторое представление о том, что ошибочно в методике, если результаты непригодны. Для понимания графика не требуется особых статистических расчетов, но для практического его использования каждой лаборатории необходимо определить компонент в двух контрольных образцах (например, А и В). Методика построения графика Юдена представлена на рис. 1. Строят систему координат, на оси абсцисс откладывают действительное значение компонента и интервалы среднеквадратического отклонения ($\pm 2S$) для пробы А, на оси ординат — те же показатели для пробы В. Действительные значения компонентов и сигмы берут из паспорта к контрольному материалу. Если используется контрольный материал с неисследованным содержанием компонентов, в качестве действительных величин используют \bar{X} и S множества после исключений. Из двух точек X и Y , представляющих действительные значения компонента для пробы А и В соответственно, проводят две взаимно перпендикулярные прямые. Из точки пересечения прямых проводят окружность с радиусом, равным $2S$. Прямую линию W проводят под углом 45° через пересечение средних прямых, деля нижний левый и верхний правый квадраты. Две дополнительные линии (S' и t) проводят вдоль периферии круга параллельно прямой W .

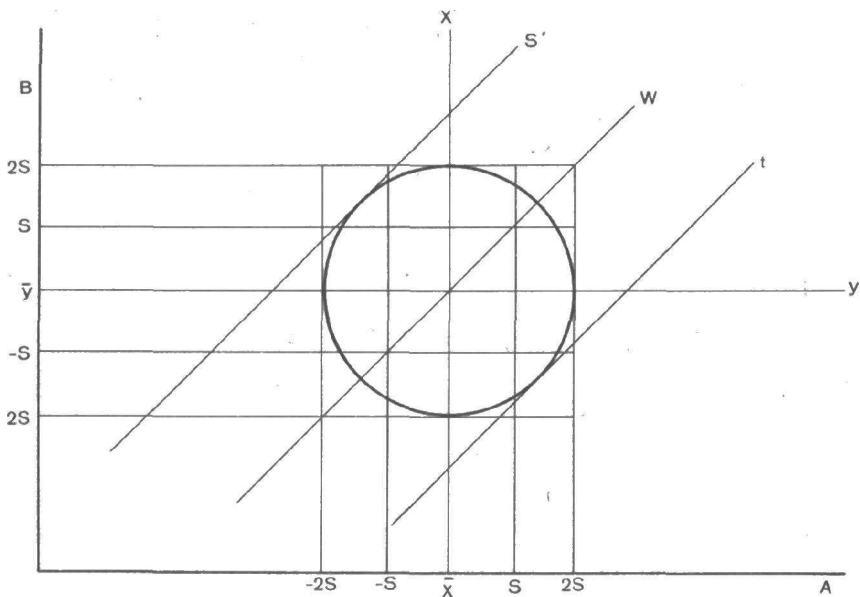


Рис. 1. График Юдена. На оси абсцисс — проба А — контрольная сыворотка А; на оси ординат — проба В — контрольная сыворотка В.

\bar{X} — средняя арифметическая для пробы А; \bar{Y} — средняя арифметическая для пробы В; XX' и YY' — две взаимно перпендикулярные прямые; S — среднеквадратическое отклонение; W — прямая, которую проводят под углом 45° через пересечение прямых XX' и YY' ; S' и t — две касательные к окружности, проведенные параллельно прямой W .

Точки, попавшие в верхний левый и нижний правый квадранты, указывают на случайные ошибки, а попавшие в верхний правый и нижний левый квадранты — на систематические ошибки, допущенные лабораторией при исследовании контрольных проб.

Пары значений для А и В, полученные от каждого участника, наносят в виде точек на график. Если точки попали внутрь окружности, результаты пригодны. Если точки располагаются вне окружности, но между параллельными прямыми, это значит, что лаборатории получили завышенные или заниженные величины для обеих проб и что имеются систематические ошибки. Точки, близкие к прямой W , показывают, что лаборатория работает стабильно. Точки, попавшие в другие секции графика, не дают представления о составе образца и свойственны случайным ошибкам.

Таким образом, график Юдена позволяет наглядно дифференцировать систематические и случайные ошибки, допущенные в работе лабораторий, а также установить, какие лаборатории работают в допустимых пределах.

1.5.3. Особенности контроля качества отдельных видов лабораторных исследований

Различие методических подходов, используемых в различных отраслях клинической лабораторной диагностики, определяет некоторые особенности приготовления контрольных материа-

лов и их использования для контроля качества отдельных видов лабораторных исследований.

Контроль качества исследований мочи. Для контроля правильности и воспроизводимости результатов исследования химического состава мочи используют контрольные материалы, близкие по возможности к образцам мочи пациентов, и контрольные мазки для контроля качества микроскопических исследований осадка мочи. В качестве контрольных материалов используют: водные растворы веществ; слитую мочу с консервантами; искусственные растворы мочи с добавками веществ, исследуемых в моче.

Контрольные препараты для микроскопии осадков мочи должны содержать встречающиеся в моче соли, полиморфные эпителиальные клетки, различные виды цилиндров, лейкоциты, эритроциты, болезнетворные и неболезнетворные бактерии, грибы, животные паразиты. Кроме того, целесообразно иметь препараты с осадками мочи, характерными при некоторых наиболее распространенных заболеваниях.

Приготовление стабильной и активной мочи. К 1 л свежей мочи добавляют 2 г ЭДТА и при тщательном перемешивании приливают 5 мл раствора тимола (100 г тимола на 1 л изопропанола). Через 2 нед мочу центри-

фигурируют для удаления слизи и незначительного количества солей мочевой кислоты. После такой обработки моча становится прозрачной и почти не имеет запаха. Полученный контрольный материал остается стабильным при комнатной температуре несколько лет.

Приготовление контрольных материалов, имитирующих мочу. Раствор № 1: в мерную колбу вместимостью 100 мл вносят 12,2 мл KH_2PO_4 — 0,37 моль/л; 11,6 мл $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,19 моль/л; 5 мл сыворотки с нормальной концентрацией белка; 1 г глюкозы; 0,5 мл ацетона; 0,1 мл гемолизата и вливают до метки дистиллированной воды. Перемешивают до полного растворения. Полученный контрольный материал хранят при -20°C . Стабилен до 3 мес.

Для получения осадка все добавки промывают в холодном изотоническом растворе хлорида натрия с формалином (0,85 г $\text{NaCl} + 10$ мл водного формалина и доводят до 100 мл дистиллированной водой). Фиксацию продолжают в течение ночи, затем центрифугируют и добавляют в контрольный материал. В качестве добавки для формирования осадка мочи используют следующие фиксированные вещества: эритроциты, лейкоциты светлого слоя кровяного сгустка, непатогенные *E. coli*, клетки дрожжей, сперматозоиды, кристаллы цистина (получают путем перекристаллизации из чистого порошка L-цистина), кристаллы трипельфосфатов (берут из проб больных), кристаллы оксалата кальция (берут из проб больных).

Раствор № 2: в мерную колбу вместимостью 2 л вносят хлорид натрия, глюкозу, мочевину и ацетон в количествах, указанных в табл. 6. Приливают 500 мл воды, перемешивают. Микропипеткой вносят 0,2 мл цельной крови с величиной гематокрита от 40 до 45. Для того чтобы добавить 0,8 г сывороточного белка, используют слитую сыворотку от больных или контрольную сыворотку с известным содержанием белка. Необходимо количество сыворотки $X_{\text{сыв}}$ рассчитывают следующим образом:

$$X_{\text{сыв}} = \frac{100 \cdot 0,8}{X_{\text{бел}}},$$

где $X_{\text{бел}}$ — содержание белка в используемой сыворотке.

Если используемая сыворотка содержит 7,5 г белка, то объем сыворотки, содержащий 0,8 г белка, будет равен:

$$\frac{100}{7,5} \cdot 0,8 = 10,7 \text{ мл.}$$

Затем приливают дистиллированную воду до метки и хорошо перемешивают. Для консервации в раствор добавляют 5 мл хлороформа.

Хлороформ является хорошим консервантом для этих контрольных растворов. Другие консерванты могут интерферировать в одной или в нескольких реакциях.

Срок годности раствора — около года.

Таблица 6. Перечень веществ и их концентрация в контрольных растворах

Вещество	Добавляемое количество вещества	Концентрация веществ в контрольном растворе (мг %)	
		в положительном	в отрицательном
NaCl	10 г	—	—
Мочевина	10 »	83 ммоль/л	42 ммоль/л
Глюкоза	1 »	2,775 »	1,48 »
Белок	0,8 »	0,4 г/л	0,2 г/л
Гемоглобин (скрытая кровь)	200 мкл	Реакция положительная	Реакция отрицательная
Ацетон	4 мл	То же	То же

Мочевой контроль для токсикологического исследования. Мочевой контроль для токсикологического исследования можно приготовить следующим образом.

1. Отбирают суточные пробы больных, не курящих и не принимающих лекарств, и собирают слив объемом до 10 л. Хранят при температуре от 4 до 7°C .

2. Фильтруют через стеклянную вату для исключения посторонних примесей.

3. Исследуют часть сливной мочи на наиболее часто применяемые лекарства, которые определяют в лаборатории. Слив используют в случае отрицательной реакции.

4. К сливу мочи добавляют: морфина гидрохлорид, кодеина фосфат, хинина гидрохлорид, метадона гидрохлорид, глутетимид — по 20 мг каждого и 30 мг амфетамина. Перед добавлением в слив глутетимида его нужно растворить в 3 мл абсолютного этанола.

5. Хорошо смешать и разлить по 10—15 мл в пузырьки. Хранить при -20°C . Такие сливы стабильны 8 мес.

6. Для использования в качестве контрольного материала содержимое пузырька оттаивают и исследуют вместе с неизвестными образцами мочи.

Контроль качества гематологических исследований. Для контроля качества определенной гемоглобина применяются следующие компоненты:

1. Стандартный раствор гемоглобина с известной концентрацией.

2. Стерильный раствор гемолизата (консервированная кровь). Для приготовления контрольного раствора необходимо осуществить следующее:

а) отцентрифугировать 200 мл цитратной крови для осаждения клеток, удалить супернатантную плазму;

б) добавить 100 мл дистиллированной стерильной воды и встряхивать смесь на механической мешалке около 30 мин;

в) поставить полученный раствор в глубокую заморозку (не ниже -20°C) на ночь;

г) на следующий день оттаять;

д) снова хорошо перемешать на мешалке 30 мин;

е) слить раствор через фильтр Millipore в стерильный сосуд;

ж) разлить по 1 мл в стерильные пузырьки и заморозить при -20°C .

В целом вся процедура приготовления должна проводиться в стерильных условиях. Стерильный раствор гемолизата стабилен около года. Раствор используют для контроля воспроизводимости исследований гемоглобина.

3. Консервированная кровь с фиксированными клетками крови или раствор с искусственными частицами, имитирующими клетки крови (для контроля качества подсчета клеток крови).

4. Контрольные мазки (окрашенные и неокрашенные) с нормальной и патологической лейкоцитарной формулой (для контроля качества подсчета лейкоцитарной формулы).

Мазки многократно просчитываются квалифицированными специалистами (не менее 20 раз). Из полученных данных рассчитывают статистические критерии определения точности подсчета мазка. Для удлинения срока хранения мазков используют клей БФ-6, который обладает свойством образовывать тонкую прозрачную пленку, герметически приклеивающуюся к поверхности мазка и стекла и предохраняющую препарат от внешних воздействий. Предложена методика приготовления мазков на отмытой рентгеновской пленке, нарезанной по размеру предметного стекла. Мазки, приготовленные таким образом, можно пересылать в конверте, что весьма удобно при проведении межлабораторного контроля качества подсчета лейкоцитарной формулы.

1.5.4. Контроль качества работы лаборантов

Оценка качества работы лаборантов должна быть частью программы внутрилабораторного контроля качества. Могут быть использованы следующие методы: 1) метод, использующий результаты межлабораторного контроля качества; 2) метод дублированных анализов; 3) метод случайных проб; 4) метод разведения; 5) метод, использующий результаты внутрилабораторного контроля качества.

Методы перечислены в порядке возрастания времени, затрачиваемого на каждый метод ведущим лабораторией. Методы 1 и 2 можно использовать почти во всех лабораториях без особых трудностей и больших расходов.

Лаборатории, участвующие в межлабораторных экспериментах по контролю качества исследований, могут использовать результаты контроля для оценки работы лаборантов. Метод зависит от расчета правильности всех определенных, выполненных лаборантами в контрольном материале в течение определенного промежутка времени. Нельзя делать выводы о качестве работы лаборанта на основании одного анализа. Однако если лаборант выполнил 10 или 20 анализов, то есть возможность оценить работу лаборанта на основании аналитических результатов, если истинная величина проб известна.

Среднеквадратическое отклонение лаборатории, рассчитанное контрольным центром, можно рассматривать как отражение способности лаборанта производить правильные анализы. Это особенно верно, когда рассчитывают среднюю арифметическую всех среднеквадратических отклонений для всех тестов. Эта средняя арифметическая может быть названа как комбинированное Среднеквадратическое отклонение (KS). Величину KS рассчитывают за определенный отрезок времени (полгода, год) для каждого лаборанта и дают грубую оценку аналитической способности каждого.

Лаборатории фиксируют результаты анализов контрольных материалов за определенный промежуток времени, идентифицируя каждый тест с именем лаборанта, который выполнял тест. После истечения установленного срока готовят оценочные листы для каждого лаборанта, как показано в табл. 7.

Таблица 7. Результаты исследования контрольной сыворотки лаборантом А за 1 год

Тесты	Результат лаборанта, ммоль/л	\bar{X}	S	S
		внешнего контроля		лаборанта
Натрий	132	132,7	1,7	-0,4
	133	135,3	1,8	-1,3
Калий	3,9	3,81	0,11	+0,8
	4,1	4,11	0,13	-0,1

Комбинированное Среднеквадратическое отклонение за год составляет 0,52. На оценочном листе регистрируют название теста, выполняемого лаборантом, полученный им результат, истинное значение и Среднеквадратическое отклонение, сообщаемое контрольным центром. Из этих величин рассчитывают разницу между истинной величиной и полученной лаборантом и делят на Среднеквадратическое отклонение. Затем рассчитывают комбинированное среднеквадратическое отклонение, которое является средней всех среднеквадратических отклонений. Как видно из табл. 7, лаборант А в первой пробе для натрия получил результат 132 ммоль/л. Средняя величина, сообщаемая контрольным центром, равна 132,7 ммоль/л. Среднеквадратическое отклонение среди участников контроля — 1,7 ммоль/л. Чтобы рассчитать 5 лаборанта А, нужно решить следующее уравнение:

$$\frac{132-132,7}{1,7} = -0,4.$$

Число, полученное в последнем столбце, показывает, что величина, полученная лаборантом А, на 0,4 единицы S меньше истинной величины (если допустить, что средняя контроля есть истинная величина). Отрицательные знаки в последнем столбце игнорируют.

Величина KS указывает на способность лаборанта выполнить лабораторные исследования с хорошей точностью. Чем ниже величина KS , тем лучше работа лаборанта. Величину KS можно использовать для ранжирования лаборантов по качеству работы. Величину KS от 0 до 0,5 можно считать очень хорошей, от 0,5 до 1 — хорошей, от 1 до 1,5 — допустимой, от 1,5 до 2 — плохой и выше 2 — очень плохой.

Первым требованием для применения метода является обязательное участие лаборатории во всех программах межлабораторного контроля качества, чтобы каждый лаборант имел возможность выполнить не менее 10 тестов в контрольной сыворотке за год. Во-вторых, этот метод менее перспективен в полностью автоматизированных лабораториях. В-третьих, заведующий лабораторией должен гарантировать качество оборудования и реактивов. Чтобы использовать этот метод, лаборатория должна внедрить программу контроля качества исследований внутри своей лаборатории. При ранжировании лаборантов нужно, чтобы число исследуемых тестов, выполняемых лаборантами, было равнозначным.

Для сравнения качества работы лаборантов можно использовать результаты дублированных анализов. Принцип метода состоит в следующем: разница между результатами дублированных анализов обратно пропорциональна качеству выполнения лаборантом исследований. Лучшие лаборанты получают, как правило, небольшую разницу между результатами дублированных анализов, тогда как менее старательные получают большую разницу.

Если $d_1, d_2, d_3, \dots, d_n$ представляют разницу между результатами дублированных определений в пробах 1, 2, 3, 4... n , то среднеквадратическое отклонение определений можно рассчитать следующим уравнением:

$$S = \sqrt{\frac{\sum d^2}{2n}}$$

где d — разница между результатами дублированных анализов; n — число анализируемых проб; $2n$ — общее число анализов.

Рассчитанное среднеквадратическое отклонение характеризует аналитическую ошибку, присущую самому методу исследования, и ошибку лаборанта. Когда величина аналитической ошибки постоянна, вариации, обнаруживаемые в величине среднеквадратического отклонения, полученные разными лаборантами, будут получаться вследствие вариации в ошибке лаборанта. Другими словами, величина среднеквадратического отклонения обратно пропорциональна квалификации лаборанта.

Этот метод оценки можно использовать только для сравнения качества работы лаборантов, но нельзя использовать для ранжирования, так как невозможно точно сказать, какое среднеквадратическое отклонение лучше.

Метод случайной пробы похож на предыдущий. Вместо анализа всех проб в дубликате каждый лаборант анализирует одну или две пробы в дубликате за неделю. Эти пробы выбираются случайно заведующим лабораторией, без ведома лаборанта. Результаты дублированных анализов, выполняемые каждым лаборантом, заносят в таблицу за определенный промежуток времени, после чего для каждого лаборанта рассчитывают среднеквадратическое отклонение, значения которых заносят в таблицу против каждого лаборанта. Оценка техники исследования такая же, как в предыдущем методе.

В небольших лабораториях, где исследуют менее 10 проб на один тест, трудно выбрать случайную пробу без ведома лаборанта. В таких случаях используют метод разведения, который состоит из выбора случайной пробы и разведения ее водой или нормальным изотоническим раствором хлорида натрия. Лучше растворять пробу не более чем на 20%. Пробы, приготовленные таким образом, под вымышленным именем передают лаборанту для исследования. Результаты заносят в таблицу, как в методе случайных проб, рассчитывают среднеквадратическое отклонение в целях оценки качества работы лаборантов и затем высчитывают разницу между полученной и ожидаемой величиной для разведенной сыворотки.

Другой вариант того же метода — использование двух проб сыворотки больных, смешанных 1:1. Для расчета среднеквадратического отклонения используют разницу между расчетной и аналитической величиной. Для смешивания и разведения может быть также использована ежедневная контрольная сыворотка.

Результаты исследования контрольной сыворотки с известным содержанием компонентов, проводимого в соответствии с программой внутрилабораторного контроля качества исследований, можно собрать за определенный отрезок времени и таким же образом, как и результаты межлабораторного контроля, использовать как способ оценки качества работы лаборантов. В паспорте к сыворотке содержится средняя величина и среднеквадратическое отклонение. После исследования этой сыворотки в лаборатории можно рассчитать величину S для лаборанта, используя S Из паспорта.

Например, лаборант при исследовании холестерина в сыворотке получил результат 4,7 ммоль/л. В паспорте к сыворотке даны следующие значения: $X = 4,8$ ммоль/л, $S = 0,13$ ммоль/л при использовании того же метода. Разница между полученным и паспортным значением составит: $4,8 - 4,7 = 0,1$ ммоль/л.

$$S_{\text{лаборанта}} = \frac{0,1}{0,13} = 0,7.$$

Из среднеквадратических отклонений, вычисленных за определенный промежуток времени, рассчитывают KS , которые затем можно использовать для ранжирования и оценки качества работы лаборантов.

1.6. ХАРАКТЕРИСТИКА ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ ПРИНЦИПОВ МЕТОДОВ И АППАРАТУРЫ КЛИНИКО-ДИАГНОСТИЧЕСКИХ ЛАБОРАТОРИЙ

подавляющее большинство результатов лабораторных анализов получают с помощью той или иной аппаратуры, чаще всего микроскопов и фотометров (другие приборы используются реже). Органолептические методы, для выполнения которых не требуется никаких приборов и аппаратов, имеют лишь вспомогательное значение. Чтобы грамотно применять эту сложную медицинскую технику, нужно знать не только практические приемы, что легко постигается в процессе работы, но и физические принципы измерений, так как они определяют оптимальные диапазоны измеряемых величин, возможные погрешности и способы борьбы с ними, правила контроля за технической стороной измерений и т.д.

По способу использования все лабораторное оборудование делится на измерительные приборы, которые выдают количественные результаты и поэтому подлежат метрологическому контролю, и прочую, иногда очень сложную, аппаратуру, которая метрологический контроль не проходит, например микроскопы. Ниже приводится описание физических принципов работы и устройства некоторых наиболее распространенных лабораторных измерительных приборов.

В клинической лабораторной диагностике чаще всего используются оптические измерительные приборы. К ним относятся приборы для измерения светопоглощения — фотометры и спектрофотометры; для измерения окраски и светопропускания пленок — денситометры; для измерения флуоресценции — флюорометры, спектрофлюорометры, поляризационные флюорометры; для измерения интенсивности светового излучения (окраски пламени, эмиссии) — пламенные фотометры; для измерения количества излученного света — люминометры; для измерения поглощения света раскаленными газами — атомные абсорбциометры; для измерения светорассеивания — нефелометры.

Другую группу составляют приборы для электрохимических измерений — потенциометры, полярографы и т.д. По установившейся традиции прибор для измерения электрического потенциала при минимальном значении текущего тока называется потенциометром, а метод — потенциометрией. Если же измеряется сила тока при постоянном значении электрического напряжения — это амперметрия, если в процессе измерения величина потенциала изменяется по тому или иному закону, такой метод называется вольтамперметрией или полярографией, измерение же количества электричества называется кулонометрией. Из электрохимических приборов неизменной принадлежностью почти каждой лаборатории крупной больницы являются рН-метры и их разновидности — приборы для измерения показателей кислотно-щелочного состояния (АЗИВ, прибор Аструпа и т.д.). К ним же примыкает быстрорастущая группа датчиков

для непрерывного измерения различных параметров внутренней среды — pO_2 , глюкозы, молочной кислоты и т.д., в которых используются принципы потенциометрии и амперметрии.

В каждом, или почти в каждом, лабораторном измерительном приборе имеются приспособления и устройства, облегчающие работу лаборанта, однако в некоторых они настолько совершенны, что функция аналитика сведена к минимуму, все остальное выполняется автоматически. Такие приборы называются автоматическими анализаторами; они бывают двух типов: непрерывные, когда все пробы обрабатываются последовательно, как на конвейере, и дискретные, когда одновременно обрабатывается серия из определенного количества проб, причем следующую серию можно анализировать только тогда, когда анализ окончен. Работа автоматического анализатора управляется процессором — специальной вычислительной машиной; результаты работы автоматического анализатора сравнительно легко могут быть переданы цифровой вычислительной машине, поэтому автоматизация работы неизбежно ведет к насыщению клинических лабораторий вычислительной техникой.

К числу измерительных приборов должны быть отнесены и более сложные устройства, в которых объединены две функции: разделения веществ и определения их количества в различных фракциях. Это приборы для электрофореза и различные хроматографы. Поскольку эти приборы чаще всего используются в научной работе, в настоящем разделе они не рассматриваются, так же как не рассматривается другой очень важный класс аналитической аппаратуры — весы, поскольку взвешивание используется в лабораториях почти исключительно для приготовления растворов, а не для анализа состава биологических жидкостей, как это делается в весовом анализе.

Ниже приводятся сведения, которые должны знать лабораторные работники, чтобы успешно заниматься фотометрией (в том числе спектрофотометрией), флюорометрией и потенциометрией (практически измерением рН). Некоторые вопросы, касающиеся других методов измерений, рассмотрены в соответствующих разделах.

1.6.1. Фотометрия и фотометрическая аппаратура

Биохимические аналитические методы чаще всего оканчиваются цветной реакцией, в результате которой прозрачный раствор приобретает окраску, т.е. способность избирательно поглощать (абсорбировать) свет с определенной длиной волны. Разумеется, что тот свет, который не поглотился, проходит через раствор, поэтому субъективно воспринимаемая окраска является дополнительным цветом относительно того, ко-

торый поглотился. Так, если интенсивно поглощается красный свет, то раствор бывает зеленым или синим, если поглощается фиолетовый свет, раствор желтый и т. д. График, изображающий поглощение света с разными длинами волн, называется спектральной кривой; обычно для фотометрии используют область, где поглощение света наибольшее, т. е. максимум спектральной кривой. Форма кривой, количество максимумов на ней и их положение могут очень варьировать, но обычно в видимой области не бывает больше одного-двух максимумов, поэтому выбрать участок спектра, наиболее подходящий для измерения, несложно.

Для аналитических целей пригодны только те цветные реакции, в которых развивается окраска, пропорциональная концентрации исследуемого вещества. В этом случае посредством фотометрии измеряется количество поглощаемого света и по этим данным рассчитывается искомая концентрация. Однако количественные результаты удается получать лишь в определенном диапазоне концентраций, про который говорят, что в нем соблюдается закон Ламберта-Бера.

Если в растворе имеются непрозрачные частицы, рассеивающие свет, он выглядит мутным. В этом случае, строго говоря, фотометрия невозможна, так как трудно узнать, сколько света поглотилось, а сколько рассеялось. Существуют разные способы уменьшить ошибку, вызванную мутностью, но все они эффективны лишь в известной мере. В то же время рассеивание света может быть использовано для определения количества рассеивающих частиц, а также их размеров; такой анализ называется нефелометрией, или турбидиметрией.

Закон поглощения света окрашенными растворами (Ламберта-Бера). Между концентрацией окрашенного вещества в растворе, толщиной раствора и долей света, которая в этом растворе поглощается, существует сложная логарифмическая зависимость:

$$\frac{I_1}{I_0} = 10^{-ckl}; \quad \log \frac{I_1}{I_0} = -ckl,$$

где I_1 — количество света, прошедшего через раствор (т. е. то его количество, которое улавливается приемником света); I_0 — количество света, падающего на раствор (т. е. величина холостого опыта, когда окрашенного вещества нет, но все остальные потерн остаются); c — концентрация; l — толщина слоя; k — характеристика поглощающего вещества — так называемый коэффициент экстинкции, или коэффициент оптической плотности. Если толщина слоя выражена в сантиметрах, а концентрация в молях в 1 см^3 , то коэффициент k имеет размерность $\text{см}^2/\text{моль}$ (в результате перемножения всех трех величин должен получиться безразмерный параметр); эта величина называется молярным коэффициентом экстинкции и соответствует количеству молей (или его долей) вещества, находящегося в 1 см^2 светового потока. Заметим, что эта величина в 1000 раз меньше той, которая получится, если использовать более привычные размерности, т. е. выражать концентрацию в молях в 1 л , а длину кюветы в сантиметрах:

$$\begin{aligned} \text{см}^2 \cdot \text{моль}^{-1} &= \frac{\text{см}^2}{\text{моль}} = \frac{\text{см}^{-1}}{\text{моль}/\text{см}^3} = \\ &= \frac{1}{1000} \cdot \frac{\text{см}^{-1}}{\text{моль}/\text{л}}. \end{aligned}$$

Величина $\frac{I_1}{I_0}$ — доля падающего света, пропущенного исследуемым раствором; количество же поглощенного света есть $I_0 - I_1$. Как видно из этих формул, ни количество прошедшего света, ни количество поглощенного света, ни доля поглощенного света относительно падающего непропорциональны концентрации исследуемого раствора. Она прямо пропорциональна логарифму отношений прошедшего через раствор и падающего света:

$$\log \frac{I_1}{I_0} = -kcl = E.$$

Величина E называется экстинкцией, или оптической плотностью раствора; большинство фотометрических приборов устроено так, что они непосредственно указывают эту величину. Как правило, имеется возможность отсчитывать результаты и по другой шкале — в процентах поглощенного или прошедшего света относительно фоновых величин. На широко распространенном фотометре ФЭК шкала оптических плотностей нанесена красной краской, а шкала процентов пропускания — черной (в просторечии так и указывают: "отсчет по красной шкале", имея в виду шкалу оптических плотностей).

Если оптическая плотность 1, это значит, что через раствор прошло только 10 % света, а остальные 90 % поглотились в нем. Для большинства приборов высокого класса это крайняя величина, выше которой уже трудно получить надежные результаты, но для обычных лабораторных приборов она находится вне диапазона достоверных данных. Во всех предначертанных для измерения оптической плотности приборах наибольшая точность достигается при значениях экстинкций около 0,3 (т. е. когда проходит примерно половина падающего света); по мере удаления в ту и другую сторону точность измерения, а следовательно, и достоверность результатов уменьшаются.

Экстинкция раствора, т. е. величина оптической плотности, есть произведение концентрации на толщину слоя раствора. Поэтому не имеет значения, фотометрируется данный раствор в кювете с длиной оптического пути 1 см или тот же раствор, разведенный в два раза, но в кювете с длиной оптического пути 2 см и т. д. Удлинение оптического пути приводит к повышению чувствительности лишь в том случае, если объем раствора остается прежним и сокращается поперечное сечение кюветы. Но возможности тут ограничены, так как чем уже и длиннее кювета, тем большие требования предъявляются к фокусировке и юстировке пучка света. Поэтому большинство биохимических методик рассчитано так, чтобы фотометрия проводилась в кювете с длиной оптического пути 1 см; значительно реже используются кюветы с длиной оптического пути 0,5 см, а кюветы с длиной оптического пути 2 см — практически никогда.

В литературе имеется много описаний различных микросистем, в которых повышение чувствительности фотометрии достигается путем использования узких и длинных кювет и значительного сокращения объема фотометрируемого раствора. Но надо иметь в виду, что если объем раствора меньше 0,5 мл, точность отмеривания падает, возрастают ошибки в результате испарения растворов в ходе анализа и т. д., поэтому надо принимать специальные меры предосторожности. Опыт работы показывает, что оптимальными в смысле чувствительности, точности и удобства работы оказываются объемы 0,5—1 мл при длине оптического пути кюветы 1 см. Эти параметры и реализованы в большинстве современных прецизионных приборов.

Точность фотометрии значительно возрастает, если нет необходимости каждый раз вынимать кювету для заполнения ее новой порцией исследуемого раствора. Существуют различные конструкции проточных кювет, из которых исследуемый раствор отсасывают после окончания измерения и заполняют кювету новой порцией, не вынимая ее из гнезда прибора. Выполнять серийные анализы на таких приборах проще и быстрее, чем при использовании съемных кювет. Но надо помнить, что количество раствора должно быть достаточным, чтобы промыть кювету.

Фотометрические приборы делятся на две большие группы: фотометры и спектрофотометры. В фотометрах нужные спектральные диапазоны выделяются при помощи светофильтров, поэтому число участков спектра, в котором может проводиться измерение, равно числу светофильтров. В спектрофотометре участки спектра выделяются при помощи призм или дифракционных решеток, поэтому можно установить любую длину волны в заданном диапазоне. Обычно спектрофотометры — это приборы более высокого класса, чем фотометры, в них можно выделить более узкий (более монохроматический) участок спектра, однако все зависит от конкретной конструкции прибора. Так, например, спектрофотометр «Спеккол» фирмы «Цейс» (ГДР) хотя и позволяет делать измерения на любой длине волны в диапазоне от 400 до 700 нм, но имеет настолько слабый монохроматор, что более узкие области выделять труднее, чем на хорошем фильтровом фотометре.

Чаще всего в клинической биохимии фотометрия проводится в области 400—700 нм — это так называемая видимая область спектра. Свет с большей длиной волны относится к ближней инфракрасной области, измерения в которой приходится делать чрезвычайно редко. Свет с длиной волны короче 400 нм относится к ультрафиолетовому диапазону, причем различают ближнюю область с длиной волны 300—400 нм и коротковолновый диапазон 220—300 нм. Особенно широко распространено определение восстановленного NADH и NADPH по поглощению света с длиной волны 340 нм, т. е. в ближнем ультрафиолетовом диапазоне. Для фотометрических измерений в видимой и ближней инфракрасной области пригодны кюветы из обычного стекла; для ближней ультрафиолетовой области

нужны кюветы из специальных сортов стекла — так называемые увиолевые; в коротковолновой ультрафиолетовой области пригодны только кюветы из кварца и сапфира. По внешнему виду они плохо различимы, поэтому узнать, из какого материала изготовлена кювета, можно только после определения диапазона длин волн, которые она пропускает. При получении новых партий кювет, или если их почему-либо перепутали, надо измерить оптические плотности кювет, заполненных водой, по отношению к пустому кюветодержателю через каждые 20 им, начиная от 400 нм, в сторону коротких волн до конца шкалы прибора. Практически можно работать на данной длине волны, если оптическая плотность кюветы не более 0,2—0,3. В связи с тем что кюветы из кварца или сапфира очень дороги, надо стремиться работать в видимой области только со стеклянными кюветами, а в ближней ультрафиолетовой области — только с увиолевыми.

Последовательность операций при работе на спектрофотометрах или фотометрах различных конструкций несколько различается, но принцип остается одним. Сначала устанавливают длину волны, выбирая светофильтр на фотометре или вращая соответствующую рукоятку на спектрофотометре. Чтобы точно и правильно установить длину волны, надо идти от меньших длин к большему, так как при движении в обратном направлении ошибка возрастает. Следующий этап измерения — установка нуля, т. е. определение величины I_0 в формуле¹. Для этого в кюветодержателе устанавливают кювету, заполненную раствором, полученным в результате холостого опыта; изменяя ширину щели, добиваются того, чтобы показания прибора соответствовали величине, предусмотренной инструкцией (обычно это ноль), после чего холостую пробу заменяют опытной и производят отсчет величины оптической плотности.

Щель спектрофотометра выделяется определенный интервал длин волн: чем шире щель, тем шире и спектральный интервал. Если измерение делается в той области, где чувствительность прибора или прозрачность кювет мала, чтобы вывести прибор на ноль, необходимо увеличить ширину щели. Это чревато возможностью такой ошибки, когда свет проходит с длинами волн, соседними с выбранной. Если исследуемый объект для них прозрачен, то результаты измерений оказываются ошибочными, так как фактически регистрируется сила света не на избранной длине волны, а на соседней.

Чтобы уменьшить ошибки, вызванные присутствием в растворе посторонних окрашенных веществ или его мутностью, используют двух- или трехволновые методы измерений. Сущность трехволнового метода видна на рис. 2; оптическую плотность измеряют при трех длинах волн; на месте максимума пропускания и на равном расстоянии от него в сторону длинных и коротких волн. При этом предполагается, что рассеи

¹ См. с. 26.

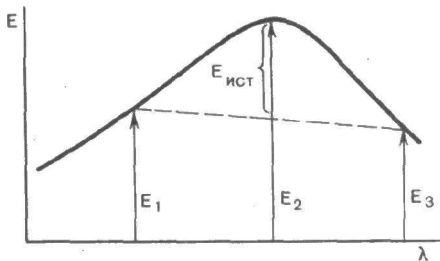


Рис. 2. Введение поправки на неспецифическое поглощение (трехволновый метод). На оси ординат — величины светопоглощения (E); на оси абсцисс — длина волны света.

$E_{ист}$ — величина светопоглощения, характеризующая количество определяемого вещества; E_1 , E_2 , E_3 — светопоглощение при волнах разной длины.

ванне света или неспецифическая окраска равномерно изменяется с изменением длины волны, поэтому истинную оптическую плотность вычисляют по формуле:

1.6.2. Флюориметрия

Эффект флюоресценции заключается в том, что исследуемый объект светится под влиянием облучения светом с более короткой длиной волны. Излучаемый свет называется светом флюоресценции, или вторичным излучением; тот свет, которым объект облучается, называется светом возбуждения флюоресценции, или первичным. Форма спектра флюоресценции обычно зеркально отображает форму спектра возбуждения, при этом спектр возбуждения флюоресценции близок к спектру поглощения раствора и поэтому характерен для данного флюорофора, в то время как спектр флюоресценции малоспецифичен. Аналитические методы, использующие флюоресценцию, основаны на предположении, что при освещении светом одинаковой интенсивности сила света флюоресценции пропорциональна содержанию исследуемого вещества. Однако такая пропорциональность имеется только в относительно узком диапазоне концентраций, из которого на практике очень легко выйти, поэтому при налаживании флюориметрических исследований надо всегда с особой тщательностью проверять линейность калибровочного графика во всем диапазоне возможных величин. Нарушение линейности бывает вызвано в первую очередь явлением гашения флюоресценции, которое обусловлено тем, что по мере углубления пучка возбуждающего света в раствор интенсивность его уменьшается вследствие поглощения. Чем концентрированнее раствор, тем поглощение это больше, поэтому сила возбуждающего света оказывается также уменьшенной. Отсюда общее

правило, что флюориметри должны подвергаться относительно разбавленные растворы.

При флюориметрии длина волны вторичного излучения обычно устанавливается на максимуме интенсивности, так как это излучение малоспецифично, в то время как длина волны первичного света (возбуждения флюоресценции) должна приходиться на наиболее специфичный для исследуемого вещества участок спектра, который необязательно совпадает с максимумом (мешающие вещества могут быть причиной ложного максимума).

Физический эффект флюоресценции заключается в том, что молекула исследуемого вещества поглощает квант света возбуждения и при этом переходит в новое, энергетически более богатое состояние; через некоторый микропромежуток времени она излучает избыточную энергию в виде кванта света флюоресценции (эмиссии). В связи с тем что энергия кванта света обратно пропорциональна длине волны, длина волны возбуждающего света всегда короче излучаемого. Промежуток времени между поглощением света и его излучением очень мал, и в обычных флюоресцентных методах на него не обращают внимания, но он достаточен, чтобы на молекулярном уровне успели произойти некоторые события, в частности, чтобы молекула могла изменить свое положение в пространстве. На этом основан метод молекулярной вискозиметрии путем измерения поляризации света флюоресценции.

1.6.3. Пламенная фотометрия и атомная абсорбциометрия

Соли металлов, попадая в пламя, способны окрашивать его. Это происходит потому, что при высокой температуре ионы молекулы распадаются на отдельные ионы, электроны которых непрерывно переходят из одного квантового состояния в другое, что сопряжено с испусканием или поглощением кванта света. Минимальная температура, необходимая для того, чтобы эти процессы проходили достаточно интенсивно, зависит от природы исследуемого элемента и в меньшей степени от того, в состав какого соединения в растворе оно входит. Некоторые элементы, например калий и натрий, начинают интенсивно излучать свет, попадая в сравнительно низкотемпературное пламя, которое получается при сгорании метана в воздухе (так называемое метаново-воздушное пламя); другие же, как, например, кальций, начинают интенсивно излучать свет и поглощать его лишь при значительно более высокой температуре, которая создается при сгорании ацетилена. При сгорании метана (т. е. бытового газа) на воздухе можно определять кальций лишь после его предварительного выделения, но методика эта сложна, ненадежна и практически не используется.

Метод, в котором изучается окраска пламени, т. е. излучение, возникающее в результате перехода атома из энергетически более высокого

состояния в низкое, называется пламенной фотометрией. Можно изучать и обратный процесс, т. е. измерять поглощение света при переходе атома с более низкого на более высокий энергетический уровень; этот метод называется атомной абсорбциометрией.

Аппаратура, необходимая для пламенной фотометрии, относительно проста и дешева, но метод оправдывает себя лишь при исследовании наиболее легковозбудимых щелочных элементов — лития, натрия, калия, так как можно работать с легкодоступным низкотемпературным пламенем, которое образуется при сгорании бытового газа. Химические методы определения этих элементов сложны и неточны, поэтому калий и натрий определяют в клинических лабораториях практически только путем фотометрии пламени.

При атомной абсорбциометрии исследуемый образец вносят в пламя, в результате чего оно начинает поглощать свет с длиной волны, характерной для данного элемента. Особенность этого процесса состоит в том, что поглощается очень узкая полоса света, измеряемая долями нанометра, поэтому для измерения поглощения необходим соответствующий линейчатый источник света. В качестве такого источника служит специальная лампа, внутри баллона которой находятся разогретые пары того самого элемента, концентрация которого определяется. Благодаря этому источник света излучает только тот свет, поглощение которого должно быть исследовано; этим достигается очень высокая избирательность физического эффекта и специфичность метода, однако для каждого исследуемого элемента должна быть специальная лампа, излучающая нужные линии спектра. Поэтому приборы для атомного абсорбционного анализа выпускаются с набором ламп, число которых равно числу элементов, которые можно определять на данном приборе.

В некоторых приборах используется обычная газовая горелка, в пламя которой распыляется раствор, содержащий исследуемый элемент. Реже для получения раскаленных паров исследуемого вещества используется специальная графитовая камера, стенки которой нагреваются электричеством, а во внутреннее пространство распыляется раствор исследуемого образца. Такая система сложнее, чем обычная горелка, но позволяет изменять температуру поглощающих свет паров исследуемого элемента. Необходимость устанавливать для каждого исследуемого элемента свой источник освещения конструктивно осложняет прибор, так как путем простого поворота головки можно менять 3—4 лампы, а если число измеряемых элементов достигает 15—20, каждую лампу приходится отдельно устанавливать и юстировать. Атомные абсорбциометры — значительно более дорогие приборы по сравнению с пламенными фотометрами. Многие элементы, которые определяются с их помощью, могут быть определены и посредством обычных цветных реакций, хотя и с большей затратой труда и часто менее точно, поэтому атомная абсорбциометрия оказывается методом выбора.

Как при фотометрии пламени, так и при атомной абсорбции важнейшим этапом анализа является распыление исследуемого раствора и введение его в пламя горелки. Для этого используют различные эжекторы из стекла или металла (аналогичные пульверизаторам), в которых струя воздуха засасывает через узкую трубку исследуемый раствор и распыляет его в небольшом объеме, через который проходит струя воздуха (или кислородно-воздушной смеси), предназначенная для поддержания горения. При этом в пламя попадает только очень небольшая часть распыленного раствора, а остальной раствор стекает на дно распылителя. Интенсивность распыления, а следовательно, и количество вещества, поступающего в пламя, зависит не только от условий работы эжектора — его регулировки и давления воздуха, которое, конечно, должно тщательно регулироваться и поддерживаться постоянным на протяжении всего измерения, но и от вязкости раствора. Возбуждение атомов в пламени в известной мере зависит от природы молекулы, в которую входит исследуемый элемент, а также от присутствия в пламени других элементов, т. е. фона. Поэтому все условия проведения анализа должны тщательно соблюдаться; при исследовании сыворотки крови или других богатых белком жидкостей разведение должно быть всегда одним и тем же. Не следует думать, что если имеется пропорциональность между концентрацией калибровочного раствора и показаниями прибора, то такая же пропорциональность сохранится и при различных разведениях сыворотки, поскольку при разведении сыворотки изменяются также вязкость раствора, а значит, и условия распыления.

В составе пламенного фотометра обязательно имеется блок, обеспечивающий подачу воздуха (или, реже, кислородно-воздушной смеси) при постоянном давлении, которое регулируется в пределах 2—4 атм, а также горючего газа при давлении, измеряемом сантиметрами ртутного столба. Воздух подается в распылитель, откуда в смеситель и в горелку. Свет, излучаемый горелкой, через систему зеркал, линз и светофильтров попадает на один или два фотоэлемента, ток которых измеряется прибором. Устройство прибора обязательно предусматривает возможность визуального контроля пламени и его юстировки. При налаживании прибора и включения его надо сначала создавать давление воздуха, а потом уже включать газ и зажигать пламя, так как в противном случае газ может проникнуть через смеситель в распылитель, где образуется взрывоопасная газозвушная смесь. В приборе также обязательно имеется отстойник, в который стекает жидкость, оседающая на дно распылителя во время работы. Давление воздуха в отстойнике во время работы всегда несколько выше атмосферного, поэтому жидкость оттуда удаляется через водяной запор. Во время работы пространство внутри отстойника не должно непосредственно сообщаться с атмосферным воздухом, иначе давление там упадет и из горелки может засосаться взрывоопасная смесь. Помимо этих блоков, обязательных для всех приборов, некоторые могут быть снабжены раз-

личными дополнительными сервисными устройствами: электрическим поджигателем газовой горелки, автоматическим разбавителем проб, устройством, печатающим результаты, и т. д.

Существует несколько возможных схем работы на пламенном фотометре. В самом простом случае, который обычно и практикуется при исследовании мочи или плазмы крови, исследуемый материал разводят водой в 50 или 100 раз, свет, образующийся при его сжигании в пламени, проходит через светофильтр и попадает на фотозлемент, интенсивность тока которого регистрируется. В связи с тем что иногда бывает трудно достаточно хорошо выделить нужную спектральную линию, используют также так называемый компенсационный метод, когда с помощью зеркал и линз формируется два пучка света: один проходит через светофильтр, выделяющей характерную для исследуемого элемента линию спектра, а второй — линию того элемента, который создает помехи, затем из показателя первого фототока вычитают второй.

Можно также использовать метод внутреннего стандарта, когда исследуемую биологическую жидкость разводят не водой, а слабым раствором элемента, которого нет в биологическом материале, чаще для этого используют соли лития. В процессе анализа делают два измерения: со светофильтром, пропускающим излучение измеряемого элемента, и со светофильтром, пропускающим излучение внутреннего стандарта; если показания внутреннего стандарта отличаются от того, что было при калировке, то вносят соответствующую поправку и в измеряемый ток. Такой порядок работы позволяет избежать ошибок, связанных с нестандартными условиями распыления; это бывает важно в том случае, когда исследуются жидкости, вязкость которых может значительно колебаться (слюна, желудочный сок и т. д.).

Чтобы создать одинаковые условия возбуждения исследуемого элемента при анализе проб, в которых содержание других составных частей значительно колеблется, используют также разведение исследуемых проб так называемым фоном, т. е. раствором, содержащим такие количества элемента, определенным образом влияющего на интенсивность свечения исследуемого элемента, чтобы возможные колебания состава посторонних веществ в пробе уже не сказывались.

В клинической лабораторной практике метод внутреннего стандарта и разведения проб «фоном», как правило, не используется; компенсационный метод измерения используется только в том случае, если это предусмотрено конструкцией прибора. Для того чтобы анализы сыворотки крови и мочи были выполнены с необходимой точностью, практически достаточно правильно приготовить комплексный калибровочный раствор, который одновременно содержит и калий, и натрий в концентрациях, близких к тем, которые бывают в исследуемом материале. Однако в моче и плазме крови соотношение этих элементов различное, поэтому калибровочный график для мочи не может быть использован для сыворотки и наоборот.

Как уже отмечалось, в то время как определение калия и натрия методом пламенной фотометрии является обязательным анализом для всех крупных лабораторий, определение других металлов: кальция, магния, железа и т. д.— может быть выполнено как обычными химическими методами, так и посредством атомно-абсорбционного анализа, который тем самым является методом выбора и сравнительно мало используется в клинических лабораториях. Здесь надо иметь в виду еще и то обстоятельство, что в биологических жидкостях такие элементы, как кальций и магний, лишь частично находятся в биологических активном ионизированном состоянии, а атомно-абсорбционный анализ позволяет определять лишь общее их содержание. Однако при определении микроэлементов: меди, марганца, цинка, а также токсических веществ, особенно ртути, преимущества атомно-абсорбционного анализа проявляются в полной мере. Особенно удобны те варианты метода, в которых применяется беспламенная атомизация, так как выпаривание пробы, ее озонение и перевод в парообразное состояние происходят в одном и том же устройстве. При определении веществ, которые находятся в биологическом материале в ультрамикрочислах, чувствительность метода иногда оказывается недостаточной, в этих случаях применяют концентрирование путем образования комплексных соединений с пирролидондигидрокарбонатом аммония (ПДКА), которые экстрагируют метиллизобутилкетон (МИБК).

1.6.4. Иммунохимические методы

При взаимодействии антигена и специфического иммуноглобулина, который по традиции называется антителом, образуется высокомолекулярный комплекс, растворимый как в избытке антител, так и в избытке антигена (рис. 3); его можно использовать, чтобы судить о содержании антигена, но это не простая задача. Долгое время не могли найти подходящего решения этой задачи и иммунохимические методы были лишь качественными или в лучшем случае полуколичественными. Однако за последние 30 лет найдено несколько путей для преодоления в той или иной степени возникших трудностей. Это делает антитела очень чувствительными и специфическими реактивами для определения чрезвычайно широкого класса органических веществ, в первую очередь белков. Чаще всего используют три способа: 1) преципитацию в геле, 2) связывание меченых веществ и 3) изучение физических характеристик образующихся макромолекулярных комплексов.

Существует огромное количество вариантов метода преципитации в геле. Однако в любом случае в прозрачной желеобразной среде тем или иным способом создается либо градиент концентрации антигена при постоянной концентрации антител, либо градиенты концентраций той и другой компоненты. В том месте, где их содержание эквивалентно, выпадает осадок — образуется зона преципитации, заметная нево-

оружейным глазом. Ее форма и положение говорят о составе и концентрациях антигенов. — Связывание меченых веществ также существует во многих вариантах, оно составляет основу метода конкурентного связывания, или сатурационного анализа. В этом случае образование комплекса антиген — антитело проводят так, чтобы в него включился весь исследуемый антиген и еще некоторое количество меченого соединения. Затем комплекс отделяют от непрореагировавших составных частей и по количеству метки судят о содержании антигена.

Третий путь основан на том, что размер молекулы комплекса значительно больше, чем молекулы антитела или антигена, поэтому и физические свойства: растворимость, способность рассеивать свет и флюоресцировать — иные. Проще всего исследовать светорассеивание (т. е., попросту говоря, помутнение раствора) в результате выпадения осадка. Но чтобы осадок образовывался количественно, нужны специальные условия, которые долгое время были неизвестны. Оказалось, что в присутствии коллоидов свободный объем раствора, в котором могут присутствовать белковые молекулы, уменьшается и реакция антиген — антитело идет значительно быстрее и с лучшим количественным выходом.

Методы преципитации в геле. Наиболее распространены четыре перечисленные ниже варианта методов определения антигенов преципитацией в геле.

1. Радиальная иммунодиффузия по Манчини: в этом случае прозрачный гель в чашке

Петри пропитывается антителами, в нем вырезают лунку, куда помещают исследуемый раствор: Антиген диффундирует из лунки в гель, где создается неравномерная концентрация — высокая по краям лунки, убывающая обратно пропорционально квадрату расстояния от ее краев. В том месте, где концентрация антигена и антитела эквивалентны, образуется зона преципитации в виде кольца. Чем выше концентрация антигена в лунке, тем больше радиус кольца.

2. Встречная или двойная, иммунодиффузия по Оухтерлони отличается от радиальной тем, что слой геля предварительно не пропитывается антителами, а их раствор вносят в специальную лунку, находящуюся по соседству с лункой антигена. Оба вещества диффундируют одно навстречу другому, в результате чего создаются градиенты концентраций, и антител, и антигена. В простейшем случае зона преципитации имеет форму прямой линии, которая проходит между лунками антигена и антител. Но если лунок не две, а больше (например, одна лунка антител, вокруг которой несколько лунок с разными разведениями испытуемого раствора, или же одна лунка со смесью антител, вокруг которой несколько лунок с идентичными или неидентичными антигенами), образуются довольно сложные фигуры. По ним можно судить не только о количестве, но и о структуре исследуемых веществ.

3. Ракетный электрофорез, который называют также электроиммуноопределением, основан на том же принципе, что и радиальная иммунодиффузия, т. е. пластинка геля предварительно

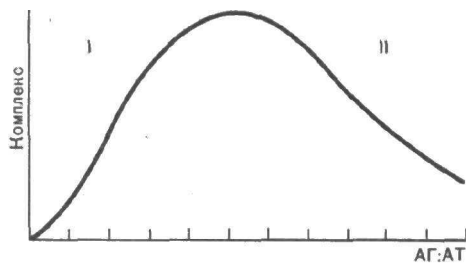


Рис. 3. Образование преципитата при иммунохимических реакциях. На оси ординат — количество осадка комплекса антиген—антитело; на оси абсцисс — отношение количеств антиген—антитело в условных единицах.

I — зона избытка антитела; II — зона избытка антигена.

пропитывается антителами и в лунку вносят исследуемую жидкость. Однако в данном варианте антиген перемещается в гель не в результате простой диффузии, а под влиянием наложенного электрического поля, т. е. так же, как при электрофорезе. Благодаря этому образование преципитата идет значительно быстрее, зона преципитации имеет характерную форму заостренных языков, отдаленно напоминающих контуры космических ракет на старте (отсюда и название: по-английски ракета «rocket»). Расстояние от лунки до верхушки зоны примерно пропорционально концентрации антигена.

4. Классический иммуноэлектрофорез по Грабарю или Вильямсу дает наиболее развернутую картину антигенного состава исследуемой жидкости. В этом случае исследуемую жидкость, например сыворотку крови, подвергают обычному электрофорезу в геле, при этом белки выстраиваются в линию соответствием своей электрофоретической подвижности. После этого проводят встречную иммунодиффузию в поперечном направлении против поливалентной иммунной сыворотки, в результате образуется сложная система дуг преципитации.

Метод конкурентного связывания (сатурационный анализ). Суть метода конкурентного связывания заключается в том, что некоторые вещества — лиганды — способны весьма избирательно связываться с исследуемым соединением, при этом нет различия между веществом биологического происхождения (анализируемым) и его меченым аналогом, добавленным извне. Они конкурируют за лиганд, который должен быть добавлен в таком количестве, чтобы его связывающая способность полностью насытилась (отсюда и название «сатурационный» — насыщающий анализ). Очевидно, что чем больше в пробе определяемого вещества, тем меньше связывается меченое вещество. После этого отделяют комплекс от свободных ингредиентов и подсчитывают количество метки — в одних вариантах в комплексе, в других не связанного с комплексом.

Особенность метода конкурентного связывания заключается в том, что используют лиганды исключительно биологического происхождения; меченое соединение обычно получают из природного, присоединяя к нему метку в виде отдельного атома или химической группировки.

Как следует из краткого описания принципа, метод конкурентного связывания имеет два неудобства: во-первых, это нелинейная зависимость между результатом непосредственного измерения, т. е. количеством меченого соединения, и исследуемым параметром, т. е. содержанием определяемого вещества; во-вторых, это многоэтапность анализа. Оба обстоятельства сказываются на точности определения, причем особенно важно помнить, что в силу нелинейности хорошие результаты получаются лишь в определенном диапазоне концентраций исследуемого вещества, поэтому обычно рекомендуют каждую пробу исследовать два или даже три раза (в дуплетах или триплетах), отбрасывая результаты, которые находятся вне нужного диапазона. Однако эти недостатки компенсируются необыкновенно высокой чувствительностью и избирательностью метода, широкое внедрение которого вызвало переворот в традиционных методах клинической биохимии.

По своему принципу метод конкурентного связывания примыкает к классическим иммунологическим методам, основанным на реакции связывания комплемента, однако количество комплемента может быть определено лишь полуквантитативно. Кроме того, для этого метода необходимы определенным образом обработанные эритроциты (или другие заменяющие их частицы), в то время как реактивы, используемые для сатурационного анализа, значительно легче стандартизируются и более устойчивы. Однако приготовление их настолько сложно, что недоступно практически лабораториям, поэтому в условиях клинико-диагностических лабораторий метод конкурентного связывания может быть выполнен лишь с помощью промышленно изготовленных готовых наборов реактивов, так называемых китов (от английского слова kit, означающего набор инструментов или команду).

В клинической биохимии и иммунологии метод конкурентного связывания шире всего используется для определения трех групп веществ: 1) гормонов — как белковой природы, так и небелковых; 2) индивидуальных белков — как нормально присутствующих (альбумин, макроглобулин и т. д.), так и появляющихся в условиях патологии (антитела к микробам и вирусам и белки инфекционных агентов); 3) лекарственных соединений и вредных веществ из окружающей среды, что относится к сфере фармакодинамики и токсикологии.

В качестве лигандов используются три группы веществ биологического происхождения: 1) антитела; 2) специфические транспортные белки плазмы крови; 3) рецепторные белки органов-мишеней. Наибольшее значение имеет использование антител, полученных путем иммунизации. Сатурационный анализ стал возможен лишь после того, как были разработаны весьма совершенные способы иммунизации, в том числе

низкомолекулярными веществами, позволяющие получать антисыворотки с высокими титрами специфических антител. В этой связи следует упомянуть также о способе получения моноспецифических клоновых антител, которые вырабатываются не в целом организме, а в тканевых культурах, в которых растут клетки, в больших количествах продуцирующие только нужные иммуноглобулины (обладающие свойствами каких-либо антител). Такие культуры получают путем гибридизации лимфоидных клеток иммунизированного животного со злокачественными клетками, обладающими свойствами неограниченно расти в тканевых культурах. Затем отбираются (клонировуются) клетки, обладающие нужными качествами, т. е. способностью продуцировать требуемые антитела и неограниченным ростом в культуре.

Транспортные белки крови обычно используются в качестве лигандов при определении стероидных гормонов, в частности глюкокортикоидов. Транскортин удобен как лиганд потому, что он необязательно должен быть использован в чистом виде (реактивом может быть лишь незначительно обогащенная фракция или даже сыворотка) и не обладает видовой специфичностью, поэтому пригодны сыворотки различных лабораторных и домашних животных. Недостаток использования транспортных белков состоит в том, что они не очень специфичны и, как правило, не позволяют дифференцировать гормоны от их непосредственных метаболитов (например, кортизол, кортизон и гидрокортизол).

Третий источник лигандов — белки из органов-мишеней — шире всего используется для определения эстрогенов. В целом они обладают свойствами, аналогичными транспортным белкам крови, но их извлекают путем соответствующей обработки из органов лабораторных животных, чувствительных к эстрогенам, например из матки крыс.

Чтобы получить меченое соединение, обычно используют чистый препарат определяемого вещества, полученный из биологического источника или синтетическим путем. Белковые вещества удобно метить, вводя в их состав радиоактивный йод — обычно изотоп ^{125}I ; для этого препарат инкубируют с радиоактивным индикатором в присутствии окислителя, а затем очищают от побочных продуктов. Низкомолекулярные вещества метят тритием путем неспецифического изотопного обмена. Использование радиоактивных меченых соединений связано с теми неудобствами, что для работы с ними необходима специально оборудованная лаборатория, поэтому все большее распространение приобретают такие варианты метода конкурентного связывания, в которых исследуемое вещество метится ферментом. Таким способом можно пометить лишь относительно крупные молекулы, так как образовавшаяся химическая связь не должна затрагивать функционально важные группы ни в молекуле меченого соединения, ни в ферменте.

Очень важная техническая проблема — отделение связанных с лигандом меченого и немеченого соединений от их свободных форм. Для

решения этой задачи применяются самые разнообразные приемы, причем может удаляться свободная форма и подсчитываться количество связанной формы, а может быть и наоборот — удаляться связанная форма и определяться количество свободной формы. Однако во всех случаях для разделения используется существенное различие в молекулярной массе комплекса и свободных форм определяемого вещества. Более крупные молекулы комплекса можно отделить геле-фильтрацией или электрофорезом, а также осажая их полиэтиленгликолем. Возможен такой вариант анализа, когда лиганд заранее адсорбирован на твердой фазе — бром-ацетилцеллюлозе, полиэтилене и т. д., поэтому комплекс легко отделяется от находящегося в растворе свободных форм определяемого вещества. Используется также так называемый метод двойных антител, когда комплекс лиганд — определяемое вещество осаждается (преципитируется) после добавления антител против белка самого лиганда. Свободные формы можно удалить также, адсорбируя их на специфических сорбентах, которые не связывают комплекс лиганда и определяемого вещества, например на целлюлозе, амберленте, силикагеле, активированном угле. Особенно широкое распространение при определении низкомолекулярных гормонов получило использование активированного угля, покрытого декстраном, тонкий слой которого пропускает лишь молекулу гормона, которая поэтому адсорбируется на угле, а высокомолекулярный комплекс остается в растворе. Такой прием получил название мгновенного диализа.

Определение при помощи энзима, связанного с иммуносорбентом. Определение «при помощи энзима, связанного с иммуносорбентом» (сокращенно ЭЛИСА — заглавные буквы английских слов — Enzyme Linked Immunosorbent Assay), представляет собой дальнейшее развитие метода двойных антител, используемого в сатурационном анализе, но здесь отсутствует конкуренция между определяемым природным соединением и его меченым вариантом. Суть метода заключается в том, что образуется нечто вроде слоеного пирога, причем определяемое вещество составляет один из его внутренних слоев, а индикаторный фермент — самый внешний; общий размер всей структуры зависит от количества определяемого вещества. Рассмотрим функционирование этого метода на примере набора для определения альбумина в моче (рис. 4).

Определение выполняют в лунках (гнездах), стенки которых изготовлены из специального синтетического материала, эффективно адсорбирующего антитела, — полистирена. Сначала в них вносят так называемые первичные антитела, в данном случае кроличьи антитела против человеческого альбумина, затем после их адсорбции на стенках и отмывания избытка вносят исследуемую пробу. Содержащиеся в ней молекулы альбумина через посредство первичных антител оказываются фиксированными на стенках лунки. Затем добавляют вторичные антитела: в данном случае источником их служит сыворотка морской свинки, иммунизированной против че-

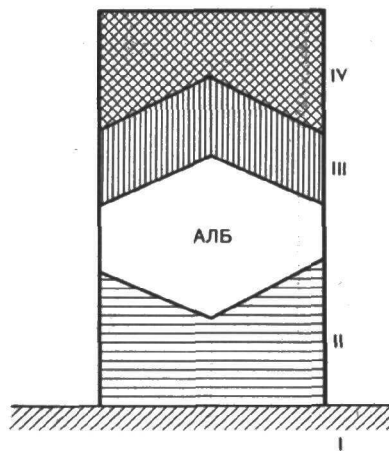


Рис. 4. Комплекс, образующийся при одном из вариантов определения сывороточного альбумина с помощью связанного с иммуносорбентом энзима (схема).

АЛБ — сывороточный альбумин человека (определяемое вещество); римскими цифрами обозначены компоненты аналитической системы: I — полистиреновая стенка лунки микротитратора; II — первичные антитела (из сыворотки кролика, иммунизированной против сывороточного альбумина человека); III — вторичные антитела (из сыворотки морской свинки, иммунизированной против сывороточного альбумина человека); IV — пероксидаза из хрена, фиксированная на кроличьих антителах против иммуноглобулинов морской свинки.

ловеческого альбумина; они фиксируются на тех же альбуминовых молекулах, которые другими группами адсорбированы на первичных антителах. Четвертый слой иммунного «пирога» — фермент пероксидаза, фиксированная на кроличьих антителах против иммуноглобулинов морской свинки; они связываются со вторичными антителами, при этом количество фиксированной пероксидазы оказывается пропорциональным содержанию альбумина в исследуемой пробе. После добавления каждого реагента и завершения реакции связывания избыток непрореагировавших белков тщательно удаляют отмытием буферным раствором, кроме того, добавляют инактивированные Сыворотки для подавления неспецифических реакций. После окончания всех адсорбции и отмываний проводят ферментативную реакцию, для чего в лунку добавляют о-фенилендиамин и перекись водорода. Благодаря присутствующей пероксидазе о-фенилендиамин окисляется, и через некоторое время интенсивность окраски измеряется фотометрией.

Для иммуноферментных исследований не только в методе ЭЛИСА, но и в других его вариантах чаще всего используется пероксидаза, так как этот фермент с небольшой молекулярной массой, который легко определять, но находят применение и другие энзимы, например щелоч-

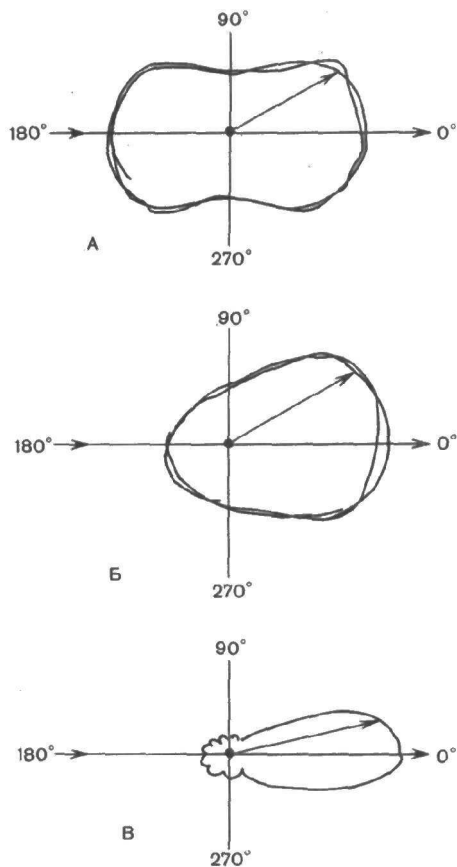


Рис. 5. Угловое распределение света, рассеянного частицами разного размера.

А — размер частицы меньше, чем $1/10$ длины волны света; Б — размер частицы больше, чем $1/10$ длины волны света, но меньше длины волны света; В — размер частицы больше, чем длина волны света.

ная фосфатаза. Вместо фенилендиамина иногда используют другие хромогенные субстраты или образование молекулярного йода из его солей под влиянием перекиси водорода.

Метод ЭЛИСА очень чувствителен и высокоспецифичен; в отличие от радиоиммунных методов он не требует специальных условий. Многочисленные адсорбции и отмывания, которые проводятся по ходу определения, занимают 5–6 ч, требуя постоянного внимания работника. Поэтому для выполнения анализа изготавливаются специальные приборы, в которых эти операции механизированы или даже автоматизированы. Результаты во многом зависят от качества материала, использованного для приготовления лунок микротитратора. В результате многоступенчатости анализа зависимость между содержанием исследуемого вещества в пробе и окраской, которая развивается в результате ферментативной реакции, обычно нелинейная.

Исследование светорассеивания. В обычных условиях осадок комплекса антиген-антитело образуется медленно, ему препятствует как избыток антител, так и антигена. Это затруднение удается в значительной степени преодолеть, если реакция проходит в растворе коллоида, обычно полиэтиленгликоля. Его большие молекулы, занимая значительный объем раствора, вытесняют оттуда молекулы белков, относительная концентрация которых в свободном пространстве повышается, а взаимодействие ускоряется. В результате область, в которой имеется достоверная зависимость между количеством добавленного антигена и размером осадка (преципитатом), значительно расширяется и ход реакции ускоряется. Поэтому, проводя иммунохимическую реакцию в растворе полиэтиленгликоля, удается определять содержание антигена по светорассеиванию (мутности) пробы уже через несколько минут после добавления антител. Чаще всего измерения проводят по конечной точке, когда реакция уже остановилась и светорассеивание больше не увеличивается, но существует и другой вариант пробы, когда измеряется скорость нарастания мутности.

Классическая теория светорассеивания, разработанная Релеем, рассматривает случай, когда размер рассеивающей частицы мал по сравнению с длиной волны, составляя $1/10$ ее или меньше. Для фиолетового света с длиной волны 400 нм это составляет 40 нм, а для красного света с длиной волны 700 нм размер релейской частицы не должен превышать 70 нм. Для сравнения заметим, что наибольший диаметр молекулы альбумина 8 нм, IgG — 20 нм, а длина молекулы фибриногена (которая имеет форму нити) — около 50 нм.

Интенсивность релейского светорассеивания зависит от длины волны света и угла, под которым измеряется рассеянный свет по отношению к падающему: оно обратно пропорционально четвертой степени длины волны, когда вперед и назад попадает немного больше света, чем в бок, но диаграмма симметрична (рис. 5). Если же размер частиц больше $1/10$ длины волны, рассеивание света становится несимметричным, т. е. вперед по отношению к лучу падающего света его интенсивность заметно больше, чем в задней полусфере. Характер этого распределения также зависит от размера частиц (см. рис. 5). В ряде случаев оказывается выгодным измерять свет рассеянный не под углом 90° к падающему лучу, а под меньшими углами, что значительно повышает чувствительность.

Судить о мутности раствора можно двумя способами: по количеству рассеянного света и по количеству прошедшего; первый способ называется нефелометрией, второй — турбидиметрией. Нефелометрия точнее и надежнее, так как фон, т. е. показание прибора, когда он заполнен прозрачным раствором, очень мал и даже небольшое количество взвешенных частиц приводит к заметному возрастанию сигнала, который в широких пределах пропорционален размеру осадка. Если же измерение проводят в турбидиметрическом варианте, то количество преципитата должно быть таким, чтобы рассеялось не

Таблица 8. Сравнительная характеристика некоторых иммунохимических методов

Метод	Длительность анализа	Чувствительность	Воспроизводимость, %	Точность, %
Количественное осаждение	2—8 дней	—	—	—
Радиальная иммунодиффузия	1—2 дня	1 мг/л	10	10—50
Ракетный электрофорез	6—18 ч	1 »	5	10
Нефелометрия по конечной точке в присутствии полиэтиленгликоля, ручной метод	20 мин — 4 ч	10 »	5	10
То же, автоматический метод	2 мин	5 »	2	2
Скорость помутнения	1 »	1 »	—	—
Радиоиммуноопределение	3 ч — 5 сут	5—10 мкг/л	—	—

менее 10—20% света, иначе измерение будет недостоверным. Кроме того, неизвестен физический закон, связывающий количество света, прошедшего через мутный раствор, и число частиц, поэтому калибровочные графики всегда сугубо эмпиричны и трудно добиться хорошей воспроизводимости. Зато турбидиметрические измерения не требуют специального прибора, измерения можно выполнять на любом фотометре или спектрофотометре.

Нефелометризовать можно на специальном приборе — нефелометре или флюорометре. Различие между этими приборами состоит в том, что при нефелометрии длина волны первичного света, которым освещается раствор, и вторичного, в данном случае рассеянного, одинакова, поэтому нет необходимости во вторичном светофильтре. При флюорометрии раствор освещается светом, длина волны которого меньше, чем длина волны излучаемого света, поэтому требуются два светофильтра — первичный и вторичный. Если же оба они одинаковы или вторичного светофильтра вообще нет, флюорометр можно использовать как нефелометр.

При нефелометрии абсолютное количество рассеянного света не имеет большого значения, так как чувствительность прибора обычно велика. В связи с тем что надо измерить количество светорассеивающих частиц безотносительно их формы и размера, удобно работать в красной области спектра: длина волны больше и спектр частиц, которые ведут себя как релейевские, шире: Если проводят турбидиметрическое измерение, очень важно увеличить долю рассеянного света, которая, согласно теории Релея, — обратно пропорциональна четвертой степени длины волны» т. е. в фиолетовой области значительно больше, чем в красной. Поэтому выбирают светофильтр, с самой короткой длиной волны, обычно 340 м.

Чувствительность метода зависит и от фона, т. е. света, рассеянного чистым растворителем. Эта величина определяется многими причинами, в том числе фокусировкой пучка света. Тут лазер дает значительные преимущества: интенсивность освещающего (и, следовательно, рассеянного) света велика; нет нагревания, как при

работе с лампами накаливания; благодаря параллельности пучка удается избавиться от бликов. В лазерном нефелометре можно измерять свет, рассеянный в направлении, близком к направлению освещающего; это оправдывает себя в том случае, когда частицы большие и свет рассеивается вперед значительно больше, чем вбок и назад. Частицы иммунных комплексов как раз такие.

Метод поляризационной флюорометрии по своему принципу близок к методу конкурентного связывания, поскольку там также идет конкуренция между меченым и немеченым соединением за антители, но исследование поляризации света флюоресценции позволяет определять количество флюоресцирующего соединения, образовавшего комплекс механически, не отделяя его от свободной формы. В этом методе меченые соединения получают, присоединяя к молекуле определяемого вещества молекулу флюоресцина — вещества, способного ярко светиться зеленым светом при освещении его синим светом. Способ химического присоединения флюоресцина к белковым молекулам был разработан давно и широко используется при приготовлении флюоресцирующих антител.

Физически явление флюоресценции заключается в том, что молекула вещества, поглощая квант света, переходит в возбужденное состояние, в котором находится очень небольшой промежуток времени, а затем возвращается в исходное состояние, испуская при этом квант света с длиной волны, которая несколько больше, чем у света, который использовался для возбуждения флюоресценции. Если за время, прошедшее между поглощением света и его испусканием, молекула флюорофора не изменила своего положения в пространстве, то свет флюоресценции будет поляризован в той же плоскости, в которой поляризован и возбуждающий свет. Если же молекула успела повернуться на некоторый угол, то соответственно изменятся и плоскость поляризации излучаемого света. Поэтому исследование поляризации флюоресценции называют молекулярной вискозиметрией, она позволяет оценить скорость вращения молекул исследуемого вещества. В связи с тем

чтобольшиемолекулыкомплексаантиген-антитело вращаются значительно медленнее, чем небольшие молекулы определяемого вещества, меченного флюоресценцией, метод позволяет определять одно из них в присутствии другого.

Практически анализ проводят следующим образом:, так же как в остальных вариантах метода конкурентного связывания, к исследуемой пробе добавляют известное количество определяемого вещества, меченного флюоресцентом, затем титрованный раствор антител. После того как реакция завершена и наступило равновесие, раствор облучают поляризованным светом и измеряют интенсивность флюоресценции светом, поляризованным в направлении, перпендикулярном, к управлению поляризации возбуждающего света. В таких условиях светятся только молекулы свободного меченого соединения, а молекулы, вошедшие в комплекс с антителом, не светятся, так как весь излучаемый ими свет поляризован в том же направлении, что и возбуждающий (табл. 8).

1.6.5. Некоторые виды лабораторного оборудования

Приборы для электрофореза на пленке из ацетата целлюлозы. Аппарат для электрофореза на пленке из ацетата целлюлозы (ЭПАУ 20-50) предназначен для разделения белков сыворотки на пленках из ацетата целлюлозы. Аппарат позволяет выполнять электрофорез на ацетатцеллюлозных пленках в микроварианте, что обеспечивает значительную экономию реактивов и электроэнергии. Оборудование состоит из электрофоретической камеры, выполненной из органического стекла, и источника постоянного тока. Экспериментальный завод Всесоюзного научно-исследовательского института синтетических смол (г. Владимир) предоставляет ацетатцеллюлозные пленки необходимых размеров; удобнее употреблять пленки размером 9X 9 см, что дает возможность наносить последовательно от 4 до 7 образцов. Пленки выдерживают в растворе буфера, применяемого для электрофореза. Для получения 5 фракций рекомендуется веронал-мединаловый буфер или мединал-центратный буфер рН 8,6. Длина камеры на 4 пленки 9X 9 см 42 см, ширина 13 см. Для визуальной оценки электрофореграммы, а также прямого;денситометрирования- достаточно 1—2 мкл сыворотки; элюирования фракций 1с последующим фотометрированием требует 3—4 мкл сыворотки. Электрофоретическое разделение проводят при напряжении 200 В в течение 20 мин. После окрашивания краской, например Понсю С, в течение 15 мин н просветления пленки (устранения, избытка красителя) проводят измерения на денситометре.

Денситометр ДМ-1 предназначен для фотометрирования окрашенных фореграмм, полученных методом диск-электрофореза.

Диапазон измерения коэффициента светопропускания, %	10—100
Спектральный диапазон пропускания, нм	400—650
Ширина выходной щели прибора, мм	0,1; 0,2; 0,3; 0,4.
Скорость перемещения электрофореграммы, мм/мин	0,5; 1; 5; 10; 20
Продолжительность непрерывной работы, ч (не менее)	8

Лабораторное оборудование для прободготовки. Дозаторы полуавтоматические пипеточные П1 (СССР) предназначены для дозирования реактивов и биожидкостей. Обладают высокой Точностью дозирования, легки, удобны и надежны в эксплуатации. Дозаторы П1-0,2 и П1-0,5 — поршневого типа, дозаторы П10,02, П1-0,05 и П1-0,1—плунжерного типа без стеклянного цилиндра, поршень заменен металлическим плунжером, уплотненным эластичной втулкой. Корпус дозаторов заканчивается наконечником, на который надевают сменные насадки, позволяющие ускорить отбор проб биожидкостей от разных пациентов. Исползованные сменные насадки стерилизуют. Технические характеристики полуавтоматических пипеточных дозаторов П1 приведены в табл. 9.

Дозатор автоматический поршневой АХ-3-5. Химически стойкий трехкомпонентный дозатор. Предназначен для дозирования реактивов (кислот с концентрацией до 20 %), растворов щелочей и солей (с концентрацией до 6 %). Состоит из механизма перемещения и блока дозаторов, имеющих три дозирующих устройства, работающих по принципу поршневого насоса.

Ниже приведены технические характеристики дозатора поршневого АХ-3-5.

Объем дозы, мл	От 0,1 до 2 (через 0,1 мл) » 0,5 » 5 (через 0,5 мл)
Предел допускаемой основной приведенной погрешности, %	» ±2 » ±2,5
Сходимость дозирования, %	» 2 > 2,5
Производительность, цикл/мин	15 и 30
Питание от сети переменного тока:	
напряжение, В	220± 10 %
частота, Гц	50
Габарит, мм:	
механизма перемешивания	380 X 272 X 178
блока дозаторов	232 X 250 X 268
масса общая, кг (не более)	20

Таблица 9. Технические характеристики полуавтоматических пипеточных дозаторов П 1

Дозатор	Объем дозы, мл	Основная относительная погрешность, %	Сходимость дозирования, коэффициент вариации, %	Габарит, мм	Масса, г
П ₁ -0,02	0,02	±4	4	26×223	35
П ₁ -0,05	0,05	±4	4	26×223	35
П ₁ -0,1	0,1	±3	3	26×223	35
П ₁ -0,2	0,2	±3	3	26×236	—
П ₁ -0,5	0,5	±3	3	26×236	—

Дозатор автоматический поршневой медицинский А-2 (СССР) предназначен для дозирования водных растворов с содержанием солей до 5%, кислот (кроме уксусной, азотной и плавиковой) и оснований до 2%.

Дозатор имеет 3 сменные дозирующие насадки на 2; 5 и 10 мл. Дозирование может осуществляться с частотой 15 доз в 1 мин, а также разовыми дозами.

Ниже приведены технические характеристики дозатора А-2.

Питание дозатора от однофазной сети переменного тока; напряжение, В
частота, Гц
потребляемая мощность, Вт (не более)

220 ± 22
50 или 60
25

Пределы дозирования, мл:
при применении насадки на 2 мл
> » > > 5 »
> » » > 10 »

От 0,1 до 2.
От 0,2 до 5
От 0,2 до 10

Цена деления шкал, мл:
шкалы для насадок на 2 и 5 мл
> > > » 10 мл

0,1
0,2

Предел допускаемого значения приведенной погрешности дозатора (не более):
для диапазона дозирования
> » »
> » »

От 0,1 до 2 мл
От 0,2 до 5 мл и
от 0,2 до 10 мл

Предел допускаемого значения среднеквадратического отклонения случайной составляющей приведенной погрешности с доверительной вероятностью 0,9 % (не более):
для диапазона дозирования
> >
> > »

От 0,1 до 2 мл
От 0,2 до 5 мл и
от 0,2 до 10 мл

Габаритные размеры, мм

265X145X270

Масса в комплекте доставки кг (не более)

7

Автодиллятор "Хиратик-21" (ЧССР). Предназначен для дозирования и разбавления различных объемов биожидкости. Дозатор состоит из цилиндров с калиброванными поршнями разных диаметров и системы шлангов. Величина дозы зависит от диаметра поршня и высоты хода поршня. Возможно присоединение автодиллятора к транспортеру проб «Хиратик-12» для автоматического дозирования заданного объема реактива в отдельные пробирки.

Объем дозы, мкл:
пробы
реактива

10—20—40—100
10—20—50—100
150—300—750—1500
200—400—1000—2000
250—500—1250—2500

Продолжительность дозирования, с (макс)
Точность дозирования,

2 — для дозы до 20 мкл;
1 — для дозы 20 мкл
258X265X300
20

Ниже приведены технические характеристики автодиллятора «Хиратик-21».

Габариты, мм
Масса, кг

Устройство автоматической подачи проб "Хиратик-12" (ЧССР) рассчитано на 120 пробирок, помещаемых в 10 штативов по 12 штук. Все штативы одновременно можно переносить в поддоне вручную от одного устройства автоматической подачи проб к другому или поместить в баню или термостат для инкубации. Интервал между двумя шагами дозирования составляет 2,5 с, но может быть увеличен до 10 с. На задней панели имеется гнездо для подключения дозато-

ра «Хиратик-21». Имеется кодирование пробирок для обработки калибровочных проб. Система идентификации в устройстве позволяет идентифицировать 4000 проб. Многоцелевое назначение устройства, помещение проб в поддонах и возможность его соединения с другими устройствами «Хиратик» делают возможным применение данного устройства как для механизации работ в лаборатории, так и в комплекте автоматизированной лабораторной линии.

Вместимость устройства	20 калибровочных проб и 100 проб пациентов
Организация проб	Поддон с 10 штативами, штатив для 12 пробирок; 1-я и 7-я пробирки — для калибровочных проб
Размер пробирок, мм	12,5X75
Вместимость пробирок, мд	7,5
Рабочая температура поддона	До 100 °С
Управление	Ручное от встроенного генератора; время шага 2,5; 10 с
Автоматическая блокировка работы — после 120-й пробы.	
Возможность перемещения по шагам — в 6 проб.	
Возможность пропуска дозирования для калибровочных проб.	
Габаритные размеры, мм	241X202X250
Масса, кг	6

Дозирующее устройство DS 201E (ГДР) предназначено для дозирования водных растворов, в том числе и агрессивных реактивов. Пределы дозирования от 250 до 5000 мкл. Может работать по принципу дилютора.

Дозирующий орган (ДО) для проб	Дозирующий орган (ДО) для реактива	Соотношение проба/реактив	Диапазон объема проб, мкл
ДО-0,5	ДО-5	1:10	50—500
ДО-1	ДО-5	1:5	100—1000
ДО-5	ДО-5	1:1	250—5000

Возможно дозирование проб менее 50 мкл	ДО-0,5	10 мкл
и дозирование реактивов менее 250 мкл при использовании устройства как дозатора:	ДО-1	20 мкл
	ДО-5	100 мкл

Ниже приведены технические данные дозирующего устройства DS 201E

Применение	Дозирующее устройство	Дозируемый объем, мл	Соотношение проба/реактив	Дозирующий орган
В качестве дозирующего устройства	Для реактива	0,25—5,0	1:1 1:5 1:10	ДО-5
	» »	0,5—10,0		2X ДО-5
В качестве разбавителя	Для пробы	0,25—5,0		ДО-5:ДО-5
	» »	0,1—1,0		ДО-1:ДО-5
	» »	0,05—0,5		ДО-0,5:ДО-5

Приспособление для фиксации и окраски мазков крови ФОМ К - 1 (СССР) предназначено для фиксации и окраски мазков крови на предметных стеклах с минимальным расходом красителей и максимальным количеством предметных стекол. В состав приспособления входят: узел фиксации, узел окраски, узел промывки и узел сушки предметных стекол, а также съемные кассеты для размещения предметных стекол. Приспособление имеет световую сигнализацию и обеспечивает установку времени окрашивания мазков. Ниже приводится его техническая характеристика.

Количество одновременно окрашиваемых стекол, шт.	50
Время окрашивания мазков, мин	От 2 до 30
Напряжение, В	220
Потребляемая мощность, Вт	20
Габариты, мм	280X155X225
Масса, кг	10

Планшет для иммунологических реакций однократного применения предназначен для внесения в его лунки различных реагентов объемом 0,05—0,2 мл, последующего термостатирования и микропипетирования или просмотра при естественном

свете. Состоит из прозрачных корпуса и крышки. Корпус имеет 96 лунок цилиндрического профиля. Прозрачность корпуса и крышки обеспечивает визуальное наблюдение за содержимым лунок планшета. Размеры, форма панели и расположение лунок позволяют использовать имеющиеся в лабораториях дозаторы для розлива. Технические характеристики планшета: габариты 125X84X 14 мм; масса 0,71 кг.

Лабораторное оборудование для гематологических исследований. Гемоцитометр кондуктометрический ГЦМК-3 (СССР) предназначен для измерения концентрации эритроцитов и лейкоцитов в суспензиях крови кондуктометрическим методом при помощи датчика с отверстием. Принцип действия основан на регистрации электрических импульсов, возникающих при прохождении микрочастиц через отверстие датчика. Конструктивно оформлен в виде прямоугольного корпуса с ручкой, предназначенной для ручной переноски прибора. На передней части расположены осциллоскоп, устройство крепления датчика, представляющего собой пробирку, в дно которой введен часовой камень с микроотверстием, и стакан для помещения пробы. С помощью гидравлической системы, управляемой рычагом, выведенным на боковую поверхность прибора, исследуемую пробу протягивают через датчик и выбрасывают ее обратно в стакан.

Ниже приведены технические характеристики ГЦМК-3.

Систематическая составляющая основной относительной погрешности при нормальных условиях, % (не более):

для эритроцитов в диапазоне $(2-8) \cdot 10^{12}/л$
 » лейкоцитов » » $(2-20) \cdot 10^9/л$
 » диапазона $(4-10) \cdot 10^9/л$

Изменение показаний при изменении температуры окружающего воздуха в рабочих климатических условиях, % (не более на каждые 10°):

питание от сети переменного тока:

напряжение, В	220 ± 22
частота, Гц	50 или 60
мощность, потребляемая прибором, Вт (не более)	20

Время установления показаний при измерении концентрации микрочастиц в суспензиях крови, с (не более)

10

Время достижения установившегося режима, мин (не более)

5

Наработка на отказ — время условно непрерывной работы, ч (не менее)

2500

Габаритные размеры в пределах:

длина, мм	385 ± 3
ширина, мм	180 ± 3
высота, мм	305 ± 3
масса, кг (не более)	10

Гемоглобинометр фотоэлектрический ГФ-Ц-04 (СССР) предназначен для определения концентрации гемоглобина в крови. Принцип действия основан на измерении оптической плотности исследуемой пробы. Конструктивно оформлен в виде прямоугольного корпуса. В передней части прибора

расположено кюветное отделение блока измерения для размещения в нем стеклянной прямоугольной кюветы с исследуемой пробой (в комплект поставки прибора входят 2 кюветы). Результаты измерений индусируются на цифровом табло на лицевой панели прибора. Ниже приведены технические характеристики ГФ-Ц-04.

Диапазон определения концентрации гемоглобина в крови, г/л	0—250
Основная приведенная погрешность, вызванная нелинейностью градуировочной характеристики прибора, % (не более)	5
Питание от сети переменного тока:	
напряжение, В	220 ± 22
частота, Гц	50
Мощность, потребляемая прибором, Вт (не более)	30
Время достижения установившегося режима, мин (не более)	30
Время установления показаний, с (не более)	К)
Наработка на отказ — время условно непрерывной работы, ч	1500
Средний срок службы до капитального ремонта, годы (не менее)	5
Габаритные размеры в пределах:	
длина, мм	370 ± 10
ширина, мм	235 ± 10
высота, мм	150 ± 10

Комплекс гематологический лабораторный КГ-2 (СССР) предназначен для определения в автоматическом режиме 8 гематологических показателей: концентрации эритроцитов, лейкоцитов, тромбоцитов, гемоглобина, величины гематокрита, среднего объема эритроцита, среднего содержания гемоглобина в 1 эритроците, средней концентрации гемоглобина в эритроцитах. В комплексе использованы; безртутная гидравлическая система протяжки взвеси с автономным управлением, автоматическое-введение поправки на совпадение частиц, автоматическая коррекция амплитудной характеристики. Имеет блок управления и индикации; приставки счетные — 2 штуки; блок преобразования информации; блок вакуума, приставку для гемоглобина, приставку вычислительную, цифropечатающее устройство; устройство для перемешивания проб. Блоки размещаются на подвижной тележке. Функциональная связь между ними обеспечивается межблочными жгу-

тами. Может поставляться в трех вариантах. Ниже приведена техническая характеристика КГ-2.

Время одного анализа крови с выводом 7 показателей на цифropечатающем устройстве, с	Не более 45
Количество крови; для анализа, мл	0,06
Питание от сети переменного тока:	
напряжение, В	220
частота, Гц	50

В табл. 10—14 приведены технические характеристики различных приборов производства СССР и других стран—членов СЭВ.

Таблица 10. Технические характеристики спектрофотометров производства СССР и других стран — членов СЭВ

№ п/п	Наименование прибора, страна	Источник света, спектральное деление	Спектральный диапазон, нм	Диапазон измерения оптической плотности	Основная погрешность длин волн, нм (не более)	Объем жидкости в прямоугольной кювете, мл	Толщина слоя кюветы, мм	Способ получения результата	Масса, кг	Примечание
1	«Спектрофотометр СФ-16» (СССР)	Лампа накаливания, дейтериевая, рутиневая, монохроматор	186—1100	0—2		3	Цилиндрической 100; 50; 20; 10; 5; 4,5; 4,2; 4,05	Стрелочный прибор	74	Состоит из 2 блоков
2	«Спектрофотометр СФ-18» (СССР)	Водородная лампа, монохроматор	400—750	0—2			Прямоугольной 10, 20, 5, 50	Графически	200	
3	«Спектрофотометр СФ-26» (СССР)	Лампа накаливания, дейтериевая, рутиневая, монохроматор	186—1100	0—2,0	В области: 186—300—0,1 300—350—0,2 350—400—0,3 400—550—0,5 550—1000—1,0 1000—1100—5,0	3	2 5 10 20 40 50	Стрелочный прибор	75	Кюветы прямоугольные и цилиндрические
4	«Спеколь 20» (ГДР)	Галогенная лампа, монохроматор	335—800	До 3	Менее 1 нм		10	Цифровая индикация	22	Термостатированные проточные и микрокюветы Автоматическое смешивание
5	«Спеколь 21/221» (ГДР)	Галогенная лампа, монохроматор	335—800	До 2	Менее 1 нм	10		Цифровая индикация, в модели 221 цифровые ролепечи		Микрокюветы объемом 0,15 мл

№ п/п	Наименование прибора, страна	Источник света, спектральное деление	Спектральный диапазон, нм	Диапазон измерения оптической плотности	Основная погрешность длины волны, нм (не более)	Объем жидкости в прямойгольной кювете, мл	Толщина слоя кюветы, мм	Способ получения результата	Масса, кг	Примечание
6	«Спектрофотометр СФ-20» (СССР)		190—2500 нм	0—2,0					450	Для измерения коэффициента пропускания и оптической плотности твердых и жидких тел
7	«Спектрофотометр СФ-21» (СССР)		190—1100	0—2	0,5					То же Оснащен микроЭВМ
8	«Спектрофотометр СФ-39» (СССР)		190—750	0—2	0,5					Управление процессом измерения и переносом результатов обработки с помощью микроЭВМ

Таблица 11. Техническая характеристика фотометров отечественного производства и других стран — членов СЭВ

№ п/п	Наименование прибора, страна	Источник света, спектральное деление	Спектральный диапазон, нм	Диапазон измерения оптической плотности, условные единицы	Оптическая толщина слоя кюветы, мм	Объем кюветы, мл	Масса, кг	Способ получения результата	Примечание
1	Фотоэлектрический колориметр нефелометр ФЭК-60 (СССР)	Лампа накаливания СЦ-61, интерференционные светофильтры	360—1000	До 3,0		0,5—40,0	33	Шкала оптических плотностей	
2	Фотоэлектрический колориметр ФЭК-56М (СССР)	Лампа накаливания, ртутно-кварцевая лампа, широкополосные светофильтры	316—630	» 3,0			22,5	То же	
3	Микроколориметр фотоэлектрический МКМФ-1 (СССР)	Лампа накаливания, широкополосные светофильтры	425, 465, 520, 540, 570, 610	0—2,0		0,07 0,5 2,0	9,5	То же	
4	Колориметр автоматический цифровой КАМЦ (СССР)	Импульсная лампа дугового разряда	340—630	0,05—1,5	10	1—3,5	150	Цифровая индикация	Прочная кювета, автоматическая подача проб
5	Колориметр медицинский цифровой КФМЦ-2 (СССР)	Импульсная лампа дугового разряда	300—650	0,05—1,5	15	0,4—2,5		Цифровая индикация	
6	Колориметр фотоэлектрический концентричный КФК-2 (СССР)	Галогенная лампа малогабаритная, светофильтры	315—980	0—1,3	5—50	0,5—40,0	14	Стрелочный прибор	Имеются наборы микрокувет 2—10 мм
7	Колориметр медицинский фотоэлектрический КФК-2МП (СССР)	То же	315—980	0—1,3	2—50	0,08—40,0		Цифровая индикация	Микропроцессор позволяет проводить расчет уравнения регрессии калибровочной кривой
8	Колориметр «Хириатик-49» (ЧССР)	Вольфрамовая лампа накаливания, интерференционные светофильтры	360—650	0—1,998		1—1,5 мл		Цифровой вольтметр, самописец	

Т а б л и ц а 12. Технические характеристики пламенных фотометров производства СССР и стран — членов СЭВ

№ п/п	Наименование прибора, страна	Оптическая схема, приемник световой энергии	Время одного замера, с	Объем раствора для измерения, мл	Длина волны (светофильтр), нм	Горючий газ	Чувствительность, мг/(л·дем)	Способ получения результата
1	Фотометр пламенный фотоэлектрический ПФМ (СССР)	Одноточечная, мультищелочной фотоэлемент Ф-9	Менее 20	1—2	Натрий 589±5; калий 766±5; кальций 620±5; литий 671±5	Пропан, бутан	Пропан, бутан, воздух: натрий 0,0025; калий 0,01; кальций 0,3; литий 0,01 Ацетилен, воздух: натрий 0,005, калий 0,03, кальций 0,03, литий 0,01	Стрелочный прибор
2	Пламенный фотометр, модель III. Народное предприятие Карл-Цейсс-Йена (ГДР)	Одноточечная, селективный фотоэлемент	120—180	0,1	Калий 770 нм			То же

Т а б л и ц а 13. Техническая характеристика некоторых отечественных флуориметров

№ п/п	Тип прибора, наименование	Источник света. Спектроделение	Спектральный диапазон, нм		Объем исследуемой жидкости, мл	Способ выдачи результатов
			возбуждения	флуоресценции		
1	Флуориметр медицинский ФМЦ-2	Светофильтры	300—450	350—600	2,5±0,1	Цифровая индикация, возможно подключение цифров печатающего устройства
2	Фотометр люминесцентный ФЛ	Для спектров возбуждения — светофильтры, для спектров флуоресценции — монохроматор	300—600	400—800	Предел определения концентрации флуоресценца 1·10 ⁻¹¹	Стрелочный прибор

Таблица 14. Техническая характеристика некоторых автоанализаторов производства СССР и стран — членов СЭВ

Модель, фирма, страна	Принцип работы	Длина волны измерения оптической плотности, нм	Емкость пробо-накопите-ля	Объем пробы, мл	Объем реак-тива, мл	Темпера-тура тер-мостаги-рования	Функциональные возможности	Функциональные блоки	
РНА-1, МЛВ (ГДР)	Дискретный кондуктомет-рический	100	100 проб	0,2 × 2			I. Гематологические анализаторы Производительность 120 проб в 1 ч. Автоматическая калибровка. Идентификация проб. Измерение 8 гематологических параметров: концентрация гемоглобина, количество эритроцитов, лейкоцитов, гематокрит, среднее содержание гемоглобина в эритроците, средняя клеточная концентрация гемоглобина, средний объем эритроцита, кривая объемно-го распределения эритроцитов в 64 дискретных точках		1. Блок реагентов 2. Накопитель проб 3. Мешалка для проб 4. Канюли отбора и дозировки 5. Блок транспортировки 6. Блок измерения 7. Печатающее устройство 8. Возможность подключения ЭВМ
							II. Биохимические анализаторы Производительность 20—60 проб в 1 ч. Модули для 12 биохимических методов		1. Пробоаккумулятор 2. Дозировочные насосы и трубки 3. Смесители 4. Фильтровой 1-канальный колориметр 5. Проточные кюветы с оптической толщиной слоя 5—50 мм 6. 1-канальный пламенный фотометр 7. 1-канальный блок преобразования данных 8. Самописец 9. Печатающее устройство 10. Преобразователь двенадцати грам
Поточный автоанализатор, МЛВ (ГДР)	1- Поточный канальный	340—700	110 проб			37; 95 °С			

Модель, фирма, страна	Принцип работы	Длина измерения оптической плотности, мм	Емкость пробоникопителя	Объем пробы, мл	Объем реактива, мл	Температура термостатирования	Функциональные возможности	Функциональные блоки
АДМ-300 поточный, МЛВ (ГДР)	Поточный 2-канальный	340—800				25; 30; 37; 56; 95 °С	Производительность до 120 проб в 1 ч. Автоматическая коррективировка настройки, дрейфа нуля и переноса, 10 биохимических методик	1. Дозирующее устройство 2. Термостат 3. Методические блоки 4. Двухлучевой проточный колориметр 5. Кюветы с оптической толщиной слоя 10; 20 мм 6. Блок обработки информации 7. Самописец 8. Печатающее устройство 9. Возможность подключения к ЭВМ
Контифло, Лабор МИМ (ВНР)	Поточный 1-, 2-, 3- и 4- канальный	340— —700	200	Диапазон расхода жидкостей 0,0054— 4,18 мл/мин		37—95 °С	Производительность 40—120 проб в 1 ч	1. Перистальтические насосы 2. Аналитические блоки 3. Блоки питания 4. Двухлучевой колориметр 5. Самописец 6. Печатающее устройство 7. Возможность подключения к перфоратору и ЭВМ
ДА 240.4 (СССР— ГДР)	Дискретный 4-канальный	340—700	100	20—200	До 5	37; 55 °С	Производительность до 240 проб в 1 ч по каждому каналу. Методы конечной точки и псевдокинетические. Световая и звуковая сигнализация неисправностей	1. Прораспределитель 2. Транспортное устройство 3. 16 дозаторов реактивов 4. Термостат 5. Моющее устройство 6. Блок преобразования данных 7. 2 двухлучевых фотоколориметра Дуколь 8. Печатающее устройство 9. Возможность подключения к ЭВМ

Раздел 2

ХИМИКО-МИКРОСКОПИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

2.1. МОЧА

Для исследования собирают всю порцию утренней мочи после тщательного туалета половых органов. Мочу необходимо собирать в совершенно чистую, сухую посуду; хранить до исследования можно не более 1¹/₂ ч в холодном месте. Применение консервирующих веществ нежелательно, но допускается в виде исключения, если анализ не может быть произведен в положенное время. Лучшие результаты наблюдения при обработке мочи тимолом (кристаллик тимола на 100—150 мл мочи).

2.1.1. Физические свойства

Количество. Количество утренней мочи (обычно 150—250 мл) не дает представления о суточном диурезе. Измерение объема утренней мочи целесообразно для интерпретации ее относительной плотности.

Цвет. Нормальная моча окрашена в более или менее насыщенный желтый цвет (от соломенного до янтарно-желтого). Окраска мочи может меняться при приеме лекарственных препаратов (ревеня, амидопирин, салицилатов и др.) или употреблении некоторых пищевых продуктов (свеклы, черники). Патологически измененная окраска мочи бывает при гематурии (вид мясных помоев), билирубинурии (оранжево-красный цвет).

Прозрачность. В нормальной моче все составные части находятся в растворе, поэтому свежесобранная моча совершенно прозрачна. Если моча оказывается мутной в момент выделения, то это обусловлено наличием в ней большого количества клеточных образований, солей, бактерий, жира. Ориентировочно установить причину помутнения можно следующим образом: если при нагревании 4—5 мл мочи в пробирке она становится прозрачной, то помутнение было вызвано мочекислыми солями (уратами); если степень помутнения после нагревания не изменяется, то к моче прибавляют 10—15 капель уксусной кислоты, полное или даже частичное исчезновение муты после этого говорит о том, что она была вызвана фосфатами. Полная прозрачность мочи может не достигаться потому, что в таких случаях обычно имеется щелочная моча, находящаяся в процессе разложения, которая содержит микробы и клеточные элементы. Помутнение, исчезающее при добавлении HCl, вызвано оксалатом кальция. Муть, обусловлен-

ная присутствием жира, исчезает при взбалтывании мочи со смесью эфира и спирта. Если моча остается мутной, несмотря на все эти процедуры, то муть, по всей вероятности, вызвана микробами, что распознается при микроскопическом исследовании.

Реакция мочи. Определение pH при помощи лакмусовой бумаги следует проводить одновременно двумя ее видами: синей и красной.

Результаты; 1) синяя лакмусовая бумага краснеет, красная не изменяет своего цвета — кислая реакция; 2) красная лакмусовая бумага синееет, синяя не изменяет своего цвета — щелочная реакция; 3) оба вида бумаги не меняют своего цвета — нейтральная реакция.

Унифицированный метод определения pH мочи с индикатором бром-тимоловым синим (1979). Реактивы. Бромтимоловый синий (3', 3''-дибромтимолсульффталин): 0,1 г растертого в фарфоровой ступке индикатора растворяют в 20 мл теплого этилового спирта и после охлаждения до комнатной температуры доводят водой до 100 мл.

Ход определения. Исследуют мочу в первые 2—3 ч после мочеиспускания. К 2—3 мл мочи добавляют 1—2 капли рабочего раствора индикатора. Границы изменения окраски индикатора лежат в диапазоне значений pH 6,0—7,6; этот диапазон обеспечивает определение кислой и щелочной реакции. Желтый цвет соответствует кислой реакции, бурый — слабосилой, травянистый — нейтральной, буровато-зеленый — слабощелочной, зеленый и синий — щелочной. Практическое выполнение этой реакции очень просто и при большом количестве исследований значительно экономит время. Однако эти методы дают только ориентировочное представление о кислой или щелочной реакции, отличить мочу с нормальной кислотностью от патологически кислой не представляется возможным.

Выпускаемая в нашей стране универсальная индикаторная бумага дает возможность определить pH (значения даны с интервалом 1,0 в широком диапазоне — от 1,0 до 10,0). Кроме того, некоторыми фирмами выпускаются специальные виды индикаторной бумаги, предназначенные для определения pH мочи (диапазон значений pH 5,0—8,0), или комбинированные экспресс-тесты, которые включают, кроме определения величины pH, несколько других показателей.

Нормальные величины. Моча здоровых взрослых людей при обычном питании имеет средние значения рН $6,25 \pm 0,36$ (от 5,0 до 7,0). Колебания рН мочи обусловлены составом питания; мясная диета обуславливает кислую реакцию мочи, растительная диета — щелочную.

Клиническое значение. В норме при смешанной пище в организме образуются главным образом кислые продукты обмена. Основания попадают в организм при приеме щелочных лекарств и питании богатой основаниями пищей (овощи, фрукты, молочные продукты). Излишнее количество бикарбонатов выводится почками, при этом моча становится щелочной.

Органические кислоты и кислые соли неорганических кислот содержащиеся в моче, диссоциируют в водной среде, выделяя известное количество свободных H^+ . Концентрация (активность) свободных H^+ -ионов представляет истинную реакцию мочи — активную кислотность (РН).

Щелочность мочи увеличивается при рвоте, особенно при высокой кислотности желудочного сока, ощелачивающей терапии, хронической инфекции мочевыводящих путей. Кислотность увеличивается при сахарном диабете, туберкулезе почек, почечной недостаточности. Изменение рН мочи соответствует изменению рН крови; при ацидозах моча имеет кислую реакцию, при алкалозах — щелочную. Однако иногда наблюдается расхождение этих показателей. При хронических поражениях канальцевого аппарата почек (туберкулопатиях) в крови отмечается картина гиперхлоремического ацидоза, а реакция мочи щелочная, что связано с нарушением синтеза кислоты и аммиака в связи с поражением канальцев.

При гипокалиемическом алкалозе наблюдается ацидурия. Недостаток калия увеличивает секрецию H^+ -ионов канальцами. В данной ситуации это физиологический ответ почечных канальцев, направленный на поддержание ионного равновесия между клетками и межтканевой жидкостью. Таким образом, определение рН мочи может иметь значение при дифференциальной диагностике алкалоза и ацидоза разной этиологии.

Относительная плотность мочи (удельный вес). Принцип. Сравнение плотности мочи с плотностью воды при помощи ареометра (урометра) в диапазоне шкалы от 0,001 до 1,050.

Необходимое оборудование. Цилиндр вместимостью 50 мл, урометр.

Ход определения. Мочу наливают в цилиндр, избегая образования пены, затем в нее осторожно погружают урометр. После прекращения его колебаний отмечают относительную плотность по положению нижнего мениска на шкале урометра. Урометр не должен касаться стенок цилиндра. Температура исследуемой мочи должна быть $15 \pm 3^\circ C$. Если мочи мало, то можно перед исследованием развести ее в 2—3 раза дистиллированной водой, а потом полученную цифру относительной плотности умножить на степень разведения.

Нормальные величины. Относительная плотность зависит от концентрации

растворенных в ней веществ (белка, глюкозы, мочевины, солей натрия и др.). Каждые 3 г/л белка повышают относительную плотность мочи на 0,001, а каждые 10 г/л глюкозы увеличивают цифру плотности на 0,004. Цифры плотности утренней мочи, равные или превышающие 1,018, свидетельствуют о сохранении концентрационной способности почек и исключают необходимость ее исследования с помощью специальных проб.

Клиническое значение. Очень высокие или низкие цифры плотности утренней мочи требуют выяснения причин, обусловивших эти изменения. Низкая относительная плотность связана с полиурией, а высокая при объеме утренней мочи 200 мл и больше чаще всего бывает при глюкозурии.

2.1.2. Химическое исследование

БЕЛОК- Большинство качественных и количественных методов определения белка в моче основаны на его коагуляции в объеме мочи или на границе сред (мочи и кислоты); если есть способ измерить интенсивность коагуляции, то проба становится количественной.

Унифицированная проба с сульфосалициловой кислотой (1972). Реактив: 20% раствор сульфосалициловой кислоты.

Ход определения. В 2 пробирки наливают по 3 мл профильтрованной мочи. В опытную пробирку прибавляют 6—8 капель реактива. На темном фоне сравнивают контрольную пробирку с опытной. Помутнение в опытной пробирке указывает на наличие белка, пробу считают положительной.

Примечание. Если реакция мочи щелочная, то перед исследованием ее подкисляют 2—3 каплями 10 % раствора уксусной кислоты.

Унифицированный метод Брандберга — Робертса—Стольниковы (1972). Принцип. В основу положена кольцевая проба Геллера, заключающаяся в том, что на границе азотной кислоты и мочи при наличии белка происходит его коагуляция и появляется белое кольцо.

Реактивы. 30% раствор азотной кислоты (относительная плотность 1,2) или реактив Ларионовой. Приготовление реактива Ларионовой: 20—30 г хлорида натрия растворяют при нагревании в 100 мл дистиллированной воды, дают остыть, фильтруют. К 99 мл фильтрата приливают 1 мл концентрированной азотной кислоты.

Ход определения. В пробирку наливают 1—2 мл азотной кислоты (или реактива Ларионовой) и осторожно, по стенке пробирки, настилают такое же количество профильтрованной мочи. Появление тонкого белого кольца на границе двух жидкостей между 2-й и 3-й минутой указывает на наличие белка в концентрации примерно 0,033 г/л. Если кольцо появляется раньше 2 мин после настилаивания, мочу следует развести водой и провести повторное настилаивание уже разведенной мочи. Степень разведения

мочи подбирают в зависимости от вида кольца, т. е. его ширины, компактности и времени появления. При нитевидном кольце, появившемся ранее 2 мин, мочу разводят в 2 раза, при широком — в 4 раза, при компактном — в 8 раз и т. д. Концентрацию белка при этом вычисляют путем умножения 0,033 на степень разведения и выражают в граммах на 1л (г/л).

Примечание. Иногда белое кольцо получается при наличии больших количеств уратов. В отличие от белкового кольца уратное появляется немного выше границы между двумя жидкостями и растворяется при легком нагревании.

Количественное определение белка в моче по помутнению, образуемому, при добавлении сульфосалициловой кислоты (1972). Принцип. Интенсивность помутнения при коагуляции белка сульфосалициловой кислотой пропорциональна его концентрации.

Реактивы. 1. 3% раствор сульфосалициловой кислоты. 2. 0,9% раствор хлорида натрия. 3. Стандартный раствор альбумина — 1% раствор (1 мл раствора, содержащий 10 мг альбумина): 1 глиофилизированного альбумина (из человеческой или бычьей сыворотки) растворяют в небольшом количестве 0,9% раствора хлорида натрия в колбе вместимостью 100, мл, а затем доводят до метки тем же раствором. Реактив стабилизируют прибавлением 1 мл 5% раствора азиды натрия (NaN₃). При хранении в холодильнике реактив годен в течение 2 мес.

Специальное оборудование: фотоэлектроколориметр.

Ход определения. В пробирку вносят 1,25 мл профильтрованной мочи, доливают до 5 мл 3% раствором сульфосалициловой кислоты, перемешивают. Через 5 мин измеряют на фотоэлектроколориметре при длине волны 590—650 им (оранжевый: или красный-светофильтр) против контроля в кювете длиной оптического пути 5 мм. Контролем служит пробирка в которой к 1,25 мл профильтрованной мочи долили до 5 мл 0,9% раствор хлорида натрия. Расчет ведут по калибровочному графику, для построения которого из стандартного раствора готовят разведения, как указано в табл. 15.

Таблица 15. Приготовление разведений для построения калибровочного графика

№ пробирки	Стандартный раствор, мл	0,9% раствор хлорида натрия, мл	Концентрация белка, г/л
1	0,05	9,95	0,05
2	0,1	9,9	0,1
3	0,2	9,8	0,2
4	0,5	9,5	0,5
5	1,0	9,0	1,0

Из каждого полученного раствора берут 1,25 мл и обрабатывают, как опытные пробы.

Примечание. Прямолинейная зависимость при построении калибровочного графика сохраняется до 1 г/л. При более высоких концентрациях пробу следует разводить и учитывать разведение при расчете.

Ложноположительные результаты могут быть получены при наличии в моче контрастных веществ, содержащих органический йод. Поэтому тест Нельза использовать у лиц, принимающих препараты йода; ложноположительный тест может быть также обусловлен приемом сульфаниламидных препаратов, больших доз пенициллина и при высоких концентрациях в моче мочевой кислоты:

Бнуретовый метод. Принцип. Пептидные связи белка с солями меди в щелочной среде образуют комплекс фиолетового цвета: Белки предварительно осаждают трихлоруксусной кислотой.

Реактивы сульфата. 1. 10% раствор трихлоруксусной кислоты. 2. 20% раствор меди (CuSO₄·2H₂O): 3, 3% раствор NaOH.

Ход определения. К 5 Мл мочи, взятой из суточного количества, прибавляют 3 мл раствора трихлоруксусной кислоты, центрифугируют до постоянного объема осадка. Надосадочную жидкость отсасывают пипеткой, осадок затем растворяют в 5 мл раствора NaOH. К раствору добавляют 0,25 мл Си SO₄, смесь перемешивают и центрифугируют. Надосадочную жидкость фотометрируют при длине волны 540 им в кювете с длиной оптического пути 10 мм против дистиллированной воды. Концентрацию белка рассчитывают по калибровочной кривой, при построении которой на оси ординат откладывают концентрацию белка (г/л), а на оси абсцисс — оптическую плотность в единицах экстинкции. По полученной концентрации рассчитывают суточную потерю белка с мочой.

Обнаружение белка с помощью индикаторной бумаги (полосок), которые выпускают фирмами «Iachemi» (ЧССР), «Albuphan», «Ames» (Англия), «Albustix», «Boehringer» (ФРГ), «Comburtest» и др.

Принцип основан на феномене так называемой протитиновой ошибки некоторых кислотно-щелочных индикаторов. Индикаторная часть бумаги пропитана тетрабромфеноловым синим и цитратным буфером. При увлажнении бумаги буфер растворяется и обеспечивает соответствующий рН для реакции индикатора. При рН 3,0—3,5 аминогруппы белков реагируют с индикатором и меняют его первоначально желтую окраску, на зеленовато-синюю, после чего, сравнивая с цветной шкалой, можно ориентировочно оценить концентрацию белка в исследуемой моче. Основной предпосылкой правильной работы индикаторных полосок является обеспечение рН 3,0—3,5 для протекания реакции. Если бумага находится в контакте с исследуемой мочой дольше экспозиции, указанной в инструкции, то цитратный буфер, в ней растворяется, и тогда индикатор реагирует на истинный рН мочи, т. е. дает ложноположительную реакцию. В связи с тем, что емкость буфера ограничена, то даже при соблюдении методических указаний

в пробах слишком щелочной мочи ($\text{pH} > 6,5$) получаются ложноположительные результаты, а в пробах слишком кислой мочи ($\text{pH} < 3,0$) — ложноотрицательные. Число реагирующих аминокрупп в составе отдельных белков различно, поэтому альбумины реагируют в 2 раза интенсивнее, чем такое же количество у-глобулинов (белок Бене-Джойса, парапротеины), и гораздо интенсивнее, чем гликопротеиды. Однако при большом количестве слизи с высоким содержанием гликопротеидов (воспаление мочевыводящих путей) оседающие на индикаторной полоске хлопья слизи могут давать ложноположительные результаты. Чувствительность отдельных производственных серий индикаторной бумаги, равно как и отдельных видов бумаги, выпускаемых одной и той же фирмой, может быть различной; поэтому к количественной оценке белка этим методом следует относиться осторожно. Определение суточной потери белков с мочой при помощи индикаторной бумаги невозможно. Таким образом, индикаторная бумага уступает химическим пробам, в первую очередь пробе с сульфосалициловой кислотой, хотя и дает возможность быстрого исследования серии образцов.

Нормальное значение. Небольшое количество белка в суточной моче обнаруживается и у вполне здоровых лиц, однако такие небольшие концентрации не выявляют в разовых порциях используемыми в настоящее время методами. Приблизительно 70 % белков мочи здорового человека приходится на долю уромуконида — белка, являющегося продуктом почечной ткани; таким образом, доля гломерулярного белка в моче здоровых людей является ничтожно малой. Большинство исследователей указывают, что протеинурия в норме составляет 50—150 мг/сут. Большинство белков мочи идентично сывороточным.

Клиническое значение. Принято различать следующие формы протеинурии в зависимости от места возникновения: преренальную, связанную с усиленным распадом белка тканей, выраженным гемолизом; ренальную, обусловленную патологией почек, которая может быть разделена на клубочковую и канальцевую; постренальную, связанную с патологией мочевыводящих путей и чаще всего обусловленную воспалительной экссудацией. В зависимости от длительности существования выделяют постоянную протеинурию, существующую в течение многих недель и даже лет, и преходящую, проявляющуюся периодически, иногда даже при отсутствии патологии почек, например при лихорадке и выраженной интоксикации. Целесообразно различать переменность протеинурии: при сутрчной, потере белка до 1 г — умеренную, от 1 до 3 г — среднюю и более 3 г — выраженную.

Обнаружение в моче белков с относительно большой молекулярной массой свидетельствует об отсутствии избирательности почечного фильтра и выраженном его поражении. В этих случаях говорят о низкой селективности протеинурии. Поэтому в настоящее время широкое распространение получило определение белковых

фракций мочи. Наиболее точны методы электрофореза в крахмальном и полиакриламидном геле. По результатам, полученным этими методами, можно судить о селективности протеинурии.

Обнаружение в моче белка Бенс-Джонса. Исследование целесообразно проводить только: при положительной пробе с сульфосалициловой кислотой. Индикаторная бумага для обнаружения белка Бенс-Джонса непригодна.

Принцип основан на реакции термпреципитации. Методы, с помощью которых оценивают растворение белка Бенс-Джонса при температуре 100 °С или повторное осаждение при последующем охлаждении, ненадежны, так как далеко не все белковые тела Бенс-Джонса обладают соответствующими свойствами. Наиболее достоверно выявление этого парапротеина осаждением его при температуре 40—60 °С, но и в этих условиях осаждение может не произойти в слишком кислой ($\text{pH} < 3,0—3,5$) или слишком щелочной ($\text{pH} > 6,5$) моче, при низкой относительной плотности мочи и при низкой концентрации белка Бенс-Джонса. Наилучшие условия осаждения обеспечивает методика, предложенная Patnem.

Реактив. 2M ацетатный буфер pH 4,9.

Ход исследования. Профильтрованную мочу в количестве 4 мл смешивают с 1 мл буфера и согревают 15 мин на водяной бане при температуре 56 °С. При наличии белков Бенс-Джонса уже в течение 2 мин появляется выраженный осадок, при концентрации белка Бенс-Джонса менее 3 г/л проба может получиться отрицательной. На практике это встречается крайне редко, так как большей частью концентрация белка Бенс-Джонса в моче значительная.

С полной достоверностью белок Бенс-Джонса может быть обнаружен иммуноэлектрофоретическим исследованием при использовании специфических сывороток против тяжелых и легких цепей иммуноглобулинов.

Клиническое значение. Белок Бенс-Джонса может выделяться с мочой при миеломной болезни, макроглобулинемии Вальденстрема.

Литература. Михеева А. И., Богодарова И. А.— *Лаб. дело*, 1969, т. 7, с. 441; Рябов С. И., Наточин Ю. В., Бондаренко Б. Б. *Диагностика болезней почек.*— Л.: Медицина, 1979, с. 29—32; Kingsburry F. B., Clark C. P., Williams G., *Post A.*— *J. Lab. Clin. Med.*, 1926, vol. 11, p. 981.

ГЛЮКОЗА. Унифицированный метод определения с помощью индикаторных полосок (1972). **Принцип.** Метод основан на специфическом окислении глюкозы с помощью фермента глюкозооксидазы; образовавшаяся при этом перекись водорода разлагается пероксидазой и окисляет краситель. Изменение окраски красителя при окислении свидетельствует о присутствии глюкозы в моче.

Реактивная бумага «Глюкотест» представляет собой полоски бумаги 0,5X 5 см, имеющие поперечную полосу светло-желтого цвета, про-

питанную раствором ферментов и красителя. С помощью бумаги «Глюкотест» можно обнаружить глюкозу в моче и ориентировочно определить ее концентрацию. Комплект состоит из 100 штук реактивных полосок, цветной шкалы, пластинки из пластмассы и инструкции. Исследование проводят строго по инструкции.

Ход исследования. Бумагу «Глюкотест» погружают к исследуемую мочу так, чтобы желтая полоса с реактивами оказалась смоченной, после этого ее немедленно извлекают из мочи и на 2 мин оставляют на пластмассовой пластинке. По истечении 2 мин сразу же сравнивают измененную окраску цветной полосы на бумаге со шкалой, имеющейся в комплекте.

Содержание глюкозы в моче определяют по наиболее совпадающему со шкалой цвету полоски.

Примечания: 1. Хранить полоски надо при температуре от +8 до +18 °С, избегать попадания на них прямых солнечных лучей; не рекомендуется дотрагиваться рукой до цветной шкалы полоски. 2. Исследуют свежесобранную мочу. 3. При содержании в моче глюкозы более 20 г/л интенсивность окраски цветной полосы становится предельной (соответствует 2 % по шкале) и далее не меняется.

Срок годности полосок «Глюкотест» 8 мес со дня выпуска. Подобные тесты выпускают и зарубежные фирмы.

Унифицированные методы обнаружения глюкозы в моче. Проба Гайнеса (1972). Можно использовать готовый набор реактива.

Принцип метода основан на способности глюкозы восстанавливать в щелочной среде при нагревании гидрат окиси меди (синего цвета) в гидрат закиси меди (желтого цвета) и закись меди (красного цвета). Для того чтобы из гидрата окиси, меди при нагревании не образовался черный осадок окиси меди, к реактиву добавляют глицерин, гидроксильные группы которого связывают гидрат окиси меди.

Реактивы. Реактив Гайнеса: 1) 13,3 г кристаллического сульфата меди х.ч. ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{NaO}$) растворяют в 400 мл дистиллированной воды; 2) 50 г едкого натра растворяют в 400 мл дистиллированной воды; 3) 15 г глицерина (ч. или ч.д.а.) растворяют в 200 мл дистиллированной воды. Смешивают растворы 1 и 2 и тотчас же приливают раствор 3. Реактив стоек.

Ход исследования. К 6–8 мл мочи прибавляют 20 капель реактива до появления голубоватой окраски, смешивают и нагревают верхнюю часть пробирки до начала кипения. Нижняя часть пробирки — контроль. При наличии глюкозы в моче появляется желтая окраска в верхней части пробирки.

Примечание. При бактериурии глюкоза мочи быстро разлагается. Можно использовать готовый набор реактивов:

Унифицированный поляриметрический метод определения содержания глюкозы (1972). **Принцип.** Метод основан на использовании свойства раствора глюкозы вращать плоскость поляризованного луча вправо. Угол вращения

пропорционален концентрации глюкозы в растворе.

Реактивы. 30% раствор ацетата свинца.

Специальное оборудование: поляриметр.

Ход исследования. Исследуемая моча должна быть кислой реакции, прозрачной и не содержать белка. Белок удаляют кипячением с последующим фильтрованием. Необходимо также обесцветить мочу, так как некоторые пигменты могут быть оптически активны. Лучше всего обесцветивание достигается обработкой ацетатом свинца, для этого к 10 мл мочи приливают 1 мл 30% ацетата свинца, подкисленного несколькими каплями уксусной кислоты (в щелочной среде свинец осаждает глюкозу), перемешивают, фильтруют. Исследовать можно только прозрачный фильтр. Затем трубку поляриметра наполняют прозрачным фильтратом, избегая попадания пузырьков воздуха, накрывают шлифованным стеклом, помещают в аппарат и через 2–3 мин проводят определение; это время необходимо для затихания колебаний частиц жидкости. Определение ведут строго по инструкции, прилагаемой к данному аппарату.

Точность поляриметра проверяют, исследуя стандартный раствор глюкозы, но этот раствор годен для работы только через 24 ч после его приготовления.

Примечание. Определению могут мешать р-оксимасляная кислота, препараты тетрациклинного ряда, стрептомицин.

Определение сахара в моче по цветной реакции с ортолуцидином см. Определение глюкозы в крови.

Нормальное значение. Нормальную концентрацию глюкозы в моче до 0,2 г/л обычными пробами не обнаруживают. Появление глюкозы в моче может быть результатом физиологической гипергликемии (алиментарной, эмоциональной, лекарственной).

Клиническое значение. Появление глюкозы в моче зависит от концентрации ее в крови, от процесса фильтрации в клубочках (гломерулярных клиренсов) и от реабсорбции глюкозы в канальцах нефрона. Патологические глюкозурии делятся на панкреатогенные и внепанкреатические. Важнейшая из панкреатогенных — диабетическая глюкозурия. Внепанкреатические глюкозурии наблюдаются при раздражении ЦНС, гипертиреозе, синдроме Иценко — Кушинга, патологии печени, почек. Для оценки степени выраженности глюкозурии необходимо рассчитывать потерю глюкозы с мочой за сутки.

Кетоновые тела. Унифицированная проба Ланге (1979). **Принцип.** Нитропруссид натрия в щелочной среде реагирует с кетоновыми телами (ацетоуксусной кислотой, р-оксимасляной кислотой и ацетоном) с образованием комплекса красно-фиолетового цвета.

Реактивы. 1. Натрия нитропруссид, раствор 50 г/л; готовят перед употреблением. 2. Уксусная кислота концентрированная. 3. Аммиак водный (МШОН) — 25% раствор.

Ход определения. Исследуют мочу в первые 3 ч после мочеиспускания. В пробирку к 3–5 мл мочи приливают 5–10 капель раство-

ра натрия нитропруссид и 0,5 мл уксусной кислоты, смешивают, а затем осторожно по стенке пробирки пипеткой насаивают 2—3 мл водного раствора аммиака. Пробу считают положительной, если в течение 3 мин на границе сред образуется красно-фиолетовое кольцо.

Модифицированная проба Ротеры (1979). Принцип тот же, что и в пробе Ланге.

Реактивы. 1. Натрия нитропруссид, раствор 50 г/л; готовят перед употреблением. 2. Аммония сульфат. 3. Аммиак водный (NH₃OH) — 25 % раствор.

Ход определения. Приблизительно 200 мг сухого сульфата аммония, 5 капель мочи и 2 капли раствора натрия нитропруссид тщательно смешивают в пробирке, а затем на эту смесь осторожно насаивают 10—15 капель раствора водного аммиака. При наличии кетоновых тел на границе раздела в течение 3—5 мин образуется красно-фиолетовое кольцо, интенсивность окраски которого позволяет ориентировочно судить о концентрации кетоновых тел в моче (табл. 16).

Таблица 16. Ориентировочная количественная оценка кетоновых тел в моче

Интенсивность окраски	Обнаруживаемые вещества, г/л	
	ацетоуксусная кислота	ацетон
Следы	0,05	0,2
Умеренная	0,3	2,5
Интенсивная	0,8	8

При незначительной концентрации кетоновых тел слабое кольцо может появиться на 8—10-й минуте.

Метод с готовым набором для экспресс-анализа ацетона в моче. Принцип тот же, что и в предыдущих 2 пробах.

Ход определения. На полоску фильтрованной бумаги помещают таблетку, на которую пипеткой наносят 2 капли исследуемой мочи. Через 2 мин окраску таблетки сравнивают с цветной шкалой. Наличие ацетона вызывает фиолетовое окрашивание разной интенсивности; согласно шкале, реакцию оценивают как слабо-положительную, положительную и резко положительную.

Ряд фирм выпускает экспресс-тесты для определения кетоновых тел (табл. 17); определение с помощью таких тестов проводят строго по инструкции.

Примечание. Ацетоуксусная кислота в стерильной моче стабильна до 8—10 дней, при бактериурии или большим количеством дрожжевого грибка может полностью исчезнуть в течение 24 ч. Около 20% ацетона при комнатной температуре исчезает за 24 ч, но сохраняется

в холодильнике; Кетоновые тела могут исчезать из мочи и *in vivo* при бактериурии.

Нормальные величины. В норме с мочой выделяется 20—50 мг кетоновых тел за 24 ч.

Клиническое значение. Чаще всего кетонурия наблюдается при диабете, что является критерием правильности подбора пищевого режима: если количество вводимых жиров не соответствует количеству усваиваемых углеводов, то увеличивается выделение кетоновых тел. При уменьшении введения углеводов (лечение без инсулина) при обычном количестве жиров начинает выделяться ацетон; при лечении инсулином уничтожение глюкозурии достигается лучшим усвоением углеводов и не сопровождается кетонурией. Таким образом, обнаружение кетоновых тел в моче больных диабетом необходимо для регулирования диеты.

Литература. Меншикова В. В., Вайнштейн Т. Я — Лаб. дело, 1984, № 2, с. 84; Методические рекомендации по применению экспресс-тестов (сухих диагностических проб) в медицинской практике.— М., 1977; Henry R. I. Clinical chemistry. Principles and technics.— New York, 1964, p. 689—698.

ЖЕЛЧНЫЕ ПИГМЕНТЫ. БИЛИРУБИН. Большинство качественных проб для обнаружения билирубина в моче основано на его превращении под действием окислителя в зеленый биливердин или пурпурно-красные билипурпурины, которые, примешиваясь к биливердину, дают синее окрашивание.

Унифицированная проба Фуше (1972). Реактив Фуше: 25 г трихлоруксусной кислоты растворяют в 100 мл дистиллированной воды и приливают 10 мл 10 % раствора хлорного железа (FeCl₃).

Ход определения. К 10 мл мочи прибавляют 5 мл 15 % раствора хлорида бария. Смешивают, фильтруют. На вынутый из воронки и расправленный на дне чашки Петри фильтр наносят 2 капли реактива Фуше. Появление на фильтре сине-зеленых пятен говорит о присутствии билирубина. Если реакция мочи щелочная, то необходимо подкислить ее несколькими каплями уксусной кислоты.

Унифицированная проба Резина (1972). Реактив: 1% спиртовой раствор йода.

Ход определения. В пробирку наливают 4—5 мл мочи и осторожно по стенкам пробирки насаивают раствор йода. Появление на границе между жидкостями зеленого кольца говорит о наличии билирубина:

Проба Готфрида. Принцип. Билирубина глюкуронид (холебилирубин) при соединении с диазотированной сульфаниловой кислотой (диазобензосульфоновая кислота) дает розовую окраску за счет образования билирубина.

Реактивы. 1. 10% раствор хлорида бария. 2. Диазореактив: а) диазораствор 1: 5 г сульфаниловой кислоты растворяют в небольшом количестве воды, прибавляют 15 мл концентрированной HCl и доливают до 1000 мл дистил-

Таблица 17. Экспресс-тесты для обнаружения кетоновых тел в моче

№ п/п	Наименование экспресс-теста	Фирма	Форма выпуска	Время проведения пробы	Другие показатели, определяемые этим тестом
Монотесты					
1	Набор для экспресс-анализа ацетона в моче	СССР («Реагент», Рига)	Таблетки	2 мин	—
2	Reagnost-Tabletten zum Nachweis von Azeton-Körpern im Harn	ГДР, «Feinchemie»	»	60 с	—
3	Keto-Merkognost	ФРГ, «Merck»	Реактивные полоски	15 »	—
4	Ketur-test	ФРГ, «Boehringer Mannheim»	То же	60 »	—
5	Ketostix	«Ames», США с филиалами в других странах	Таблетки	15 »	—
6	Acetest	То же	»	30 »	—
Полигесты					
7	Multistix	» »	Реактивные полоски	15 с	Уробилиноген, билирубин, глюкоза, белок, pH, кровь
8	Bili-Labstix	» »	Реактивные полоски	15 с	Билирубин, белок, глюкоза, кровь, pH
9	Labstix	» »	То же	15 »	Белок, глюкоза, кровь, pH
10	Combur-test	ФРГ, «Boehringer Mannheim»	» »	30—60 с	Белок, глюкоза, уробилиноген, кровь, pH
11	Gluketur-test	То же	» »	60 с	Глюкоза

лированной водой; б) диазораствор II: 0,5 % раствор нитрата натрия. Непосредственно перед определением смешивают 10 мл диазораствора I и 0,25 мл диазораствора II, 3. Спирт этиловый 96 %, 4. 6 % раствор двузамещенного фосфата натрия.

Ход определения. К 10 мл мочи, подкисленной несколькими каплями уксусной кислоты, прибавляют 5 мл 10 % раствора хлорида бария, перемешивают, фильтруют через бумажный фильтр. Фильтр раскладывают на дне чашки Петри и на осадок, содержащий билирубин, капают 1—2 капли свежеприготовленной диазосмеси, 4 капли спирта и 1 каплю двузамещенного фосфата натрия. При положительной пробе получается красно-фиолетовая окраска.

Принцип описанной пробы лег в основу экспресс-тестов для определения билирубина, выпускаемых зарубежными фирмами «Ames» (Англия), «Boehringer» (ФРГ) и др.

Нормальные значения. Моча, здоровых людей содержит минимальные количества билирубина, которые не могут быть обнаружены качественными пробами, применяемыми в практической медицине. С мочой выделяется только билирубина глюкуронид (прямой билирубин), концентрация которого в норме в крови незначительна.

Клиническое значение. Билирубинурно наблюдают главным образом при поражениях паренхимы печени (паренхиматозные желтухи) и нарушении оттока, желчи (обтурационные желтухи). Для гемолитической желтухи билирубинурия нехарактерна, так как гемобилирубин (непрямой билирубин) не проходит через почечный фильтр;

УРОБИЛИНОИДЫ. Унифицированная проба Флорамса (1979). Принцип НСI уробилин образует соединение, окрашенное в красный цвет.

Реактивы. 1. Серная кислота концентрированная. 2. Диэтиловый эфир. 3. HCl концентрированная.

Ход исследования. Мочу в количестве 8—10 мл подкисляют в пробирке 8—10 каплями концентрированной серной кислоты, перемешивают, затем приливают 2—3 мл эфира и, закрыв пробирку пробкой, несколько раз осторожно пропускают эфир через слой мочи для экстрагирования уробилина. Затем эфирную вытяжку мочи настилают, лучше пастеровской пипеткой, на 2—3 мл концентрированной HCl, налитой в другую пробирку. При наличии уробилина на границе жидкостей образуется розовое кольцо. Интенсивность окраски пропорциональна количеству уробилина.

Оценка результата. Проба настолько чувствительна, что даже в норме на границе между двумя жидкостями видно легкое розовое окрашивание. Этой пробой можно установить полное отсутствие уробилиноидов в моче.

Унифицированная проба Богомолва (1979). Принцип. Уробилин с сульфатом меди образует соединение красно-розового цвета.

Реактивы. 1. Меди сульфат ч. д. а., насыщенный раствор: 23 г $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ растворяют в 100 мл дистиллированной воды. 2. Хлороформ.

Ход исследования. К 10—15 мл мочи приливают 2—3 мл насыщенного раствора сульфата меди. Если образуется помутнение, то прибавляют несколько капель концентрированной HCl до прояснения раствора. Через 5 мин приливают 2—3 мл хлороформа и, закрыв пробирку пробкой, несколько раз встряхивают.

Оценка результатов. Если хлороформ окрашивается в розовый цвет, то концентрация уробилина в моче выше нормальной.

Унифицированная бензальдегидная проба Нейбауэра (1979). Принцип. Проба основана на том, что уробилиногеновые тела с парадиметяламинобензальдегидом (реактив Эрлиха) дают соединение красной окраски.

Реактив. Реактив Эрлиха: 2 г пара-диметяламинобензальдегида растворяют в 100 мл 20% раствора HCl кислоты.

Ход исследования. К 3—4 мл свежесвыщущенной мочи, охлажденной до комнатной температуры, прибавляют 3—4 капли реактива Эрлиха (1 каплю на 1 мл мочи). Окрашивание жидкости в красный цвет в течение первых 30 с говорит об увеличенном содержании уробилиногена в моче; если окрашивание развивается по прошествии 30 с, то концентрация уробилина в моче нормальная, а если через 30 с окраска не развивается, то это может быть вариантом нормы или говорить о полном отсутствии уробилиногена в моче.

Примечание. Билирубин мешает определению уробилиноидов, поэтому, если он обнаружен в моче, его следует предварительно удалить, осаждая хлоридом бария с последующим фильтрованием, для этого к 10—12 мл мочи-приливают 5—6 мл 10% раствора BaCl_2 и фильтруют. Затем фильтрат проверяют на полноту осаждения билирубина и процедуру повторяют, если первое осаждение было, неполным.

Унифицированный метод с пара-диметяламинобензальдегидом (1979). Принцип. Уробилиноген с пара-диметяламинобензальдегидом образует комплекс, окрашенный в красный цвет, интенсивность окраски пропорциональна содержанию уробилиногена. Для восстановления уробилина в уробилиноген используют аскорбиновую кислоту и гидрат окиси железа. Для увеличения специфичности реакции добавляют ацетат натрия.

Реактивы. 1. 4-Диметяламинобензальдегид (пара-диметяламинобензальдегид). 2. HCl концентрированная х. ч. 3. Реактив Эрлиха; 0,7 г пара-диметяламинобензальдегида растворяют в 150 мл концентрированной HCl, приливают к 100 мл дистиллированной воды и смешивают. Раствор должен быть бесцветным или слегка желтоватым. Хранят в посуде из темного стекла. Реактив стабилен. 4. Натрия ацетат ч. д. а., х. ч., насыщенный раствор: 375 г $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (или 226 г CH_3COONa) растворяют в 250 мл теплой дистиллированной воды, охлаждают до комнатной температуры. Хранят при температуре 20 °C. Раствор должен быть бесцветным и прозрачным. 5. Аскорбиновая кислота. 6. Натр едкий: 0,5 г/л раствора. 7. Бария хлорид, 100 г/л раствора. 8. Фенолсульфогфталейн (феноловый красный). Используют для приготовления калибровочного раствора. 9. Основной калибровочный раствор: 20 мг фенолсульфогфталейна растворяют в 100 мл 0,5 г/л раствора едкого натра. Стабилен при хранении. Рабочий калибровочный раствор готовят разведением основного раствора 0,5 г/л раствором едкого натра в 100 раз. Стабилен в течение недели с условием хранения при 20 °C. Рабочий раствор содержит 0,2 мг фенолсульфогфталейна в 100 мл и эквивалентен по окраске раствору уробилиногена — 0,345 мг/100 мл. Точность приготовления можно проверить измерением оптической плотности раствора на спектрофотометре: при длине волны 562 им оптическая плотность раствора должна быть 0,380—0,390.

Специальное оборудование: фотозлектроколориметр или спектрофотометр.

Подготовка образца. Исследование проводят в первые 2—3 ч после мочеиспускания. При наличии мутности мочу центрифугируют, а затем проводят качественное определение билирубина. Если обнаруживают билирубин, то 8 мл мочи смешивают с 2 мл 100 г/л раствора хлорида бария и фильтруют через бумажный фильтр. Конечный результат умножают на 1,25, чтобы внести поправку на разведение.

Ход определения. 100 мг аскорбиновой кислоты растворяют в 10 мл исследуемой мочи и помешают по 1,5 мл в 2 пробирки для опытной и холостой пробы. В пробирку с холостой пробой прибавляют 4,5 мл свежеприготовленной смеси одного объема раствора Эрлиха и двух объемов насыщенного раствора ацетата натрия. В пробирку с опытной пробой прибавляют 1,5 мл раствора Эрлиха и немедленно приливают 3 мл насыщенного раствора ацетата натрия. Через 5 мин измеряют экстинкцию обеих проб против воды на ФЭК при длине волны

500 - 590nm (зеленый светофильтр) В кювете с толщиной слоя 1 см на спектрофотометре при длине волны 562nm. Рабочий калибровочный раствор измеряют при тех же условиях, что и опытную пробу.

Результаты выражают в единицах Эрлиха (1 ед. соответствует 1 мг уробилиногена). Концентрацию уробилиногена выражают количеством единиц Эрлиха в 100 мл мочи (Ед.).

Расчет производят по формуле:

$$E_{дз} = \frac{E_0 - E_x}{E_k} \cdot 0,346 \cdot \frac{6,0}{1,5} = \frac{E_0 - E_x}{E_k} \cdot 1,38,$$

где "E₀" — экстинкция опытной пробы; E_x — экстинкция холостой пробы; E_k — экстинкция калибровочной пробы; 0,346 — концентрация уробилиногена в растворе (0,346 мг/100 мл), окраска которого эквивалентна окраске калибровочного раствора фенолфталеина; 6,0 — объем пробы (мл); 1,5 — количество мочи в пробе (мл). Соотношение ингредиентов при определении уробилиногена в моче представлено в табл. 18.

Таблица 18. Соотношение ингредиентов (в миллилитрах) при определении уробилиногена в моче

№ п/п	Компоненты	Проба		
		опытная	холодная	калибровочная
1	10 мл мочи + 100 мг аскорбиновой кислоты	1,5	1,5	—
2	Реактив Эрлиха	—	1,5	—
3	Насыщенный раствор ацетата натрия	—	3,0	—
4	Смесь компонентов 2 и 3 в соотношении 1:2	4,5	—	—
5	Рабочий калибровочный раствор	—	—	6,0

Примечания. 1. Рекомендуется собирать мочу в посуду из темного стекла, так как при дневном свете окисление уробилиногена происходит значительно быстрее.

2. Для расчета выделения уробилиногена за определенное время для исследования надо брать мочу из всего собранного за это время объема и, учитывая его, провести расчеты по формуле:

$$\frac{E_0 - E_x}{E_k} \cdot 1,38 \cdot \frac{V}{100},$$

где V — объем мочи (в мл) выделенный за определенный промежуток времени; T —

коэффициент для расчета количества уробилиногена в 1 мл мочи.

Нормальные величины. В моче здорового человека содержатся следы уробилиногена, а за сутки выделяется не больше 6 мг, у детей не более 2 мг.

Клиническое значение. В свежесобранной моче содержится уробилиноген, который при стоянии мочи окисляется в уробилины. Все эти вещества являются производными билирубина и называются уробилиноидами. Уробилиноиды образуются под действием ферментов бактерий и клеток слизистой оболочки кишечника из билирубина, выделившегося с желчью. Уробилиноидурия является одним из характерных симптомов поражения паренхимы печени (гепатиты, циррозы), гемолитических состояний и заболеваний кишечника (энтериты, склонность к запорам, кишечная непроходимость). Полное отсутствие уробилиноидов говорит о полном нарушении поступления желчи в кишечник.

Литература. Henry R. J., Cannon D. C., Winkelman J. W. Clinical chemistry. Principles and technics.— New York, 1974, p. 1354—1369; Terwen A. G. L. Dtsch. Arch. Klin. med., 1925, H. 149, S. 72.

ПОРФОБИНОГЕН. Унифицированный метод с пара-диметиламинобензальдегидом (1979). Принцип. Порфобилиноген (ПБГ) реагирует с пара-диметиламинобензальдегидом с образованием окрашенного в красный цвет соединения. Для повышения специфичности реакции добавляют ацетат натрия. Соединения, дающие аналогичную реакцию с пара-диметиламинобензальдегидом (уробилиноген, производные индола, скатола и др.), удаляют путем экстракции хлороформом и бутанолом, в которых ПБГ нерастворим.

Реактивы. 1. 4-(Диметиламино)-бензальдегид (пара-диметиламинобензальдегид). 2. HCl кислота концентрированная х. ч. 3. Реактив Эрлиха: 0,7 г пара-диметиламинобензальдегида растворяют в 150 мл концентрированной HCl кислоты, приливают к 100 мл дистиллированной воды и смешивают. Раствор должен быть бесцветным или слегка желтым. Хранят в посуде из темного стекла. Реактив стабилен. 4. Натрия ацетат х. ч. или ч. д. а., насыщенный раствор: 375 г CH₃COONa · 3H₂O (или 226 г CH₃COONa) растворяют в 250 мл теплой дистиллированной воды, охлаждают до комнатной температуры. Хранят при температуре 20 °C. Раствор должен быть бесцветным и прозрачным. 5. Хлороформ. 6. Бутиловый спирт. 7. Бумага индикаторная для измерения pH (в интервале 4,0—5,0).

Ход обнаружения и оценка результатов. Исследуют мочу в первые 2—3 ч после мочеиспускания. Смешивают в пробирке 2,5 мл реактива Эрлиха и 2,5 мл мочи. Добавляют 5 мл насыщенного раствора ацетата натрия и перемешивают. Измеряют pH индикаторной бумагой; pH должен быть в интервале 4,0—5,0. Если pH меньше 4,0, то добавляют раствор ацетата натрия до установления нужного pH. Если окраска не развивается, результат считают отрицательным. При развитии розовой или красной окраски к пробе добавляют 5 мл хлороформа

и встряхивают. Если окраска переходит в слой хлороформа, а верхний слой остается бесцветным или слегка желтоватым, то результат следует считать отрицательным. Если окраска остается в слое над хлороформом, то 6—8 мл из окрашенного слоя переносят в другую пробирку, добавляют бутиловый спирт в соотношении 1:2 и встряхивают. Если фазы не сразу разделяются, то смесь центрифугируют при переходе окраски в слой бутилового спирта — результат отрицательный, если же окраска остается в исследуемом слое, то в исследуемой моче концентрация ПБГ превышает нормальную.

Нормальные величины. Если концентрация ПБГ в моче нормальна (до 2 мг/л), то проба отрицательная: ПБГ данным методом обнаруживают при концентрации выше 6 мг/л.

Примечание. При хранении мочи более 3 ч при комнатной температуре положительная реакция может стать отрицательной. Это можно объяснить превращением порфириногена в порфирин и образованием ингибиторов реакции. Если нет возможности исследовать мочу в первые 2 ч, то хранить ее надо в холодильнике при 4 °С, доведя рН мочи до 6,0—7,0, так как в этих условиях порфириноген стабилен длительное время.

Литература. *Идельсон Л. И.* Нарушение порфиринового обмена в клинике.— Л.: Медицина, 1968; *Пименова Л. М.*, В кн.: Унификация лабораторных методов исследования. Вып. VIII.— М., 1978; *Henry R. I., Cannon D. C., Winkelmann J.* Clinical chemistry. Principles and technics.— New York, 1974, p. 1251—1263; *Pierack C. A., Cardinal R., Bossenmaier I., Watson C. J.* Clin. Chem., 1977, vol. 23, p. 1666.

2.1.3. Скрининг-тесты для выявления наследственных или приобретенных нарушений обмена веществ у детей

Приведенные ниже тесты унифицированы в 1979 г.

Исследуют утреннюю порцию мочи.

ОБНАРУЖЕНИЕ БЕЛКА. Проба с бромфеноловым синим. Принцип. Изменение окраски индикатора в присутствии белка.

Реактивы. 1. 5,5-Диэтилбарбитуровой кислоты натриевая соль (меднал). 2. Натрия ацетат ($\text{NaOOCCH}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$). 3. HCl 0,1 моль/л. 4. Варбитал-ацетатный буфер рН 8,6; 8,6 г медианала и 6,48 г ацетата натрия растворяют в 100 мл воды; добавляют 60 мл HCl и доводят до 1 л воды. 5. Бромфеноловый синий водорастворимый. 6. Цийка сульфат ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$). 7. Раствор индикатора: 0,5 г бромфенолового синего и 50 г сульфата цинка растворяют в 1 л воды. 8. Уксусная кислота: к 1 мл концентрированной уксусной кислоты добавляют 99 мл воды. 9. Раствор альбумина: 10 г альбумина растворяют в 1 л изотонического раствора хлорида натрия (9 г/л). Рабочие растворы альбумина готовят путем разведения основного раствора в 2; 4; 8 и 16 раз водой. 10. Натр едкий 0,02 моль/л.

Ход исследования. На фильтровальную бумагу, предварительно пропитанную барбиталацетатным буфером и высушенную, наносят 0,02 мл исследуемой мочи. После высушивания бумагу с нанесенной пробой окрашивают индикатором, а избыток краски отмывают раствором уксусной кислоты в течение 5—7 мин.

Оценка результатов. Результат оценивают визуально, сравнивая окраску в опыте с окраской, которую дают стандартные растворы альбумина, обработанные так же, как и опытная проба. Метод позволяет обнаружить в моче белок, содержание которого составляет 2 мкг в пробе.

Нормальные величины. В норме белок в моче не обнаруживается.

Проба на гипераминиацидурно. Принцип. Аминокислоты при нагревании с нингидрином образуют соединения, окрашенные в синефиолетовый цвет.

Реактивы. 1. Нингидрии. 2. Ацетон. 3. Уксусная кислота (ледяная). 4. Раствор нингидрина: 5 г нингидрина на 1 л смеси. К 0,5 г нингидрина прибавляют 95 мл ацетона, 1 мл ледяной уксусной кислоты и 4 мл дистиллированной воды. 5. Гликокол (глицин). 6. Раствор глицина: 150 мг глицина растворяют в 100 мл дистиллированной воды; 1 мл раствора содержит 1,5 мг глицина, что соответствует 0,28 мг аминокислоты. Из данного раствора глицина готовят серию разведений: 1; 3; 6; 9; 18; 24; 36; 54 мл раствора глицина доводят до 100 мл водой. Приготовленные растворы соответствуют 0,28; 0,84; 1,68; 2,52; 5,04; 6,72; 10,08; 16,12 мг аминокислоты в 100 мл. Растворы стабильны при хранении в холодильнике в течение 1 мес.

Ход исследования. На фильтровальную бумагу наносят 0,02 мл мочи и после подсушивания окрашивают раствором нингидрина, затем высушивают на воздухе до полного исчезновения запаха уксусной кислоты и помещают в сушильный шкаф при температуре 60 °С на 15 мин.

Оценка результатов. Окраску опыта сравнивают с окраской стандартных растворов глицина, обработанных так же, как образец мочи, для чего берут по 0,02 мл каждого раствора. Результаты выражают в миллиграммах аминокислоты, выделенного с мочой за сутки.

Нормальные величины. Выделение аминокислот за сутки у детей не превышает 1—2 мг/кг. В ночное время выделяется $\frac{2}{3}$ — $\frac{1}{3}$ суточного количества аминокислоты.

Клиническое значение. Гипераминиацидурно возникает при наследственной (синдром Дебре — де Тони — Фанкони) и приобретенной (гломерулонефрит) патологии в почках, а также при некоторых заболеваниях печени. Для выяснения причины гипераминиацидурно необходимо определение концентрации аминокислот в крови и моче и вычисление их клиренса.

Обнаружение цистина и гомоцистина. Принцип. Азид натрия и йод образуют комплекс бурого цвета, который обесцвечивается в присутствии цистина и гомоцистина.

Реактивы. 1. Натрия азид. 2. Йод кристаллический. 3. Раствор йода: 12,69 г кристаллического йода отвешивают в бюксе, растворяют в насыщенном растворе йодида калия (37 г KI в 26 мл дистиллированной воды), переносят в колбу и доливают дистиллированной водой до 1 л. Можно использовать фиксанал йода 0,1 н. 4. Этиловый спирт 96 %, 5. Раствор азид натрия: 1,5 г азид натрия растворяют в 50 мл раствора йода и доводят объем этиловым спиртом до 100 мл. Раствор хранят в посуде темного стекла в холодильнике.

Ход исследования. Каплю мочи наносят на фильтровальную бумагу и после высушивания добавляют 1 каплю раствора азид натрия. В течение 5 мин наблюдают за исчезновением бурой окраски.

Оценка результатов. По времени исчезновения окраски судят о наличии аминокислот в исследуемой моче. Для полуколичественной оценки результатов окраску пробы можно сравнивать с цветной шкалой, для получения которой готовят раствор цистина и гомоцистина, содержащий 0,6 мг каждой аминокислоты в 1 мл. Из этого раствора готовят растворы с содержанием аминокислот от 0,6 до 0,3 мг/мл. Нижняя граница чувствительности пробы 0,3 мг/мл.

Нормальные величины. Бурая окраска исчезает через 2–3 мин после добавления азид натрия.

Примечание. Ложноположительную реакцию дают ангидрид аргининянтарной кислоты, ацетон, некоторые лекарственные препараты.

Клиническое значение. Тест положителен при наследственной или приобретенной цистинурии или гомоцистинурии, в этом случае окраска остается более 5 мин.

Обнаружение пролина и других аминокислот. Принцип. Изатин образует с некоторыми аминокислотами специфически окрашенные соединения.

Реактивы. 1. Изатин. 2. Ацетон. 3. Раствор изатина в ацетоне 0,2 г/л. Раствор хранят в холодильнике при температуре 4 °С. 4. Соляная кислота 1 моль/л.

Ход обнаружения. Фильтровальную бумагу пропитывают раствором изатина в ацетоне и высушивают. Затем наносят на нее 1 каплю мочи и высушивают при 100 °С в течение 10 мин, смачивают раствором соляной кислоты и промывают водой.

Оценка результатов. Сине-серую окраску дает повышенное содержание фенилаланина, коричневую — триптофан, пурпурную — смесь различных аминокислот, а появление синей окраски в виде ободка свидетельствует о присутствии в моче свободного пролина (не менее 0,1 мг/мл). Можно сравнивать интенсивность окраски с цветной шкалой. Для приготовления стандартных растворов, содержащих от 0,1 до 0,5 мг/мл соответствующих аминокислот, используют растворы аминокислот с исходной концентрацией 0,5 мг соответствующей аминокислоты в 1 мл раствора.

Клиническое значение. Пролинурия возможна при патологии почек и как симптом наследственного нарушения обмена.

Обнаружение мтокслот (проба с треххлористым железом). При и ц.п, Треххлористое железо в присутствии HCl дает с кетокислотами специфически окрашенные соединения.

Реактивы. 1. Железо треххлористое (FeCl₃·6H₂O), 10 % раствор. 2. HCl, 10% раствор. 3. Аммиак водный концентрированный. 4. Магния хлорид (MgCl₂·6H₂O): к 11 г хлорида магния прибавляют 20 мл концентрированного водного аммиака и объем доводят водой до 1 л.

Ход обнаружения. Вариант I: к 0,5 мл мочи добавляют 0,25 мл раствора треххлористого железа, при положительной реакции появляется темно-зеленый осадок. Вариант II: для свывания фосфатов, мешающих реакции, к 4 мл мочи прибавляют 1 мл раствора хлорида магния, перемешивают и через 5 мин фильтруют, К фильтрату добавляют по 2 капли раствора соляной кислоты и раствора треххлористого железа; 5 мин наблюдают развитие окраски.

Оценка результатов. О наличии кетокислот судят по характеру окраски, но окраска может развиваться и за счет других соединений (табл. 19).

Таблица 19. Цветная реакция различных соединений с треххлористым железом

Окраска	Соединения
Желтая	Пировиноградная и α-кетонзавалериановая кислоты
Желтая, быстро исчезающая	Пара-оксифенилпировиноградная и гомогентизиновая кислоты
Зеленая или синезеленая	Фенилпировиноградная и имидазолпировиноградная кислоты
Сине-зеленая	Билирубин
Темно-зеленая, переходящая в коричневую	Ксантуреновая кислота
Красно-коричневая	Ацетоуксусная и пара-аминосалициловая кислоты
Красно-коричневая с переходом в зелено-синюю	Ванилиновая кислота
Розово-лиловая	Орто-оксифенилуксусная кислота
Пурпурная	Салицилаты, производные фенотиазина
Пурпурная, переходящая в красно-коричневую	α-Кетобутират
Быстро появляющаяся темно-коричневая	3-Оксиантраниловая кислота
Сероватая с зеленым оттенком	α-Кетонзавалериановая, α-кетометилмалоновая кислоты

Обнаружение кетокислот по реакции с 2,4-динитрофенилгидразином. Принцип. Кето-кислоты образуют с 2,4-динитрофенилгидразином окрашенные гидразоны.

Реактивы. 1. HCl, 2 моль/л. 2. 2,4-Динитрофенилгидразин (2,4-ДНФГ): 2 г 2,4-ДНФГ растворяют в 1 л 2 моль/л HCl. 3. Диэтиловый эфир. 4. Натрия карбонат (Na_2CO_3), 100 г/л.

Ход обнаружения. Смешивают 1 мл раствора 2,4-ДНФГ и 0,25 мл мочи. Через 10 мин прибавляют 1,25 мл диэтилового эфира и перемешивают, эфирный слой отсасывают и переносят в пробирку, куда добавляют равный объем раствора натрия карбоната. Содержимое пробирки перемешивают.

Оценка результатов. При положительной пробе развивается окраска от желтой до оранжево-коричневой. В норме проба отрицательная, окраска не развивается.

Обнаружение гомогентизиновой кислоты. Принцип. В щелочной среде гомогентизиновая кислота окисляется с образованием соединений сине-фиолетового цвета.

Реактив: едкий натр, 100 г/л.

Ход обнаружения. К 0,5 мл мочи прибавляют 3–4 капли раствора едкого натра, результат оценивают через 1–2 мин.

Оценка результатов. При положительной реакции развивается сине-фиолетовое окрашивание, при отрицательной — окраска не возникает.

Клиническое значение. Кетокислоты в большом количестве выделяются с мочой при нарушении различных обменных процессов, в частности цикла Кребса; производные фенетиазида или салицилата — при отравлениях ими, 3-оксантранилаовая кислота — при нарушениях обмена триптофана.

Обнаружение индикана. Принцип. Превращение индикана в индоксил после гидролиза эфирной связи сильной минеральной кислотой и последующее окисление индоксила треххлористым железом с образованием окрашенного соединения.

Реактивы. 1. Свинца ацетат ($\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2$)₂РbХ (X ZnO), 100 г/л раствора. 2. HCl концентрированная. 3. Железо треххлористое ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$). 4. Реактив Обермейра: 0,4 г треххлористого железа растворяют в 100 мл концентрированной HCl. 5. Хлороформ. 6. Натрия тиосульфат ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot \text{X}5\text{H}_2\text{O}$), 200 г/л раствора.

Ход обнаружения. К 4 мл мочи прибавляют 0,4 мл раствора ацетата свинца для осаждения желчных пигментов, солей и других веществ, мешающих реакции. Фильтруют, 1–2 мл фильтрата смешивают с равным объемом реактива Обермейра, прибавляют 0,5–1 мл хлороформа и осторожно перемешивают.

Если слой хлороформа окрашивается в синий или красный цвет, его отсасывают и добавляют к нему 2–3 капли тиосульфата натрия.

Оценка результатов. При положительной реакции окраска хлороформа не исчезает после добавления тиосульфата натрия. В норме реакция отрицательная.

Обнаружение фруктозы (проба Селиванова) Принцип. При нагревании фруктозы резорцином в кислой среде образуются соединения, окрашенные в красный цвет.

Реактивы. 1. HCl, 1 моль/л. 2. Резорцин: 5 г в 1 л, 1 моль/л раствора HCl.

Ход обнаружения. К 2 мл мочи приливают 1 мл раствора резорцина и нагревают до закипания.

Оценка результата. При положительной пробе развивается интенсивное красное окрашивание. В норме окраска не появляется.

Примечание. Оценку пробы проводят с моментом закипания, так как при длительном кипении окраска может развиваться при наличии глюкозы. Пищевая нагрузка медом и фруктами может дать положительную пробу.

Обнаружение лактозы и мальтозы (проба Велька). Принцип. Лактоза и мальтоза в щелочной среде при нагревании с аммиаком образуют окрашенные соединения.

Реактивы. 1. Аммиак водный концентрированный. 2. Кали едкое, 200 г/л раствора.

Ход обнаружения. К 5 мл мочи приливают 2,5 мл аммиака и 0,2 мл раствора едкого кали. Нагревают на водяной бане 30 мин при 60 °С.

Оценка результатов. При положительной реакции на лактозу появляется коричневая окраска, а при наличии Мальтозы — красная окраска. В норме окраска не развивается.

Обнаружение пентоз (проба Биалья). Принцип. Пентозы с орцином и треххлористым железом при нагревании в кислой среде образуют окрашенные соединения.

Реактивы. 1. 5-Метилрезорцин (орин) 2. HCl концентрированная. 3. Железо треххлористое ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), 100 г/л раствора. 4. Реактив Биалья: 1 г орцина растворяют в 500 мл HCl кислоты и добавляют 1 мл раствора треххлористого железа.

Ход обнаружения. Нагревают 1 мл мочи до кипения с 5 мл реактива Биалья.

Оценка результатов. При положительной пробе появляется яркая желто-зеленая окраска. В норме проба отрицательная.

Клиническое значение. Обнаружение глюкозы, фруктозы, пентозы, лактозы и мальтозы в моче может быть результатом врожденных ферментопатий, а лактоза и мальтоза могут быть обнаружены при нарушении их гидролиза в тонкой кишке.

Обнаружение гликозоанномаканов {проба с цетилтриметилламония бромидом), Принцип. Цетилтриметилламоний бромид (ЦТАБ) с гликозаминогликанами образует в кислой среде белый осадок.

Реактивы. 1. Лимонная кислота. 2. Едкий натр. 3. Цитратный буфер, 1 ммоль/д, pH 5,7: в небольшом количестве воды растворяют 210 г лимонной кислоты, добавляют 120 г едкого натра, растворяют, охлаждают и доливают водой до 1 л. 4. Раствор ЦТАБ, 25 г в 1 л цитратного буфера.

Ход обнаружения. К 5 мл мочи приливают 1 мл раствора ЦТАБ и в течение 30 мин

наблюдают образование осадка. Пробу проводят при комнатной температуре, для исследования берут свежесывленную мочу.

Оценка результатов. Проба считается положительной при образовании осадка. В норме проба отрицательная.

Примечание. Следует учитывать, что проба дает 40 % ложноположительных результатов.

Определение кальция (проба Сулковича). Принцип. Ионы кальция со шавелевой кислотой образуют нерастворимую шавелево-кальциевую соль.

Реактивы. 1. Шавелевая кислота. 2. Аммония оксалат. 3. Уксусная кислота ледяная. 4. Реактив Сулковича: в 50 мл дистиллированной воды растворяют по 2,5 г шавелевой кислоты и оксалата аммония, добавляют 5 мл ледяной уксусной кислоты и доводят объем раствора до 150 мл.

Ход исследования. Смешивают по 0,5 мл мочи и реактива Сулковича. Через 1—2 мин оценивают степень помутнения.

Оценка результатов. Степень помутнения оценивают визуально: 0— отсутствие помутнения; 1— слабое помутнение; 2— умеренное помутнение; 3— значительное помутнение; 4— резко выраженное помутнение. О повышенном содержании кальция в моче свидетельствуют 3-я и 4-я степени помутнения.

Клиническое значение. Высокое содержание кальция в моче может быть при гипервитаминозе D и гиперпаратиреозе.

После выявления положительных результатов описанных выше тестов больной ребенок нуждается в тщательном обследовании с помощью точных количественных методов (аминокислотный анализатор, высоковольтный электрофорез с последующей хроматографией кислот на бумаге, исследование гормонального профиля и др.) в специализированных учреждениях.

Литература. Ранее Л., Тодоров И., Статева С. Обмен веществ в детском возрасте.— София, 1967; Файбель Г. Капельный анализ органических веществ.— М., 1962; Файбель Г. Капельный анализ неорганических веществ.— М., 1974.

2.1.4. Микроскопия осадка мочи

Микроскопия нативного препарата. Принцип. Микроскопическое исследование нативных препаратов мочевосадка, полученного при центрифугировании мочи.

Оборудование. 1. Центрифуга. 2. Микроскоп. 3. Центрифужные пробирки. 4. Предметные и покровные стекла.

Ход исследования. Приготовление препаратов: в центрифужную пробирку помещают 10 мл из утренней порции мочи после тщательного ее перемешивания. Центрифугируют 5 мин при 2000 об/мин. Затем быстрым наклоном пробирки сливают прозрачный верхний слой, а оставшийся осадок переносят

пипеткой с тонко оттянутым концом на середину предметного стекла и покрывают покровным. Надо стараться перенести осадок с минимальным количеством жидкости, чтобы покровное стекло покрывало его полностью. Большая капля расплывается, колеблется, препарат становится многослойным и это затрудняет микроскопические исследования. Изучение препарата начинают с малого увеличения (8X10) для общего обзора, а более детальное изучение препарата с количественной оценкой структуры производят при большом увеличении (10X40). Если структуры встречаются в каждом поле зрения, то количественную оценку выражают их числом в поле зрения, при небольшом количестве структур, когда их встречают далеко не в каждом поле зрения, — числом в препарате.

Различают организованный и неорганизованный осадок.

ОРГАНИЗОВАННЫЙ ОСАДОК. Эритроциты имеют дискообразную форму, окрашены в характерный желто-зеленый цвет. Включения в цитоплазме отсутствуют. В концентрированной моче кислой реакции эритроциты могут приобретать звездчатую форму. При длительном пребывании эритроцитов в моче низкой относительной плотности они теряют гемоглобин и имеют вид одноконтурных или двухконтурных колец. Деление эритроцитов на измененные и неизмененные не имеет первостепенного значения для решения вопроса об источнике гематурии.

Дифференцировать эритроциты надо от дрожжевых грибов и кристаллов оксалатов округлой формы. Грибы в отличие от эритроцитов чаще овальной формы, более резко преломляют свет, имеют голубоватый оттенок и почкуются. Оксалаты обычно имеют различную величину и резко преломляют свет. Прибавление к препарату осадка капли 5 % уксусной кислоты приводит к гемолизу эритроцитов, оставляя грибы и оксалаты без изменения.

Нормальная величина. В норме эритроциты либо не встречаются, либо обнаруживаются единичные в препарате.

Клиническое значение. Гематурия может быть при поражении паренхимы почки (гломерулонефрит, пиелонефрит, опухоль и др.), при тяжелой физической нагрузке и при поражениях мочевыводящих путей (почечных лоханок, мочеточников, мочевого пузыря, уретры).

Лейкоциты в моче имеют вид небольших зернистых клеток округлой формы. При низкой относительной плотности мочи размер их увеличивается и в некоторых из них («активных») можно наблюдать броуновское движение гранул. При бактериуриях в щелочной моче лейкоциты довольно быстро разрушаются. Лейкоциты в моче главным образом представлены нейтрофилами, но иногда можно обнаружить лимфоциты и эозинофилы, которые отличаются обильной, равномерной, крупной, преломляющей свет зернистостью. **Активные лейкоциты**, так называемые клетки Штернгеймера — Мальбина (Ш.— М.), можно выявить следующим образом.

1. Реактив Штернгеймера — Мальбина, Раствор I: 3 г генцианового фиолетового,

20 мл этилового спирта, 0,8 г оксалата аммония, 80 мл дистиллированной воды. Раствор II: 0,25 г сафранина, 10 мл этилового спирта, 100 мл дистиллированной воды. Рабочий раствор: 3 части раствора I+97 частей раствора II. Сохраняется в течение 3 мес.

Ход определения. Центрифугируют свежую утреннюю мочу. К осадку прибавляют 1—2 капли реактива, размешивают, каплю берут на стекло, покрывают покровным и микроскопируют. При этом различают два вида лейкоцитов: одни имеют ядра пурпурно-красного цвета и бесцветную или бледно-розовую цитоплазму, другие бледно-синие, иногда бледно-фиолетовое ядро и почти бесцветную цитоплазму. Бледно-синие клетки называются клетками Ш.—М., в цитоплазме некоторых из них заметно активное движение гранул.

II. Реактив: 1) 250 мг эозина; 2) 10 мл глицерина, 3) 2 мл 1% фенола; 4) 0,5 мл 40% формалина, 5) 87,5 мл дистиллированной воды.

Ход определения такой же, как предыдущий. Клетки Ш.—М. не окрашиваются или имеют бледно-голубой цвет. Ядра всех остальных лейкоцитов красятся в розовый цвет.

III. Реактив: 1) 30 мл насыщенного раствора метиленового синего в абсолютном спирте; 2) 1,6 мл 1% раствора КОН; 3) 110 мл бидистиллированной воды.

Ход определения. Каплю реактива наносят на предметное стекло рядом с каплей мочевого осадка. Смешивают и микроскопируют в первые 5—10 мин. Клетки Ш.—М. бесцветные, ядра остальных лейкоцитов синего цвета.

Нормальные величины. В норме в мочевом осадке у мужчин от 0 до 3 лейкоцитов в поле зрения, у женщин — от 0 до 5 лейкоцитов в поле зрения.

Клиническое значение. Увеличение числа лейкоцитов в мочевом осадке свидетельствует о воспалительных процессах в почках или мочевыводящих путях. Наличие «активных» лейкоцитов свидетельствует об интенсивности воспалительного процесса независимо от его локализации.

Эпителиальные клетки. Эпителиальные клетки в мочевом осадке имеют различное происхождение, т. е. десквамация их происходит с органов, покрытых различными видами эпителия (многослойного плоского, переходного и кубического призматического).

Клетки плоского эпителия полигональной или округлой формы, больших размеров, бесцветные, с небольшим ядром, располагаются в виде отдельных экземпляров или пластинами.

Клетки переходного эпителия различной формы (полигональные, «хвостатые», цилиндрические, округлые) и величины, имеют желтоватую окраску, интенсивность которой зависит от концентрации мочи и наличия пигментов, содержат довольно крупное ядро. Среди клеток можно встретить двуядерные. Иногда в клетках наблюдают дегенеративные изменения в виде грубой зернистости и вакуолизации цитоплазмы.

Клетки почечного эпителия неправильной круглой формы, угловатые или четырехугольные, небольших размеров (в 1 1/2—2 раза боль-

ше лейкоцита), слегка желтоватого цвета. В цитоплазме клеток обычно выражены дегенеративные изменения: зернистость, вакуолизация, жировая инфильтрация. В результате этих изменений ядра часто не выявляются. Клетки почечного эпителия относятся к кубическому и призматическому эпителию, выстилающему почечные канальцы. Чаще они располагаются в виде групп, цепочек. В некоторых случаях встречаются в виде комплексов округлой или фестончатой формы, состоящих из большого количества клеток разной величины с явлениями жирового перерождения.

Нормальные величины. В мочевом осадке практически всегда встречаются клетки плоского и переходного эпителия от единичных в препарате до единичных в поле зрения. Единичные В препарате клетки почечного эпителия на фоне нормальной микроскопической картины мочевого осадка не дают основания говорить о патологии.

Клиническое значение. Особого диагностического значения клетки плоского эпителия, попадающие в мочу из влагалища, наружных половых органов и мочеиспускательного канала, не имеют, но если их обнаруживают расположенными пластинами в моче, взятой катетером, то это может указывать на метаплазию слизистой оболочки мочевого пузыря. Такую картину можно наблюдать при лейкоплакии мочевого пузыря и мочеточников, что рассматривают как предопухоловое состояние.

Переходный эпителий выстилает слизистую оболочку мочевого пузыря, мочеточников, почечных лоханок, крупных протоков предстательной железы и простатического отдела мочеиспускательного канала. Усиленная эксфолиация клеток этого эпителия может быть при острых воспалительных процессах мочевого пузыря и лоханок, интоксикациях, а также при мочекаменной болезни и новообразованиях мочевыводящих путей. Клетки почечного эпителия можно выявить в мочевом осадке при поражении паренхимы почек (нефритах), интоксикациях, расстройствах кровообращения.

Обнаружение клеток почечного эпителия в тесной связи с цилиндрами говорит о тяжелом поражении почек.

Цилиндры — элементы осадка. Представляют собой белковые или клеточные образования канальцевого происхождения, имеющие цилиндрическую форму и различную величину. В мочевом осадке различают следующие виды цилиндров: гиалиновые, зернистые, восковидные, эпителиальные, эритроцитарные, пигментные, лейкоцитарные.

Гиалиновые цилиндры имеют нежные контуры, прозрачны, при ярком освещении плохо заметны. На поверхности может быть легкая зернистость за счет аморфных солей или клеточного детрита. Образуются из свернувшегося белка. Появление гиалиновых цилиндров свидетельствует о развитии протеинурии, что является следствием повышенной проницаемости клубочковых капилляров. Они представляют собой коллоидную форму белка, возникающую при изменении рН.

Зернистые цилиндры имеют более резкие контуры и состоят из плотной зернистой массы желтоватого цвета.

Восковидные цилиндры имеют резко очерченные контуры и гомогенную с блеском, слегка желтоватую структуру. Образуются из уплотненных гиалиновых и зернистых цилиндров при задержке их в канальцах.

Эпителиальные цилиндры имеют четкие контуры и состоят из клеток почечного эпителия.

Эритроцитарные цилиндры желтоватого цвета состоят из массы эритроцитов, образуются при почечной гематурии.

Пигментные цилиндры могут быть обнаружены при гемоглобинурии и миоглобинурии; коричневого цвета, имеют сходство с зернистыми.

Лейкоцитарные цилиндры образуются из массы лейкоцитов, обнаруживаются при гнойных процессах в почках, пиелонефритах.

Кроме цилиндров, образованных из белка и клеток, в мочевом осадке иногда встречаются образования цилиндрической формы из аморфных солей, не имеющие практического значения. Эти образования растворяются при подогревании препарата или прибавлении к препарату капли щелочи либо кислоты.

Нормальные величины. В нормальной моче можно встретить единичные гиалиновые цилиндры (1—2 в препарате).

Клиническое значение. Цилиндрурия является симптомом поражения паренхимы почки; хотя и считают, что вид цилиндров особого диагностического значения не имеет, гиалиновые цилиндры подтверждают реальную протеинурию, а лейкоцитарные и эритроцитарные дают возможность предположить источник лейкоцитурии и гематурии.

Унифицированное определение числа форменных элементов в суточном объеме мочи по методу Каковского — Аддиса (1979). Принцип. Подсчет числа форменных элементов (эритроцитов, лейкоцитов, цилиндров) в суточном объеме мочи с помощью счетной камеры.

Специальное оборудование. 1. Микроскоп. 2. Счетная камера.

Собирание мочи. Классический вариант исследования требует строго соблюдать правила хранения мочи на протяжении длительного периода. Мочу собирают в течение суток: утром больной освобождает мочевой пузырь, а затем в течение 24 ч собирает мочу в сосуд с несколькими каплями (4—5) формалина или 2—3 кристаллами тимола, желательно хранить мочу в холодильнике.

Во избежание получения заниженных данных, обусловленных распадом форменных элементов в нейтральной (щелочной) моче или при низкой ее плотности, надо назначать больному в течение суток, предшествовавших исследованию, мясную пищу с ограничением жидкости, чтобы получить мочу кислой реакции и более высокой концентрации. Если нет возможности собрать мочу с учетом описанных условий, то можно собирать мочу 10—12 ч. В этом случае точность результата страдает, но собрать мочу легче. Собирают мочу за ночное время и организуют это следующим об-

разом: в 10 ч вечера больной освобождает мочевой пузырь, мочу выливают, и до 8 ч утра мочеиспускания не должно быть (интервал времени 10 ч); всю мочу, полученную в 8 ч утра, посылают в лабораторию для исследования. При никтурии такой вариант сбора мочи не подходит.

Ход исследования. Собранную мочу тщательно перемешивают и измеряют ее объем. Для исследования получают осадок из количества мочи, выделенной за 12 мин ($\frac{1}{5}$ ч), которое рассчитывают по формуле:

$$Q = \frac{V}{1,5}, \quad (1)$$

где Q — объем мочи, выделенной за 12 мин (мл); V — объем мочи, собранной за время исследования (мл); t — время сбора мочи (часы); 5 — коэффициент пересчета за $\frac{1}{5}$ ч.

Рассчитанное количество мочи центрифугируют в мерной центрифужной пробирке при 3500 об/мин в течение 3 мин или при 2000 об/мин в течение 5 мин, отделяют верхний слой, оставляя 0,5 мл мочи с осадком. Если осадок превышает 0,5 мл, то оставляют 1 мл мочи. Осадок тщательно перемешивают и заполняют счетную камеру. Подсчитывают отдельно количество лейкоцитов, эритроцитов, цилиндров (эпителиальные клетки не считают) и рассчитывают содержание форменных элементов в 1 мкл осадка мочи.

Расчет. Если подсчет проводят в камере Горяева, объем которой равен 0,9 мкл, то количество форменных элементов в 1 мкл определяют по формуле:

$$X = \frac{A}{0,9}, \quad (2)$$

где X — число форменных элементов в 1 мкл; A — число форменных элементов, подсчитанных во всей камере; 0,9 — объем камеры (мкл).

Для камеры Фукса—Розенталя, объем которой 3,2 мкл:

$$X = \frac{A}{3,2}. \quad (3)$$

Количество форменных элементов, выделенных с мочой за сутки, рассчитывают по формуле:

$$B = X \cdot 500 \cdot 5 \cdot 24 = X \cdot 60\,000, \quad (4)$$

если для исследования взять 0,5 мл (500 мкл) из 12-минутной порции мочи, или:

$$B = X \cdot 1000 \cdot 5 \cdot 24 = X \cdot 120\,000, \quad (5)$$

если осадок был обильным и был оставлен 1 мл (1000 мкл), где B — число форменных элементов, выделенных за сутки; X — число форменных элементов в 1 мкл мочи, оставленной для исследования с осадком; 500 или 1000 — количество мочи (мкл), оставленной с осадком из 12-минутной порции мочи. Умножение на 5 и 24 дает расчет количества клеток за 24 ч.

Нормальные величины суточной экскреции форменных элементов с мочой: до $2 \cdot 10^6$ лейкоцитов, до $1 \cdot 10^6$ эритроцитов и $2 \cdot 10^4$ цилиндров.

Примечание. Для подсчета цилиндров необходимо просмотреть не менее 4 камер с сеткой Горяева или одну камеру Фукса — Розенталя.

Унифицированное определение количества форменных элементов в 1 мл мочи методом Нечипоренко (1979). **Принцип.** Определение количества форменных элементов (эритроцитов, лейкоцитов, цилиндров) в 1 мл мочи с помощью счетной камеры.

Специальное оборудование то же.

Ход определения. Берут одноразовую порцию мочи (желательно утреннюю) в середине, мочеиспускания, определяют рН (в моче со щелочной реакцией может быть частичный распад клеточных элементов); 5—10 мл мочи центрифугируют при 3500 об/мин в течение 3 мин, отделяют верхний слой, оставляя вместе с осадком 0,5 мл (500 мкл) мочи при небольшом осадке или 1 мл (1000 мкл) — при большом. Хорошо перемешивают осадок и заполняют счетную камеру. Подсчитывают отдельно лейкоциты, эритроциты и цилиндры во всей сетке камеры.

Расчет. Рассчитывают количество клеток в 1 мкл осадка мочи по формуле (2) или (3). Установив эту величину, рассчитывают число форменных элементов в 1 мл мочи по формуле:

$$N = \frac{x \cdot 500}{V}, \quad (6)$$

если оставлено 0,5 мл (500 мкл) мочи с осадком, или:

$$N = \frac{x \cdot 1000}{V}, \quad (7)$$

если оставлен 1 мл (1000 мкл) мочи с осадком, где N — число форменных элементов в 1 мл мочи; x — число форменных элементов в 1 мкл мочи, оставленной вместе с осадком; 500 (или 1000) — объем мочи (мкл), оставленной вместе с осадком; V — количество мочи, взятой для центрифугирования.

Нормальные величины. В 1 мл мочи выделяется до 2000 лейкоцитов и до 1000 эритроцитов; цилиндры отсутствуют или обнаруживаются в количестве не более одного на камеру Фукса — Розенталя или на 4 камеры Горяева (до 20 в 1 мл).

Определение количества форменных элементов, экскретируемых с мочой за 1 мин, по методу Амбурже. Принцип. Определение количества форменных элементов, выделенных с мочой за 1 мин, с помощью счетной камеры.

Специальное оборудование то же.

Ход определения. Мочу собирают 3 ч (180 мин). Перемешивают и 10 мл центрифугируют в течение 5 мин при 2000 об/мин. Надосадочную жидкость отсасывают, оставляя 1 мл, и

после перемешивания заполняют камеру. Производят подсчет клеток в 1 мкл осадка мочи по формуле (2) или (3). Расчет числа форменных элементов, выделенных за 1 мин, проводят по формуле

$$H = x \cdot \frac{1000}{S} \cdot \frac{V}{t},$$

где H — число клеток в минутном объеме мочи; x — число клеток в 1 мкл осадка; V — объем мочи за 3 ч; S — количество мочи, взятое для центрифугирования; t — время, за которое собрали мочу, в минутах.

Нормальные величины. За 1 мин с мочой выделяется до 2000 лейкоцитов и; до 1000 эритроцитов.

Клиническое значение. Приведенные методы количественного исследования элементов мочевого осадка могут быть использованы для распознавания скрытой (не обнаруживаемой при ориентировочной микроскопии осадка) лейкоцитурии, для выяснения вопроса о преобладании лейкоцитурии или гематурии и оценки их степени, для динамического наблюдения за этими симптомами в течение терапии. В практике отечественных лечебных учреждений наиболее распространен метод Получил, разработанный А. З. Нечипоренко.

При отрицательных результатах количественного исследования лейкоцитурии у пациентов с подозрением на латентно текущий хронический пиелонефрит повторный подсчет лейкоцитов следует проводить после провокационной пробы; наибольшее распространение получил преднизолоновый тест.

Преднизолоновый тест. Принцип. Введение гормона активирует воспалительный процесс, и количество лейкоцитов в моче возрастает. Степень лейкоцитурии определяют по методу Нечипоренко до и после внутривенного введения преднизолона.

Специальное оборудование то же.

Ход исследования. Утром больной опорожняет мочевой пузырь. Мочу выливают. Через час собирают мочу (контрольная порция), после чего внутривенно вводят 30 мг преднизолона в 10 мл изотонического раствора натрия хлорида. После вливания с интервалами 1 ч собирают 3 порции мочи, подлежащие, как и контрольная порция, исследованию по Нечипоренко; следовательно, собирая мочу, берут яри мочеиспускании: только среднюю порцию. Еще раз исследуют мочу через 24 ч после вливания преднизолона.

Оценка результатов. Тест расценивают как положительный, если-хоть в одной из порций мочи количество лейкоцитов увеличивается по сравнению с исходным в 2 раза и при этом выявляют активные лейкоциты.

Экспресс-метод определения скрытой лейкоцитурии (метод Gadeholt). Принцип. При проведении пероксидазной реакции цитоплазма лейкоцита приобретает голубую или синюю окраску.

Реактив. Краситель: 300 мг диамиофлуорена и 130 мг флюксина В растворяют в 70 мл 95 % этанола. К этой смеси добавляют 1 л г

Т а б л и ц а 20. Неорганизованный осадок мочи (кристаллические образования)

№ п/п	Вещество	Внешний вид кристаллов вещества	Способы уточнения при идентификации кристаллических образований	Клиническое значение
1	Мочевая кислота $C_5H_4N_4O_6$; макроскопически в виде кирпично-красного осадка или отдельных кристаллов (только в кислой моче)	Полиморфные кристаллы, интенсивно или слабо окрашенные в желтый, а иногда в кирпично-красный цвет, могут быть и бесцветными, имеют форму точильных брусков, многоугольных табличек, игл, булав. Величина кристаллов разная, возможно расположение снопами и розетками	Кристаллы легко растворяются в щелочах, но нерастворимы в кислотах. Дают мурексидную реакцию: осадок нагревают в фарфоровой чашке с несколькими каплями концентрированной азотной кислоты. При добавлении к образовавшемуся интенсивно окрашенному желтому осадку капли аммиака появляется пурпурно-красный цвет	Появляется в осадке при высокой концентрации мочи, при повышении потливости. Может быть результатом усиленного распада клеток при разражающихся пневмониях, лейкозах, особенно в период почечной недостаточности
2	Ураты — соли мочевой кислоты: $C_5H_7N_3O_7$; $C_5H_9N_3O_7$; макроскопически осадок окрашен в розовый цвет, редко — бесцветный (только в кислой моче)	Мелкие зернышки, окрашенные пигментом, располагаются в виде кучек, полос, откладываясь на свертках слизи, образуют ложные зернистые цилиндры. Могут откладываться на цилиндрах и клетках эпителия	Быстро растворяются при подогревании, прибавлении щелочи. Для растворения используют реактив Селена: 5 г борной кислоты и 5 г буры растворяют в 100 мл горячей дистиллированной воды. Надобавляют жидкость мочи сливают, добавляют реактив, перемешивают и опять центрифугируют. Реактив Селена на структуру организованного осадка не влияет	Встречаются при лихорадках, гиповолемиях (понос, рвота, усиленное потоотделение), лейкозах
3	Кислый мочекаислый аммоний $C_5H_9(NH_4)N_4O_7$	Форма гирь, шаров, плодов дурмана	Растворяются при нагревании в щелочах. При прибавлении соляной кислоты или уксусной образуются кристаллы мочевой кислоты	Встречаются при воспалительных процессах мочевыводящих путей инфекционной природы, при щелочном брожении мочи
4	Кальция фосфат $CaHPO_4 \cdot 2H_2O$	Форма в виде клиньев и копий, могут группироваться в розетки и веера	Растворяются в уксусной кислоте	Можно наблюдать при ревматизме, хлорозе и других анемиях
5	Кальция сульфат $CaSO_4$ (только в резко кислой моче)	Форма длинных бесцветных иглообразных, могут располагаться друзами	Нерастворимы в аммиаке и уксусной кислоте и очень мало меняются от HCl	Диагностическое значение не определено, наблюдаются при приеме сернистых вод
6	Гипуриновая кислота $C_5H_7O_4N_2$ (только в кислой моче)	Форма ромбической призм, иногда иглы, таблички, соединяясь, образуют звездообразные формы	Не дают положительной мурексидной пробы, не растворяются в уксусной кислоте, но растворимы в этиловом спирте	Причиной появления могут быть диабет, глистозная диспепсия, употребление брусники, черники, прием салициловой и бензойной кислот

№ п/п	Вещество	Внешний вид кристаллов вещества	Способы уточнения при идентификации кристаллических образований	Клиническое значение
7	Аммиак-магний фосфат $Mg(NH_4)PO_4 \cdot 6H_2O$ (только в щелочной моче)	Форма ромбическая в виде санок, листьев папоротника, ножиц, но чаще это шестигранные призммы со спускающимися плоскостями на концах в форме «гребовых крышек»	Легко растворимы в уксусной кислоте	К появлению приводит прием растительной пищи, воспаление мочевого пузыря, щелочное брожение мочи
8	Аморфные фосфаты (кальция фосфат, магния фосфат) $Ca_3(PO_4)_2$; $Mg_3(PO_4)_2$	Неокрашенные мелкие кристаллы в виде шариков, лежащих раздельно в скоплениями. Похожи на ураты, но не окрашены	В отличие от уратов не дают положительной мурексидной пробы, не растворяются при нагревании. Растворимы в HCl и уксусной кислоте	Встречаются при рвотах и частых промываниях желудка, сопровождающихся алкалозом; нарушении работы кишечника
9	Магния фосфат нейтральный $Mg_3(PO_4)_2 \cdot 22H_2O$ (только в щелочной моче)	Большие вытянутые ромбические пластинки, встречаются кристаллы в виде шагреновой кожи	Растворимы в уксусной кислоте, нерастворимы в щелочах	Диагностическое значение не вполне определено, встречаются редко (см. п. 7, 8)
10	Кальция карбонат $CaCO_3$ (только в щелочной моче)	Имеют вид бесцветных шаров с концентрической исчерченностью, чаще лежат парно, в виде гимнастических грибов, розеток, скрещенных барабанных палочек	Растворяются при прибавлении любой кислоты с выделением пузырьков углекислоты	Встречаются редко. Диагностическое значение аналогично п. 7, 8
11	Кальция оксалат $CaC_2O_4 \cdot 3H_2O$	Могут иметь форму октаэдров — «конвертов» округлой формы, четырехгранных призм, которые могут быть очень маленького размера	Растворимы в HCl и нерастворимы в щелочах и уксусной кислоте	К появлению в моче приводит употребление в пищу продуктов, богатых шавелевой кислотой (помидоры, шпинат, спаржа, шавель, яблоки, виноград, апельсины и другие фрукты)
12	Цистин $C_6H_{12}N_4S_2O_4$	Шестиугольные кристаллы правильной и неправильной формы, наслаивающиеся друг на друга	Растворимы в аммиаке и HCl. Специальная проба: к 3—5 мл мочи добавляют 2 мл 5% раствора цианида натрия. Через 10 мин добавляют несколько капель 5% раствора нитропруссид натрия. В присутствии цистина развивается пурпурно-красное окрашивание	Характерны для цистиноза (наследственная патология обмена)
13	Ксантин $C_8H_{10}N_4O_2$	Имеют вид очень мелких бесцветных ромбов	Дают отрицательную мурексидную пробу, хорошо растворимы в аммиаке, щелочах, HCl	Является продуктом расщепления пуриновых оснований, ведет к образованию камней

14	Лейцин $C_6H_{13}NO_2$ и тирозин $C_9H_{11}NO_3$	Лейцин имеет вид шаров, напоминает мочекалый аммоний и кашли животного. Тирозин имеет вид блестящих игол, окрашенных в желтый или зеленый цвет, чаще сгруппированных в розетки	Для лейцина характерна отрицательная мурецидная проба и нерастворимость в эфире. Тирозин можно обнаружить с реактивом Миллона; при смешивании его в равных объемах с мочой и подогревания появляется красный осадок, если проба положительна. Реактив Миллона: 1 мл ртутной кислоты, разбавляют равным объемом воды и через 2—3 ч фильтруют	Лейцин и тирозин — продукты разложения белка — согустуют друг друга и указывают на нарушение обмена при отравлениях фосфором, заболеваниями печени, дефицитной, Виздефицитной анемии, лейкозах
15	Холестерин $C_{27}H_{46}O$	Имеет форму табличек с обломанным в виде ступеней одним углом	Кристаллы холестерина растворимы в эфире, спирте, но нерастворимы в щелочах и кислотах	Можно наблюдать при амилоидозе, туберкулезе почек, шистите, холестериновых камнях
16	Билирубин $C_{22}H_{36}N_4O_6$	Игольчатые кристаллы, чаще собраны в пучки, цвет от зеленовато-желтого до рубиново-красного	Могут откладываться на клеточных элементах осадка и даже прокрашивать их	Встречаются при билирубиновых
17	Гематоидин (в своей молекуле не содержит железа)	Игольчатые кристаллы, компактных пучков не образуют	Не растворяются в щелочи. Азотная кислота вызывает быстро исчезающее синее окрашивание	Встречаются при кровотечениях из мочевыводящих путей, особенно связанных с опухолью, абсцессом, травматическим некрозом; образуются в некротизированных тканях
18	Гемосидерин $C_{34}H_{43}N_7FeO_8$ (железосодержащая часть гематина)	Имеет вид пигментных зерен золотисто-желтого или золотистокоричневого цвета, располагаются большей частью внутри клеток эпителия	Реакция на гемосидерин: смешивают каплю осадка с 1—2 каплями приготовленной смеси из равных частей 3 % железосинеродистого калия (желтой кровяной соли) и 5 % HCl. При наличии гемосидерина выпадает голубой осадок берлинской лазури	Обнаруживают при гемолитических анемиях с внутрисосудистым гемолизом (болезнь Маркьяфавы-Микеле)
19	Жирные кислоты	Представлены длинными и игольчатыми кристаллами	Окраска суланом III (см. копрологические исследования); при подогревании препарата появляются капли, окрашенные в интенсивно-оранжевый цвет	Обнаруживают при патологических процессах, сопровождающихся жировой дистрофией
20	Кристаллы сульфаниламидных препаратов	Облают большим полиморфизмом (имеют вид снопов, шаров, брусков и т. д.), чаще всего окрашены в желтый цвет	Полосу заранее приготовленной фильтровальной бумаги, пропитанной реактивом (1 г пара-диметиламинобензалдегида, 2 мл концентрированной HCl и 98 мл 2,24 % раствора х. ч. шавелевой кислоты) опускают в осадок мочи. При наличии кристаллов сульфаниламидных препаратов на бумаге появляется ярко-желтое окрашивание	Наблюдают при лечении сульфаниламидными препаратами

ацетата натрия ($\text{CH}_3\text{COONa} - 3\text{H}_2\text{O}$), растворенного в 20 мл 0,5 % уксусной кислоты, и 1 мл 3 % перекиси водорода. Через 48 ч реактив фильтруют и он годен к употреблению. Хранить в темной, химически чистой посуде и периодически фильтровать.

Ход определения. 10 мл свежевыпущенной мочи фильтруют через фильтровальную бумагу, после чего на бумагу наносят 3 капли красителя. При содержании в 1 мкл мочи более 10 лейкоцитов на месте нанесения краски появляется темно-синее пятно. Проба считается отрицательной, если пятно красного цвета, и сомнительной, если пятно голубого цвета.

Клиническое значение. Проба проста и достаточно надежна, ответ можно получить через несколько минут. Экспресс-метод выявления скрытой лейкоцитурии имеет большое значение при профилактических осмотрах, особенно детей в яслях, детских садах и школах.

При положительном значении этой пробы лейкоцитурия выявляется и всеми другими

методами, используемыми для ее количественного определения.

Литература: *Каковский А. О.* К методике счисления организованных элементов мочи.— Русский врач, 1910, 9, 41, 1444; *К. Познер.* Диагностическое и прогностическое значение мочевых осадков. М., 1928; *Пытель А. Я., Рябинский В. С., Родман В. Е.* Новые методы выявления пиурии при пиелонефрите.— М.: Медицина, 1968, с. 56—62; *Нещипоренко А. З.* Определение количества лейкоцитов и эритроцитов в 1 мл мочи.— Лаб. дело, 1969, № 2, с. 121; *Пименова Л. М.*— В кн.: Унификация лабораторных методов исследования. Вып. VIII. М., 1978; *Addis T. G.*— J. clin. invest., 1925, vol. 2, p. 409.

Неорганизованный осадок представлен кристаллическими образованиями (табл. 20).

Литература. *Краевский В. Я.* Атлас микроскопии осадков мочи.— М.: Медицина, 1976.

2.2. КАЛ

2.2.1. Подготовка больного и сбор материала

Результаты исследования зависят от правильной подготовки больного и от правильного сбора, хранения и доставки материала исследования.

Исследовать кал надо не позднее 8—12 ч после его выделения, а до этого его следует хранить при температуре от 3 до 5 °С. Собирать кал надо в чистую сухую посуду, желательнее стеклянную. Следует избегать примеси к испражнениям мочи, выделяемого половых органов и других веществ, в том числе лекарственных. Если надо знать точно количество испражнений, то посуду, в которую их собирают, следует предварительно взвесить.

Подготовка больного. Перед копрологическим исследованием надо отменить больному медикаменты, примеси которых мешают микроскопическому исследованию и влияют на внешний вид каловых масс, а также усиливают перистальтику кишечника. К этим лекарствам относятся все слабительные, ваго- и симпатикотропные средства, каолин, бария сульфат, препараты висмута, железа и препараты, вводимые в ректальных свечах, приготовленных на жировой основе. Если целью исследования является обнаружение скрытых кровотечений, то в предшествующие анализу 3 дня следует избегать пищи, содержащей пищевые продукты, которые наравне с кровью могут быть катализаторами в реакциях, направленных на ее обнаружение. К этим продуктам относятся мясо, рыба, все виды зеленых овощей. При исследовании, основной целью которого является изучение степени усвоения пищи, целесообразно применять диеты, содержащие точно дозированные определенные наборы продуктов.

Наибольшее распространение получили диеты Шмидта и Певзнера.

Диета Шмидта является щадящей: утром — 0,5 л молока, чая или какао, белый хлеб с маслом и яйцо всмятку; завтрак: 0,5 л жидкой овсяной каши, сваренной на молоке; обед: 125 г хорошо изрубленного тощего мяса, слегка обжаренного в масле (внутри сырого), и 200—250 г картофельного пюре; полдник: то же, что и утром, за исключением яйца; ужин: 0,5 л молока или тарелка жидкой овсяной каши, белый хлеб с маслом и 1—2 яйца всмятку (или яичница). Общая калорийность данной диеты составляет 2250 ккал.

Диета Певзнера основана на принципе максимальной для здорового человека пищевой нагрузки. В пищевой рацион входит 400 г хлеба (половина черного), 250 г мяса, жаренного куском, 100 г масла, 40 г сахара, гречневая и рисовая каши, жареный картофель, салаты, квашеная капуста, компот, свежие фрукты. Калорийность 3250 ккал.

Диету выбирают с учетом состояния органов пищеварения.

При пробной диете Шмидта в условиях нормальной пищеварения пищевые остатки в кале не обнаруживаются. В кале здорового человека, получавшего диету Певзнера, содержится большое количество неперевариваемой клетчатки и немного мышечных волокон.

Пробную диету дают в течение 4—5 дней, фекальные массы исследуют на 3-й день при условии ежедневного самостоятельного опорожнения кишечника. Копрологическое исследование проводят при 3-й, 4-й и желательнее 5-й дефекации. Трехкратное исследование фекалий дает наиболее точное представление о функциональном состоянии пищеварительного тракта.

2.2.2. Физические свойства

Количество выделяемых ежедневно испражнений и при нормальных условиях колеблется в значительных пределах, что зависит от количества и состава пищи. При растительном питании количество кала гораздо больше, чем при пище животного происхождения. По Шмидту, после пробной диеты в течение суток при нормальных условиях выделяется до 200—250 г экскрементов. Увеличение суточного количества кала (полифекалия) может быть обусловлено нарушением всасывания, желчеотделения, заболеваниями желудка, поджелудочной железы и кишечника.

Консистенция и форма. По консистенции различают плотный, или оформленный, густо- или жидко-кашицеобразный и водянистый кал. При пище преимущественно животного происхождения фекальные массы имеют цилиндрическую форму, при растительной пище в большинстве случаев выделяется густо-кашицеобразный кал. При спазмах или спазмах на протяжении толстой кишки плотный кал может иметь «форму карандаша» или вид «овечьего кала». Жидко-кашицеобразный и водянистый кал бывает обусловлен большим (более 80 %) содержанием жидкости в испражнениях и наблюдается при ускоренной перистальтике или гиперсекреции в толстом кишечнике.

Цвет. У здоровых людей (взрослых) пигментом каловых масс является стеркобилин, который придает им коричневатую окраску. Однако цвет фекальных масс обусловлен не только пигментами, но и целым рядом факторов, важнейшим из которых является характер питания. На окраску испражнений влияют лекарства и патологические примеси (табл. 21).

Запах кала зависит преимущественно от скатола, индола и в меньшей степени — от фенола, орто- и паракрезолов. Эти органические соединения ароматического ряда образуются при распаде белков. При усилении гниения белков в кишечнике запах усиливается.

Меконий и стул при голодании практически запаха не имеют. Кал грудных детей, находящихся на молочном вскармливании, имеет слабый запах. В анализе запах кала отмечает бокал в том случае, если он очень резко отличается от обычного.

Макроскопически видимые примеси. Диагностическое значение имеют остатки тех пищевых продуктов, которые хорошо перевариваются; остатки соединительной и мышечной ткани, жира, т. е. все то, что с большей очевидностью выявляет микроскопическое исследование. В кале можно видеть также гной, кровь, слизь, конкременты и паразитов.

Определение реакции кала (рН). Принцип. Лакмусовая бумага после контакта с фекальными массами изменяет свой цвет в зависимости от концентрации в них H^+ -ионов.

Необходимые материалы. Универсальная лакмусовая бумага для измерения рН от 1,0 до 10,0 или два вида лакмусовой бумаги (синяя и красная).

Т а б л и ц а 21. Изменение окраски экскрементов в зависимости от различных условий

Цвет	Когда наблюдается
Темно-коричневый	Нормальный кал на смешанной диете
Черно-коричневый	Мясная диета
Светло-коричневый	Растительная диета
Коричнево-красный	Неизменная кровь, пурген, какао
Черный	Измененная кровь (кровотечение в верхних отделах пищеварительного тракта), при приеме висмута
Зеленовато-черный	При приеме железа
Зеленый	При содержании билирубина и биливердина, в условиях усиленной перистальтики, при чисто овощной диете
Зеленовато-желтый	При углеводном брожении
Золотисто-желтый	При содержании неизменного билирубина (у грудных детей)
Оранжево-светло-желтый	Молочная диета
Белый или серовато-белый	При прекращении поступления желчи в кишечник

Техника исследования. Лакмусовую бумагу, предварительно смоченную дистиллированной водой, прикладывают к нескольким местам поверхности испражнений; результат учитывают спустя 2—3 мин, сравнивая изменения окраски на поверхности лакмусовой бумаги с различными оттенками контрольной шкалы.

Если пользуются красной и синей лакмусовой бумагой, то результаты учитывают следующим образом: при кислой реакции кала синяя бумага краснеет, а красная не изменяет своего цвета; при щелочной реакции красная лакмусовая бумага синее, а синяя остается без изменения; при нейтральной реакции оба вида бумаги не меняют свой цвет.

Клиническое значение. В нормальных условиях кал имеет нейтральную или слабощелочную реакцию. Реакция кала преимущественно зависит от жизнедеятельности микробной флоры кишечника; в результате усиленной жизнедеятельности бактерий, расщепляющих белки, образуется много аммиака, придающего среде щелочную реакцию. Продуктами жизнедеятельности бродильной флоры являются CO_2 и органические кислоты, создающие кислую реакцию среды. Активация бродильной флоры связана с усилением перистальтики толстой кишки, а процессы гниения усиливаются чаще при разложении белков, выделяемых ее стенкой (клетки, воспалительный экссудат). Таким образом, основа бродильной диспепсии — чаще энтериты, а гнилостной — колиты.

2.2.3. Химическое исследование

КРОВЬ. Пигменты крови, обладая пероксидазными свойствами, расщепляют перекись водорода и освобождают атомарный кислород, который может окислять вещества, принимающие при этом различную окраску (бензидин, амидопирин, гваяковая смола).

Бензидиновая проба. Реактивы. 1. 1% раствор бензидина в 50% уксусной кислоте (при хранении в посуде из темного стекла годен в течение нескольких дней с условием ежедневного контроля). 2. 3% раствор НзСь.

Ход исследования. Неразведенный кал тонким слоем наносят на предметное стекло. Мазок кладут в чашку Петри, лежащую на белом фоне, и наносят на него 2—3 капли раствора бензидина и столько же перекиси водорода. При положительной реакции появляется зеленое или синее окрашивание. Интенсивность окраски пропорциональна количеству крови в испражнениях. Если окраска не развивается или появляется позже 2 мин, то проба считается отрицательной. Бензидиновая проба является наиболее чувствительной и дает положительный результат с разведением крови 1:100000—1:250000

Гваяковая проба. Реактивы. 1. 2% спиртовая настойка гваяковой смолы. 2. Ледяная уксусная кислота. 3. 3% раствор ЁЬОг.

Ход исследования (упрощенный вариант). На предметное стекло, помещенное в чашку Петри, кладут кусок фильтровальной бумаги, на которую наносят небольшое количество кала в виде мазка. На кал капают по 2—3 капли ледяной уксусной кислоты, настойки гваяковой смолы и перекиси водорода. В присутствии крови появляется сине-зеленое или фиолетовое окрашивание. Проба с гваяковой смолой дает положительный результат с разведениями крови 1:50000.

Пирамидиновая проба. Реактивы. 1. 5% спиртовой раствор амидопирин (пирамидона). 2. 30% раствор уксусной кислоты. 3. 3% раствор Н₂О₂.

Ход исследования. Небольшой кусочек кала растирают с 4—5 мл воды и фильтруют. К фильтрату добавляют равный объем раствора амидопирин и по 10—12 капель уксусной кислоты и перекиси водорода. В присутствии крови появляется сине-фиолетовое окрашивание; если через 2 мин окраска не развилась, то проба считается отрицательной. Проба с амидопирином по чувствительности стоит между описанными выше.

Экспресс-тесты. Фирмы «Germed» (ФРГ), «Roham Pharma» (Чехословакия), "Smith Klein» (США) и др. выпускают бумажные тесты для определения скрытой крови в испражнениях, которые основаны на пробе с гваяковой смолой.

Ход исследования. Испражнения наносят на пропитанную гваяковой смолой фильтровальную бумагу, укрепленную на дне небольшого окошка, прорезанного в картонной пластине, и закрывают створкой. С противоположной стороны также имеется створка, которую открывают непосредственно при исследовании, и на фильтровальную бумагу, которая уже пропи-

тана испражнениями, наносят 2—3 капли реактива, в который входят кислота и перекись водорода.

При наличии крови на фильтровальной бумаге развивается сине-зеленое окрашивание. Определение крови подобным тестом не ускоряет исследование, но позволяет проводить его у постели больного и значительно упрощает транспортировку испражнений при необходимости исследования только крови.

Клиническое значение. Обычно кал дает отрицательные реакции на кровь. Обнаружение крови в испражнениях имеет ценность при выявлении изъязвлений и новообразований желудочно-кишечного тракта. Для того чтобы связать выделение крови с калом с патологией желудочно-кишечного тракта, следует исключить кровотечение из носа и десен. При кровотечении из геморроидальных узлов кровь обычно располагается на поверхности каловых масс, а при кровотечении из нижних отделов толстой кишки при микроскопическом исследовании испражнений можно обнаружить эритроциты.

СТЕРКОБИЛИН. БИЛИРУБИН. Унифицированный метод с двухлористой ртутью (проба Шмидта) (1979). Принцип. В результате реакции стеркобилина с двухлористой ртутью образуется соединение, имеющее розовое окрашивание.

Реактивы. 1. Раствор двухлористой ртути (HgCl₂ — хлорид ртути, сулема), 70 г/л раствора. Растворяют при кипячении, после охлаждения фильтруют.

Ход исследования. Комочек кала величиной с лесной орех растирают в фарфоровой чашечке или в пробирке с 3—4 мл раствора двухлористой ртути, закрывают крышкой или пробиркой и оставляют при комнатной температуре в вытяжном шкафу на сутки. Контрольную пробу ставят так же, как опытную, но вместо двухлористой ртути берут воду.

Оценка результатов. В присутствии стеркобилина в опытной пробе появляется розовое окрашивание. Оценку результатов можно провести немедленно, если подогревать пробирки с опытной и контрольной пробами на пламени горелки. При наличии билирубина образуется зеленое окрашивание. В норме реакция положительная.

Унифицированный метод с пара-диметиламинобензальдегидом (1979). Принцип. Стеркобилин (уробилиноген) с пара-диметиламинобензальдегидом образует окрашенный в красный цвет комплекс, интенсивность окраски которого пропорциональна содержанию уробилиногена. Для восстановления уробилина в уробилиноген используют аскорбиновую кислоту и гидрат окиси железа. Для увеличения специфичности реакции добавляют ацетат натрия.

Реактивы. 1. 4-(Диметиламино)-бензальдегид (пара-диметиламинобензальдегид). 2. HCl концентрированная, х. ч. 3. Реактив Эрлиха: 0,7 г пара-диметиламинобензальдегида растворяют в 150 мл концентрированной HCl, приливают к 100 мл дистиллированной воды и смешивают. Раствор должен быть бесцветным или

слегка желтоватым. Хранят в посуде из темного стекла. Реактив стабилен. 4. Натрия ацетат ч. д. а., х. ч. насыщенный раствор: 375 г $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (или 226 г CH_3COONa) растворяют в 250 мл теплой дистиллированной воды, затем охлаждают до комнатной температуры. Хранят при комнатной температуре. Раствор должен быть бесцветным и прозрачным, 5. Железа сульфат ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) ч. д. а., 200 г/л раствора. Стабилен при хранении в холодильнике в течение суток. 6. Аскорбиновая кислота. 7. Натр едкий: а) 100 г/л раствора; б) 0,5 г/л раствора. 8. Бария хлорид, 100 г/л раствора. 9. Фенолсульфоталейн (феноловый красный) — для приготовления калибровочного раствора. 10. Основной калибровочный раствор: 20,2 мг фенолсульфоталейна растворяют в 100 мл 0,5 г/л раствора едкого натра. Стабилен при хранении.

Рабочий калибровочный раствор готовят разведением основного раствора раствором едкого натра 0,5 г/л в 1000 раз. Стабилен при комнатной температуре в течение недели. Рабочий раствор содержит 0,2 мг фенолсульфоталейна в 100 мл и эквивалентен по окраске 0,346 мг/100 мл раствору стеркобилиногена (уробилиногена). Точность приготовления можно контролировать измерением оптической плотности раствора на спектрофотометре: при длине волны 562 нм оптическая плотность должна быть 0,38.

Подготовка образца. Исследуют кал в первые 2 ч после дефекации. Переносят 10 г кала в ступку. Отмеривают в цилиндре 190 мл воды. Из отмеренного количества наливают 20—30 мл в ступку и растирают кал, постепенно добавляя остальную воду. Суспензию оставляют до оседания. В коническую колбу вместимостью 500 мл наливают 100 мл 200 г/л раствора сульфата железа и надосадочную жидкость из ступки. К оставшемуся в ступке калу доливают еще воды из цилиндра, растирают, опять дают отстояться и надосадочную жидкость переносят в колбу. Процедуру повторяют до полного использования всей воды из цилиндра. Затем в колбу приливают 100 мл 100 г/л раствора едкого натра, встряхивают и ставят колбу в темное место на 3 ч. Содержимое колбы хорошо смешивают и фильтруют, а затем 5 мл фильтрата разводят водой до 50 мл.

Ход определения. В 10 мл разведенного фильтрата растворяют 100 мг аскорбиновой кислоты и по 1,5 мл этой жидкости помещают в 2 пробирки (опытная и холостая пробы). В пробирку с холостой пробой прибавляют 4,5 мл свежеприготовленной смеси, состоящей из одного объема реактива Эрлиха (1,5 мл) и двух объемов (3 мл) насыщенного раствора ацетата натрия. В опытную сначала приливают 1,5 мл реактива Эрлиха, а затем немедленно добавляют 3 мл насыщенного раствора ацетата натрия.

Через 5 мин измеряют экстинкцию обеих проб против воды на ФЭК при длине волны 500—590 нм (зеленый светофильтр) в кювете с длиной оптического пути 1 см или на спектрофотометре при длине волны 562 нм. Рабочий

калибровочный раствор измеряют при тех же условиях, что и опытную пробу.

Результат выражают числом миллиграммов стеркобилиногена (уробилиногена) на 100 г кала (Ст); 1 мг стеркобилиногена (уробилиногена) соответствует 1 единице Эрлиха. Расчет производится по формуле:

$$\text{Ст} = \frac{E_o - E_x}{E_k} \cdot 0,346 \cdot \frac{6,0}{1,5} \cdot 400 = \frac{E_o - E_x}{E_k} \cdot 552,$$

где E_o — экстинкция опытной пробы; E_x — экстинкция холостой пробы; E_k — экстинкция калибровочной пробы; 0,346 — концентрация стеркобилиногена в растворе (0,346 мг/100 мл), окраска которого эквивалентна окраске калибровочного раствора фенолсульфоталейна; 6,0 — объем пробы (мл); 1,5 — объем фильтрата в пробе (мл); 400 — коэффициент пересчета количества стеркобилиногена на 100 г кала.

Нормальные величины. В норме на 100 г кала выделяется 75—350 мг стеркобилиногена. В норме каловые массы содержат бесцветный стеркобилиноген и стеркобилин, придающий испражнению обычную коричневую окраску. Оба этих вещества относятся к группе уробилиноидов — производных билирубина. Образуются уробилиноиды в результате восстановления билирубина при действии клеточных дегидрогеназ и ферментов бактерий. Неизменный билирубин является нормальной составной частью кала грудных детей.

Клиническое значение. У взрослых людей неизменный билирубин в кале может появиться при ускоренной перистальтике, в результате чего билирубин не успевает восстановиться, и при подавлении жизнедеятельности бактерий кишечника приемом больших доз антибиотиков и сульфаниламидов. Нарушение поступления билирубина в кишечник при заболеваниях печени или механическом препятствии оттоку желчи в результате закупорки или сдавления общего желчного протока приводит к снижению или полному отсутствию стеркобилина в кале, что отражается на окраске испражнений. Полное отсутствие стеркобилина можно установить только при химическом исследовании. Усиленное желчеотделение или повышенный распад эритроцитов приводят к увеличению стеркобилина в кале. Установить это можно, исследуя количество стеркобилина, выделенное с каловыми массами за сутки.

АММИАК, АМИНОКИСЛОТЫ. Принцип. Формалин с солями аммония образует гексаметилентетрамин; освобождаемые кислые радикалы солей аммония оттитровывают 0,1 п раствором щелочи в присутствии фенолфталеина.

Реактивы. 1. 30 % раствор хлорида железа (FeCl_3). 2. 1—2 % спиртовой раствор фенолфталеина. 3. Гидроксид кальция $[\text{Ca}(\text{OH})_2]$ в порошке. 4. 0,1 н. HCl . 5. Формалин, разведенный 1:2 и нейтрализованный 0,1 н. раствором гидроксидна натрия (щелочи).

Ход исследования. Растирают 10 г кала, постепенно добавляя 90 мл дистиллиро-

ванной воды. Затем переливают в колбу и при встряхивании добавляют 2 мл 30 % хлорида железа. Спустя 10 мин вносят 25 капель раствора фенолфталеина. В эту смесь приливают 10 мл дистиллированной воды, в которой растворены 2 г гидроксида кальция, до появления красного окрашивания смеси. Через 10 мин смесь фильтруют и доводят до 100 мл дистиллированной водой. Смесь должна быть прозрачной; мутность появляется при избытке гидроксида кальция. 25 мл фильтрата выливают в колбу и нейтрализуют 0,1 н. НСl до бледно-розовой окраски. Затем добавляют 5 мл формалина, после чего фильтрат обесцвечивается. Далее проводят титрование 0,1 н. раствором гидроксида натрия до появления бледно-розовой окраски. Количество щелочи, пошедшей на титрование, умножают на 4, получая количество аммиака на 10 г кала.

Нормальные величины. В нормальных условиях количество аммиака в 10 г фекальных масс соответствует приблизительно 4 мл 0,1 н. раствора гидрата натрия.

Клиническое значение. Количество аммиака в кале отражает интенсивность гниения в толстом кишечнике. Практически пищевой белок расщепляется и всасывается в тонкой кишке, а гнилоственному распаду подвергается чаще белок, выделяемый стенкой толстого кишечника. Следовательно, увеличение аммиака в кале говорит о гиперсекреции и воспалительной эксудации в толстых кишках, но так как распад белка до аммиака требует длительного времени, то при учащенной дефекации его количество в испражнениях даже при колитах может быть нормальным.

РАСТВОРИМАЯ СЛИЗЬ. Принцип. Муцин осаждается уксусной кислотой.

Реактив. 5% водный раствор ледяной уксусной кислоты.

Ход исследования. В пробирку к 2,5 мл 10 % водной суспензии каловых масс приливают 7,5 мл 5 % уксусной кислоты. Появление через 20 мин хлопьев и просветления жидкости говорит о присутствии нерастворимой слизи.

Клиническое значение. Растворимая слизь в кале свидетельствует о раздражении или воспалении верхних отделов толстого кишечника.

2.2.4. Микроскопия

Микроскопическое исследование дает возможность определить мельчайшие остатки пищи, по которым можно судить о степени ее переваривания. При микроскопии выявляются отделившиеся в просвет кишечника клеточные элементы: лейкоциты, эритроциты, макрофаги, кишечный эпителий, опухолевые клетки, а также небольшие комочки слизи; наконец, при микроскопии обнаруживаются яйца гельминтов и паразитирующие в кишечнике простейшие.

Приготовление препаратов. Для полного микроскопического исследования кала готовят ряд препаратов. В большинстве случаев используют влажные препара-

ты, но иногда для изучения клеточных элементов и дифференцирования простейших прибегают к изучению фиксированных окрашенных препаратов.

Влажные препараты готовят в четырех вариантах. Первый из них, так называемый нативный препарат, представляет собой суспензию кала. Для его изготовления на предметное стекло наносят 1—2 капли воды или изотонического раствора хлорида натрия и растирают в ней с помощью стеклянной палочки небольшой комочек кала до получения равномерной суспензии. Этот препарат, покрытый покровным стеклом, рассматривают сначала под малым, а затем под большим увеличением (8X 10 и 40 X 10). В нативном препарате дифференцируется большинство элементов кала: мышечные волокна, растительная клетчатка, нейтральный жир, жирные кислоты, мыла, лейкоциты, эритроциты, кишечный эпителий, слизь, яйца гельминтов, простейшие, кристаллы.

Для второго препарата кал аналогично растирают на предметном стекле, но не с водой, а с раствором Люголя двойной крепости. В таких препаратах можно обнаружить крахмал, йодофильную флору, а также дифференцировать цисты простейших.

Третий препарат готовят в виде густой водной эмульсии, к которой прибавляют каплю раствора Судана III. Эти препараты применяются для обнаружения жира и продуктов его расщепления.

На четвертом препарате кал растирают с каплей глицерина; последний служит для просветления яиц гельминтов и помогает их обнаружить. Однако для обнаружения яиц гельминтов таких препаратов обычно недостаточно. С этой целью прибегают либо к методам концентрации обследуемого материала, либо к просмотру ряда нативных препаратов.

Реактивы. 1. Раствор Люголя двойной крепости: йода 1 г, йодида калия 2 г, воды 50 мл. Растворяют йод и йодид калия в небольшом количестве воды, а потом прибавляют остальную воду. 2. Раствор Судана III (реактив Састгоффа): спирта 10 мл, ледяной уксусной кислоты 90 мл, судана III до получения ярко-красной окраски. 3. Реактив Гехта: смешивают перед употреблением равные объемы 1 % нейтральной красной и 0,2 % бриллиантового зеленого. 4. 0,5 % раствор метиленового синего.

Детрит составляет основной фон при микроскопии нормального кала. Он представляет собой массу мелких частичек различной величины и формы, состоящую из продуктов распада клеток, остатков пищевых веществ и бактерий. Эти частички не поддаются распознаванию. Чем полнее происходит переваривание пищи, тем больше в кале детрита и тем меньше в нем дифференцируемых элементов.

Мышечные и соединительные волокна — единственные остатки белковой пищи, распознаваемые при микроскопии.

Мышечные волокна, вернее их обрывки, имеют различный вид в зависимости от степени воздействия на них протеолитических ферментов. Не подвергшиеся перевариванию мышечные во-

локна имеют цилиндрическую форму и различную длину; края их как бы обрублены под прямым углом. Они довольно ярко окрашены в золотисто-желтый или коричневый цвет; только в ахолическом кале они лишены окраски желчным пигментом и выглядят серыми. Наиболее характерной отличительной особенностью непереваренных остатков мышечных волокон является поперечная исчерченность. По мере переваривания мышечных волокон поперечная исчерченность сменяется продольной, которая также затем исчезает и мышечное волокно становится бесструктурным. Одновременно с изменением внутренней структуры меняются и очертания волокон: они укорачиваются, углы на концах закругляются, они как бы обтачиваются с поверхности.

Мелкие обрывки мышечных волокон, потерявших исчерченность и приобретших неправильную форму, с достоверностью определить при простой микроскопии не представляется возможным. Для выявления белкового характера таких неформленных глыбок или частиц можно использовать простые химические пробы — биуретовую и ксантопротеиновую. При первой комочек кала размешивают на предметном стекле с 10 % раствором едкого кали и прибавляют 1—2 капли 1 % раствора медного купороса. Частички белка приобретают лиловое окрашивание. Для проведения ксантопротеиновой пробы кал смешивают с крепкой азотной кислотой и подогревают. Белковые частицы окрашиваются в желтый цвет.

При исследовании кала здорового человека, принявшего с пищей 150 г мяса за день, можно обнаружить в поле зрения препарата при малом увеличении микроскопа 1—2 обрывка измененных мышечных волокон. Среди них встречаются единичные волокна, сохранившие поперечную исчерченность. При обильном потреблении мяса количество бесструктурных мышечных волокон может быть несколько больше.

Клиническое значение. Появление большого количества мышечных волокон, особенно сохранивших поперечную исчерченность, свидетельствует о недостаточности желудочного или панкреатического переваривания. Основным ферментом, переваривающим мышечные волокна, является трипсин панкреатического сока. Следовательно, обилие мышечных волокон в кале (креаторея) служит в большинстве случаев признаком недостаточности поджелудочной железы. Но покрывающая мышечные волокна и склеивающая их между собой сарколемма растворяется преимущественно желудочным соком. Поэтому при желудочной ахилии в кишечник попадает часть мышечных волокон, покрытых слоем сарколеммы, которая плохо поддается действию трипсина, поэтому мышечные волокна остаются неизменными. В таких случаях при микроскопическом исследовании обнаруживаются группы поперечнополосатых мышечных волокон (по 2—3 и более в препарате), тесно прилегающих друг к другу.

Соединительная ткань. Соединительнотканые волокна — преимущественно эластическая ткань связок и сосудов — обнаруживаются при

микроскопии благодаря резкому преломлению ими света. Рыхлая соединительная ткань, не обладающая такими оптическими свойствами и имеющая вид бесформенных комочков с нечеткими, разволокненными краями, может иметь сходство с комочками слизи.

Чтобы отличить рыхлую соединительную ткань от слизи, к препарату прибавляют каплю уксусной кислоты. Соединительная ткань при этом набухает и теряет свою волокнистую структуру. После такой обработки волокнистая структура слизи выступает более отчетливо. Кроме того, в отличие от слизи соединительнотканые волокна обладают двойным лучепреломлением. Обнаружить эту особенность соединительной ткани можно с помощью поляризационного микроскопа или поляризационной насадки к простому микроскопу. Следует иметь в виду, что в кале может встретиться еще ряд двоякопреломляющих веществ: сырой крахмал, жирные кислоты, кристаллы оксалатов кальция и трипельфосфатов, растительные волокна.

Клиническое значение. Наличие непереваренной соединительной ткани в кале указывает на недостаточность функции желудка. К неперевариваемой соединительной ткани причисляют остатки костей, хрящей и сухожилий; эти находки не патологические.

Растительная клетчатка и крахмал являются остатками углеводной пищи, распознаваемыми при микроскопическом исследовании. Для обнаружения растительной клетчатки используют нативный препарат, причем в большинстве случаев оказывается достаточным просмотр препарата под малым увеличением (80—100 раз). Различают перевариваемую и неперевариваемую растительную клетчатку. Перевариваемая клетчатка состоит из клеток, имеющих тонкую, легко разрушающуюся оболочку. Через эту оболочку даже при сохранении ее целостности могут проникать пищеварительные ферменты, расщепляющие содержимое клеток. Клетки неперевариваемой клетчатки отличаются толстыми двухконтурными оболочками, а кусочки растительной ткани — толстыми межклеточными перегородками.

Пищеварительные органы человека не вырабатывают ферментов, способных расщепить оболочки растительных клеток. Некоторые микробы толстого кишечника (кlostридии, *B. cellulosaе dissolvens*, *B. mesentericus vulgatus*) обладают такими ферментами и потому расщепляют клетчатку. При нормальном темпе продвижения пищи по желудочно-кишечному тракту микробы переваривают примерно $\frac{1}{4}$ всей клетчатки, если она принята не в избыточном количестве. Чем больше каловые массы находятся в толстом кишечнике, тем больше сказывается воздействие микробов на клетчатку, тем меньше ее остается. При запорах кал содержит значительно меньше клетчатки, чем при нормальном стуле и поносах.

Растительные клетки соединены между собой слоем пектина, для растворения которого необходимы сначала кислая реакция желудочного сока, а затем слабощелочная — двенадцатиперстной кишки. При отсутствии HCl в же-

лудочиом соке клетки перевариваемой клетчатки (например, картофеля, моркови) не разъединяются и в кале обнаруживаются их группы. В нормально оформленном кале перевариваемая клетчатка, как правило, отсутствует.

Для каждого растения характерны особый вид клеток, их величина, форма, окраска. Крупные овальные клетки картофеля относятся к перевариваемой клетчатке. Они выделяются в нативном препарате в виде бесцветных овалов на желтом или коричневатом фоне детрита. Располагаются они либо поодиночке, либо небольшими группами по 2—3—4 клетки. Неопытный микроскопист может, рассматривая такие группы под малым увеличением, спутать их с комочками слизи. Отличие их от слизи состоит в том, что очертания картофельных клеток четкие округлые, в то время как очертания комочков слизи расплывчатые и форма их неопределенна. Препаровальными иглами перевариваемая клетчатка расщепляется легко, слизь растягивается. Наиболее убедительно дифференцирование их в препарате, окрашенном раствором Люголя. До просмотра препарат должен постоять с раствором 5—10 мин; за это время йод проникает внутрь клеток и окрашивает зерна крахмала в зависимости от стадии их переваривания в синий, фиолетовый или розовый цвет.

Исследование на присутствие крахмала производят в препарате, обработанном раствором Люголя. Неокрашенные крахмальные зерна распознать в кале обычно не удастся, так как их форма и характерная эксцентрическая слоистость обычно не сохраняются. Под влиянием йода крахмальные зерна в зависимости от стадии их переваривания окрашиваются по-разному: неизмененный крахмал приобретает синечерный цвет, продукты постепенного его расщепления — амилодекстрин — фиолетовый, эритродекстрин — красно-бурый цвет; дальнейшие стадии расщепления, начиная с акродекстрина, уже не окрашиваются йодом. Зерна крахмала могут располагаться как свободно, чаще в виде обломков, так и внутри растительных клеток, находясь там в разных стадиях переваривания. Обилие крахмала в кале и перевариваемой клетчатки сопровождается обычно богатой йодофильной флорой. Принадлежащие к ней микробы, питаясь за счет расщепляемых ими углеводов, откладывают внутри себя гранулы, окрашивающиеся йодом. Вызываемое этой флорой брожение углеводов приводит к образованию органических кислот, придающих калу кислую реакцию.

Клиническое значение. При нормальном пищеварении крахмал в кале отсутствует. Серия амилолитических ферментов, воздействующая на него по ходу пищеварительного тракта, начиная с птialiна слюны и кончая ферментами бактерий в толстом кишечнике (главным образом в слепой кишке), приводит к полному его расщеплению.

Диагностическое значение. Неполное переваривание крахмала встречается преимущественно при заболеваниях тонкого кишечника и связанном с ними ускоренном продви-

жении пищевого химуса. Поражения поджелудочной железы, значительно отражающиеся на переваривании жиров и белков, относительно мало сказываются на усвоении крахмала, если они не сопровождаются поносами. Недостаток амилазы компенсируется амилолитическими ферментами других отделов пищеварительного тракта и бактерий.

Остатки жировой пищи — нейтральный жир и продукты его расщепления — распознаются микроскопически в нативных и окрашенных препаратах. Наиболее часто употребляется окраска Суданом III. Поступивший с пищей нейтральный жир, если он принят в умеренном количестве (не более 100—150 г), усваивается почти полностью — на 90—98 %. Степень усвоения жира зависит и от его качества: чем ниже точка плавления жира, тем полнее он усваивается.

Нейтральный жир обнаруживается в нативном препарате в виде бесцветных, резко преломляющих свет капель. Чаще всего последние имеют округлую форму, но могут, сливаясь друг с другом, образовывать небольшие «лужицы» неправильной формы с округлыми, гладкими очертаниями. Тугоплавкие жиры имеют вид глыбок неправильной формы, легко меняющих свои очертания при надавливании на покровное стекло. Поскольку мелкие капли нейтрального жира могут остаться незамеченными, а крупные капли можно спутать с пузырьками воздуха, то значительно легче отличить нейтральный жир с помощью окраски Суданом III. Нейтральный жир при этом окрашивается в оранжево-красный цвет.

Жирные кислоты встречаются в виде капель (легкоплавкие жирные кислоты), кристаллов, реже глыбок (тугоплавкие жирные кислоты). Кристаллы жирных кислот имеют форму тонких иголок, заостренных с обоих концов; часто они группируются по 2—3—4 вместе, образуя небольшие пучки. Иногда такие иглы, располагаясь радиально, как бы венчиком окружают капли жира или жирных кислот. После нагревания нативного препарата и последующего его остывания капли нейтрального жира не изменяются. Капли жирных кислот, а также глыбки, превратившиеся при нагревании в капли, по мере остывания меняют свой вид, становятся неровными, бугристыми и частично превращаются в характерные игольчатые кристаллы. Однако этот процесс у легкоплавких жирных кислот происходит медленно, что может затруднить дифференцирование их от капель нейтрального жира.

Мыла обнаруживаются в виде кристаллов и желто-коричневых глыбок, не окрашивающихся суданом III на холоду. Кристаллы мыл похожи на иглы жирных кислот, но короче последних. Их форма напоминает маленькие вытянутые ромбики. При нагревании нативного препарата они в отличие от кристаллов жирных кислот не сплавляются в капли. Однако сплавление кристаллов мыл может произойти, если перед нагреванием прибавить 1—2 капли уксусной кислоты, под действием которой мыла расщепляются с освобождением жирных кислот.

Для суждения об общем количестве жировых элементов препарат с 1—2 каплями уксусно-спиртового раствора Судана III, накрытый покрывным стеклом, осторожно подогревают до начала кипения. Жирные кислоты и мыла превращаются при этом в капли, которые наряду с каплями нейтрального жира окрашиваются Суданом. Подогрев исследуют под микроскопом, сравнивая число окрашенных судаком капель до и после нагревания, можно составить суждение о количестве капель, прибавившихся за счет жирных кислот и мыл. Если в нативном препарате кристаллы жирных кислот не обнаруживались, то увеличение числа капель можно отнести преимущественно за счет мыл.

Клиническое значение. При нормальном переваривании кал совсем или почти совсем не содержит нейтрального жира. Остатки жировой пищи выделяются преимущественно в виде мыл. Нарушение усвоения жира связано в большинстве случаев с недостаточной активностью липазы либо с недостаточным поступлением в кишечник желчи. Однако если жир заключен в соединительную ткань (жировая клетчатка), то для его освобождения необходимо достаточное переваривание в желудке соединительной ткани, поэтому нарушение указанного процесса может привести к стеаторее.

При полном выключении секреции поджелудочной железы в кале обнаруживается почти исключительно нейтральный жир. Активность кишечной липазы невелика и действие ее практически мало сказывается на усвоении жира. Бактерии кишечника также мало влияют на процесс расщепления жира. Небольшое количество жирных кислот, которое образуется в условиях выключения панкреатического переваривания, полностью усваивается кишечником и в кале жирные кислоты не обнаруживаются.

Недостаточное поступление в кишечник желчи или ее полное отсутствие также резко сказывается на усвоении жиров. Жиры нерастворимы в воде и не смачиваются водными растворами ферментов. Под действием желчных кислот желчь активирует липазу и переводит жир в состояние тонкой эмульсии, более доступной действию ферментов, чем крупные капли. Выпадение этих процессов приводит только к частичному расщеплению жира. Образующиеся жирные кислоты также требуют для своего растворения и всасывания присутствия гидролитических желчных кислот, а для своего омыления — щелочей. При недостатке или отсутствии в кишечнике желчи в кале находят много нейтрального жира и жирных кислот; количество мыл зависит от содержания щелочей. Наихудшие условия для усвоения жира создаются при опухоли головки поджелудочной железы.

Всасывание жиров из кишечника происходит по лимфатическим путям при активной сократительной деятельности ворсинок, поэтому жировой стул может наблюдаться также при нарушении лимфооттока в случае паралича *unicæ muscularis mucosæ*, а также при туберкулезе и опухолях мезентериальных лимфатических узлов, находящихся на пути оттока лимфы.

Ускоренное продвижение пищевого химуса по тонкому кишечнику приводит к недостаточному усвоению всех пищевых продуктов, в том числе и жира, поэтому если наряду с жиром в кале обнаруживаются непереваренные мышечные волокна и крахмал, то надо подумать и об ускоренной перистальтике как причине нарушения всасывания жира.

Элементы, отделяемые стенкой кишечника, составляют вторую группу объектов микроскопического исследования. Кроме слизи, это эритроциты, лейкоциты, тканевые макрофаги, клетки кишечного эпителия, клетки злокачественных опухолей. Плоский эпителий, захватываемый изредка при прохождении плотных каловых масс через анальное отверстие, не имеет диагностического значения.

Слизь, обнаруживаемая лишь микроскопически, происходит из тех отделов кишечника, где каловые массы еще настолько жидки, что при перистальтике она с ними перемешивается. В случае оформленного кала происхождение только микроскопически обнаруживаемой слизи следует отнести к тонкому кишечнику или слепой кишке. При кашицеобразном и жидком стуле происхождение мелких частиц слизи определить труднее, однако отсутствие одновременно видимой невооруженным глазом слизи говорит скорее против ее происхождения из толстого кишечника. Вообще же чем мельче комочки слизи и чем теснее они перемешаны с калом, тем выше место их выделения.

Видимые невооруженным глазом слизистые комочки следует подвергать микроскопическому исследованию. Комочки слизи предварительно осторожно промывают водой, освобождая от кала. Эритроциты в этом случае гемолизуются. Под малым увеличением микроскопа слизь имеет вид светлых комочков или тяжей с нечеткими, неправильными очертаниями, вкрапленных в основную коричневую или желтую массу.

Для отличия слизи от элементов кала можно применить окраску по Гехту (на мазок кала наносит 1—2 капли реактива). Через несколько минут слизь окрашивается в светло-красный цвет, остальная масса — в зеленый, кроме оболочек и ядер растительных клеток, приобретающих лилово-красную окраску.

Клетки кишечного эпителия обычно находят вкрапленными в комочки слизи. Иногда клетки оказываются хорошо сохранившимися, чаще они деформированы вследствие пропитывания их мылами или начавшегося переваривания. Единичные клетки кишечного эпителия можно встретить и в нормальном кале как следствие физиологического слушивания. Большие группы подобных клеток следует расценивать как признак воспаления слизистой оболочки кишечника. Отличить эпителий тонкой и толстой кишки затруднительно. Полупереваренные клетки, окрашенные желчным пигментом, скорее можно отнести к тонкой кишке, клетки, найденные в круглых комках слизи, — к толстой.

Лейкоциты. Единичные в поле зрения лейкоциты могут обнаруживаться и в нормальном кале. Увеличение числа лейкоцитов, особенно

скопление их в слизи, свидетельствует о воспалительном процессе. Значительные скопления лейкоцитов (гной) являются признаком язвенного поражения толстого кишечника (дизентерия, туберкулез, рак, язвенный колит и т. п.); обильное выделение гноя без слизи может быть при прорыве в кишечник парапроктольного абсцесса.

В остром периоде бактериальной дизентерии большое количество лейкоцитов в слизи (90 % и более) представляют собой сегментоядерные нейтрофилы с неизменными ядрами. При амёбной дизентерии сегментоядерные нейтрофилы составляют 20—40 %. Остальные 60—80 % составляют нейтрофилы с пикнотическими и псевдопикнотическими ядрами. В небольшом количестве обнаруживаются эпителиальные клетки, мононуклеары, макрофаги, эозинофилы; последних больше при амёбной дизентерии. Эозинофилы в кале, помимо амёбной дизентерии, встречаются иногда при гельминтозах. Отличить их от других видов лейкоцитов можно и в нативном препарате по относительно крупной, резко преломляющей свет зернистости.

Макрофаги в нативном препарате, а также при окраске раствором Люголя отличаются от лейкоцитов большим размером, крупным ядром круглой или овальной формы, содержанием в протоплазме продуктов фагоцитоза (обломки клеток, эритроциты, капли жира). При наличии фагоцитированных эритроцитов их иногда принимают за дизентерийную амёбу. Для отличия макрофагов от цист простейших, с которыми они имеют некоторое сходство, следует прибегнуть также к окраске раствором Люголя, при которой в цистах простейших в отличие от макрофагов заметна темноокрашенная оболочка. Макрофаги в кале обнаруживаются при воспалении толстой кишки, особенно при бактериальной дизентерии.

Эритроциты в неизменном виде обнаруживаются в кале при кровотечении из толстой кишки, преимущественно из дистальных ее отделов вследствие язвенных процессов, распада опухолей, наличия свищей и трещин заднего прохода, геморроя. Если от момента кровотечения до выделения крови с калом проходит значительное время или если кровь выделяется из проксимальных отделов толстой кишки, то эритроциты в большинстве случаев разрушаются и изредка могут сохраниться в виде теней. В этом случае распознать их при микроскопии нелегко, особенно если они единичные и не располагаются скоплениями. Как и при полном распаде эритроцитов, вопрос о наличии крови в таких случаях решается химическим исследованием. Эритроциты в воде гемолизуются, поэтому нативный препарат следует готовить на изотоническом растворе хлорида натрия.

Клетки злокачественных опухолей могут быть обнаружены в кале при опухолях прямой кишки. При более высокой локализации опухоли клетки подвергаются изменениям, препятствующим их распознаванию. Эти клетки можно определить, если они не единичны, а обнаруживаются группами в виде обрывков ткани с характерным атипизмом. Особенность опухолевых

клеток — прежде всего полиморфизм: разные величина и форма, беспорядочное расположение иногда в виде тяжей на волокнистой соединительнотканной основе. Клетки чаще крупные с большим ядром, содержащим ядрышки; протоплазма нередко вакуолизирована с признаками жировой дегенерации.

Обнаружение опухолевых клеток в кале представляет большую трудность. Более эффективным при подозрении на опухоль будет проведение ректороманоскопии с цитологическим или гистологическим исследованием материала с подозрительных участков.

Кристаллические образования в кале обнаруживаются нередко. Кристаллы трипельфосфатов (фосфорнокислая аммиак-магнезия), чаще в форме гребовых крышек, встречаются в резко щелочном кале при усилении гнилостных процессов. При неправильном сборе кала они могут попасть в него из мочи. От других кристаллов и образований отличить трипельфосфаты помогает хорошая растворимость их в уксусной кислоте.

Оксалаты кальция (шавелевокислая известь) в виде октаэдров («почтовые конверты») встречаются при употреблении в пищу большого количества овощей. В норме HCl желудка превращает оксалаты кальция в хлорид кальция, поэтому их присутствие в кале может служить признаком понижения кислотности желудочного сока. Кристаллы оксалатов кальция нерастворимы в уксусной кислоте, под действием серной кислоты постепенно превращаются в кристаллы гипса.

Кристаллы холестерина, попадающего в кишечник с желчью, не имеют особого диагностического значения. Они представляют собой бесцветные плоские таблички в форме ромба или параллелограмма с отломленными углами, часто ступенчатно наслаивающиеся друг на друга.

Кристаллы Шарко — Лейдена встречаются в тех случаях, когда в кале имеется много эозинофилов, в частности при амёбной дизентерии, некоторых гельминтозах и кишечной локализации синдрома Леффлера. По виду они несколько не отличаются от тех, которые имеются в мокроте при бронхиальной астме. Это бесцветные удлиненные октаэдры разной величины, напоминающие форму двустороннего копыя. Чаще всего они находятся в слизи, иногда непосредственно в кале. В последнем случае они хорошо окрашиваются эозином (слизь препятствует проникновению в них краски).

При профузных поносах в слизи находят! иногда кристаллы билирубина, не успевшего восстановиться в стеркобилин из-за быстрого прохождения его по кишечному тракту. Они имеют вид очень мелких заостренных с двух концов игольчатых кристаллов оранжевого цвета, располагающихся большей частью группами.

Кристаллы гематоидина, встречающиеся в кале после кишечных кровотечений, несколько похожи на кристаллы билирубина. Форма их также бывает игольчатой или ромбической, но цвет красновато-коричневый.

Из нерастворимых лекарственных препара-

тов в кале чаще всего обнаруживается сульфат бария, применяемый при рентгенологическом исследовании желудочно-кишечного тракта. Мельчайшие крупинки этого вещества, покрывая все поле зрения, делают кал непригодным для микроскопического исследования.

Препараты висмута образуют в кишечнике соединения, выпадающие в виде темно-бурых, почти черных кристаллов, имеющих форму прямоугольников, ромбов или точильных брусков.

После приема карболена в кале обнаруживаются частички угля, имеющие угловатую неправильную форму, окрашенные в черный цвет и не поддающиеся действию растворителей. При соответствующей дозе карболена кал приобретает черный цвет. Сходное окрашивание кала наблюдается и после приема препаратов железа, превращающихся в кишечнике под действием сероводорода в сернистое железо или в закись железа черного цвета. Крупинки этих соединений имеют вид аморфных зерен или глыбок разной величины.

Л и т е р а т у р а: *Алексеев-Беркман И. А.*, Клиническая копрология.— Л., 1954; *Герман И.*, Клиническая копрология.— Бухарест, 1977; *Михайлова Н. Д.* Пособие по копрологическим исследованиям.— Л., 1962; *Henry K.-J., Cannon O. C., Winkelman I. W.* Clinical chemistry. Principles and technics. New York, 1974, p. 1354—1369.

2.2.5. Обнаружение простейших

Обнаружение и дифференцирование простейших — один из наиболее сложных разделов исследования испражнений. Отличие патогенных форм простейших от непатогенных требует известного опыта и тщательности в работе.

Выше уже указывалось на важность правильного сбора материала для обнаружения в нем простейших. Здесь следует учитывать, что большинство этих одноклеточных организмов встречается в двух формах: вегетативной — активной, подвижной, жизнедеятельной, легко поддающейся вредным воздействиям (в частности, охлаждению) и потому быстро погибающей после выделения из кишечника, и в виде устойчивых к внешним воздействиям цист. Сушествование вегетативных форм требует более или менее жидкой среды, поэтому они обнаруживаются преимущественно в жидком, полужидком, слизистом кале. При неблагоприятных условиях для их жизнедеятельности (например, уплотнение каловых масс) они превращаются в цисты. В оформленном кале простейшие, как правило, встречаются лишь в инцистированном состоянии.

Кал для отыскания в нем вегетативных форм должен исследоваться сразу после его выделения, еще в теплом состоянии. Необходимость этого вызывается двумя причинами. Во-первых, в остывшем кале вегетативные формы простейших быстро гибнут и мертвыми быстро поддаются действию протеолитических ферментов. Вследствие этого они сначала теряют характер-

ные особенности своей структуры, позволяющие отличать патогенные формы от непатогенных, а затем и совсем растворяются. Во-вторых, при остывании уменьшается, а затем исчезает подвижность простейших — важный вспомогательный фактор при их дифференцировании.

Следует заметить, что сохранение кала в термостате не допускается, так как в условиях искусственного подогревания простейшие очень быстро подвергаются дегенеративным изменениям, затрудняющим их распознавание.

В оформленном кале, как правило, встречаются только цисты, однако в комках слизи, находящихся на его поверхности, иногда можно найти и вегетативные формы. Поэтому определение вегетативных форм простейших, находящихся в слизи, следует производить по возможности быстро.

Иногда для обнаружения простейших, особенно амеб, используют материал, полученный при ректороманоскопии. В этих случаях особенно нужно помнить о необходимости правильного обращения с полученным незначительным количеством материала. За время транспортировки в лабораторию, расположенную даже в том же здании, эта калка успевает остыть, а иногда и высохнуть. Поэтому лучше всего подготовить все необходимое для исследования в том же помещении, где проводится эндоскопия. Смазывания ректоскопа вазелиновым маслом или жиром делают последующую микроскопию затруднительной.

Для обнаружения в кале простейших прибегают к ряду методов. Трудности, сопряженные с обнаружением цист простейших, могут быть в известной степени преодолены путем применения методов концентрации. Культивирование простейших и заражение ими животных, применяемые в основном с научными целями, ввиду сложности методики малопригодны в повседневной практической работе. Выделение простейших с калом происходит непостоянно. Поэтому не следует ограничиваться при их поисках однократным исследованием. Последнее нужно повторить 4—5 раз через 2—3 дня.

Унифицированные методы определения простейших с помощью нативного мазка и мазка с раствором Люголя (1974). Принцип. Движущиеся простейшие обнаруживаются при исследовании суспензии каловых масс в изотоническом растворе хлорида натрия с помощью микроскопа. Препарат в этом растворе служит прежде всего для выявления вегетативных форм простейших, которые распознаются по характеру движения. Препарат суспензии каловых масс в растворе Люголя в основном используют для дифференцирования цист простейших.

Р е а к т и в ы. 1. 0,85 % раствор хлорида натрия. 2. Раствор Люголя (йодид калия — 3 г, кристаллический йод — 1,5 г, дистиллированная вода — 100 мл). Раствор стабилен при хранении в темной посуде при комнатной температуре в течение 1 мес.

С п е ц и а л ь н о е о б о р у д о в а н и е: микроскоп.

Х о д и с с л е д о в а н и я. На предметное стекло наносят 0,1 мл (2 капли) изотонического

раствора хлорида натрия и на расстоянии 3 см — 0,1 мл раствора Люголя. На кончик деревянной палочки берут частицу кала и эмульгируют ее в капле изотонического раствора хлорида натрия. Затем той же палочкой берут частицу кала и эмульгируют ее в капле раствора Люголя. Обе капли накрывают покровным стеклом и просматривают сначала при малом увеличении микроскопа (7 X 20), а затем при большом (7 X 40).

Эмульсия каловых масс должна быть не слишком густой, так как тогда будет трудно исследовать препарат под микроскопом при большом увеличении. В то же время частица кала, взятая для приготовления препарата, не должна быть слишком маленькой, так как в этом случае количество простейших может оказаться недостаточным для их обнаружения. Препарат считается правильно приготовленным лишь в том случае, если через него четко виден печатный шрифт.

Оценка результатов. Исследуют 2—3 препарата, отмечая всех замеченных простейших. В сомнительных случаях или при получении отрицательного результата анализ повторяют; на протяжении 1—2 нед проводят не менее 3 анализов. Метод позволяет наряду с непатогенными простейшими выявить *Entamoeba histolytica* и *Balantidium coli*, а также условно-патогенную *Lambliа intestinalis*.

Примечания. 1. Жидкие каловые массы исследуют не более чем через 30 мин после дефекации, оформленные — не более чем через 2 ч после дефекации. 2. В фекалиях не должно быть посторонних примесей — воды, мочи и т. п. 3. Для сбора кусочков кала пригодны только деревянные палочки, так как со стеклянных соскалзывают кусочки слизи, в которых часто находятся паразиты. 4. Деревянные палочки сжигают после одноразового использования.

Унифицированный метод с применением консервантов (1974). Принцип. Простейшие фиксируются в каловых массах консервирующим раствором, поэтому морфологические признаки простейших длительное время остаются без изменений.

Реактивы. 1. Консервант Барроу: а) консервирующий раствор: хлорид натрия 0,7 г, формалин концентрированный 5 мл, спирт этиловый % % 12,5 мл, фенол кристаллический 2 г, вода дистиллированная 100 мл; б) красящий раствор: 0,01 % раствор тионина или азура. Консервант Барроу используют только в том случае, когда исследование материала возможно в срок не более 1 мес. 2. Консервант Сафаралиева: сульфат цинка 1,65 г, формалин концентрированный 10 мл, фенол кристаллический 2,5 г, уксусная кислота концентрированная 5 мл, метиленовый синий 0,2 г, вода дистиллированная 100 мл. Консервантом Сафаралнева пользуются тогда, когда материал должен храниться до исследования более 1 мес.

Специальное оборудование: микроскоп.

Ход исследования. Консервант разливают в пенциллиновые флаконы до половины их объема, исследуемый материал от большого немедленно после взятия переносят во флаконы в количестве, составляющем 1/3 объема, занятого консервантом. Затем содержимое флаконов суспендируют при помощи стеклянной палочки. Флакон закрывают пробкой и пробку закрепляют липкой лентой. На флакон крепят этикетку, на которой записаны данные об исследуемом. Перед исследованием консервированный материал не перемешивать!

Каплю осадка пипеткой переносят на предметное стекло и растирают до получения суспензии. В том случае, если использован консервант Барроу, добавляют каплю красителя. Затем каплю накрывают покровным стеклом и микроскопируют препарат при большом увеличении.

Оценка результатов. Исследуют 2—3 препарата, отмечая всех обнаруженных простейших. Структуры простейших при применении консервантов окрашиваются в синий цвет красителем. Внутренняя структура балантидиев в консервированном материале становится незаметной, и балантидиев обнаруживают лишь по войлокообразному слою ресничек по периферии клеточки.

Примечание. При отсутствии тионина или азура возможно применение 0,01 % раствора метиленового синего.

Унифицированный метод формалин-эфирного обогащения (1974). Принцип. Формалин-эфирная обработка позволяет выделять и концентрировать цисты простейших.

Реактивы. 1. Раствор формалина: формалин концентрированный 10 мл, хлорид натрия 0,85 г, вода дистиллированная до 100 мл. 2. Эфир серный. 3. Раствор Люголя.

Специальное оборудование: микроскоп.

Ход исследования. В пробирки наливают по 6 мл раствора формалина. Частицы кала величиной с горошину тщательно суспендируют в пробирке с раствором формалина. Затем в пробирку добавляют 2 мл эфира, закрывают ее резиновой пробкой, перемешивают содержимое пробирки и центрифугируют в течение 3 мин при 1500 об/мин.

После центрифугирования слой кала, образовавшийся между слоями формалина и эфира, аккуратно отделяют от стенок пробирки деревянной палочкой и сливают надосадочную жидкость. Осадок собирают пипеткой и переносят каплю на предметное стекло, добавляют каплю раствора Люголя, накрывают покровным стеклом и микроскопируют при малом и большом увеличении микроскопа. При необходимости возможно хранение суспензии каловых масс в формалине в течение 1—2 сут.

Оценка результатов. При исследовании препарата отмечают всех обнаруженных простейших. Метод позволяет выявить цистные их формы. Основные формы простейших представлены ниже.

Класс корневожек (Rhizopoda): к классу корневожек относятся амебы. Характерной особенностью вегетативной стадии этого одно-

клеточного организма является отсутствие оболочки, вследствие чего тело не имеет постоянной формы. При неблагоприятных условиях тело амёбы покрывается оболочкой и она превращается в цисту — устойчивую форму, способную сохранять жизнеспособность вне организма человека. В цисте ядро делится на 2—4—8 частей. Попав в кишечник человека, циста под влиянием пищеварительных ферментов освобождается от своей оболочки. Протоплазма ее делится с образованием одноядерных вегетативных особей, количество которых соответствует числу ядер цисты.

Из паразитирующих в кишечнике человека амёб наиболее часто встречаются патогенная *Entamoeba histolytica* — возбудитель дизентерии и непатогенные *Entamoeba hartmanni*, *Entamoeba coli*, *Endolimax* папа, *Jodamoeba buschlii*.

Главная задача, возникающая при обнаружении амёб, — различить патогенную дизентерийную от непатогенных форм. Поэтому лабораторный работник должен быть знаком с морфологическими особенностями этих видов простейших.

Entamoeba histolytica. В свежем нативном препарате дизентерийная амёба имеет вид почти бесцветного неопределенной формы комочка. Ядра в ней не видно. Протоплазма ясно делится на зоны: наружную — гомогенную эктоплазму и внутреннюю — эндоплазму. Первая примерно в 2 раза меньше второй.

При движении амёбы псевдоподии возникают из эктоплазмы, а затем в образовавшееся выпячивание постепенно вливается эндоплазма. Характер движения является одной из типичнейших особенностей дизентерийной амёбы. Псевдоподия выбрасывается ею мгновенно, а при перемещении в нее эндоплазменное движение становится поступательным. Все это отличает дизентерийную амёбу от кишечной, у которой нет деления на эндо- и эктоплазму; форма меняется очень медленно, и при образовании псевдоподий тело не перемещается в пространстве.

E. histolytica встречается в кишечнике в двух формах: тканевой и просветной. Тканевая форма, называемая также *E. histolytica forma magna*, получила свое название вследствие того, что она проникает в ткани хозяина и, поселяясь там, вызывает изъязвление стенки кишечника. Ее встречают в кале при остром амёбиазе. Размер этой амёбы колеблется в значительных пределах (от 16 до 60 мкм). В состоянии покоя, когда форма тела приближается к округлой, размер ее 20—30 мкм, а в вытянутом состоянии длина может быть в 2 раза больше. Наличие в протоплазме амёб эритроцитов является очень важным диагностическим признаком, так как непатогенные формы никогда их не содержат. Бактерии в протоплазме живой тканевой формы встречаются как исключение. Обычно они проникают в тело амёбы только после ее гибели. Просветная форма, или *E. histolytica forma minuta*, обитает в просвете кишечника (отсюда и ее название). В стенку кишечника она не внедряется, поэтому не вызывает ее изъязвления и соответствующей клинической картины. Просветная форма амёбы обнаруживается у лиц,

выздоровливающих от острого амёбиаза, у страдающих хронической формой заболевания и у носителей.

Отличия просветной формы от тканевой следующие: она меньше размером — обычно 12—25 мкм, изредка еще меньше. Движение совершается более медленно, хотя иногда наблюдается выбрасывание псевдоподий. В протоплазме эритроцитов нет и содержится небольшое количество бактерий.

Цисты *E. histolytica* правильной круглой формы, бесцветны, диаметр их в среднем 10—12 мкм. Протоплазма слегка зерниста, ядра (1—4) без окраски плохо различимы. В некоторых цистах можно заметить хроматидные тела — короткие, бесцветные, сильно преломляющие свет палочки с закругленными концами, которым приписывается роль запасного питательного материала. Эритроцитов цисты никогда не содержат.

В препарате, окрашенном раствором Люголя, можно обнаружить у цисты ясно различимую двухконтурную оболочку, ядра и гликогеновую вакуоль. Ядра выглядят как колечки, в центре которых в виде блестящей точки расположена кариосома. Зрелая циста содержит 4 ядра. Хроматидные тела не окрашиваются йодом.

Наиболее характерным признаком дизентерийной амёбы является строение ее ядра. Оно имеет округлую форму с диаметром 3—8 мкм и располагается в эндоплазме эксцентрично. В центре ядра находится округлая или многоугольная, правильная формы, около 0,5 мкм в поперечнике, кариосома, окруженная светлой зоной. Пространство между кариосомой и оболочкой не содержит никаких зерен. Дизентерийную амёбу необходимо отличать от обнаруживаемых в кишечнике непатогенных форм.

Entamoeba hartmanni — непатогенная амёба, имеющая наибольшее сходство с *E. histolytica* в строении тела, но отличающаяся значительно меньшей величиной. Вегетативные формы ее имеют размер от 5 до 12 мкм. Размер 4-ядерных цист — от 5 до 10 мкм. Движения ее совершаются медленно, эритроцитов она не фагоцитирует.

Entamoeba coli — наиболее часто встречающийся в кишечнике вид амёб. В нативном препарате вегетативная форма имеет размер 29—30 мкм в округлившемся состоянии и до 60 мкм в вытянувшемся. В протоплазме нет деления на эндо- и эктоплазму, она не содержит эритроцитов. В больших шелевидных вакуолях имеется значительное количество разнообразных включений: бактерии, грибы, лейкоциты, крахмальные зерна, цисты других простейших. Движения медленные, не имеют поступательного характера. В отличие от *E. histolytica* ядро заметно и в нативном и еще лучше в окрашенном йодом препарате. Цисты *E. coli* круглой формы, крупнее цист дизентерийной амёбы: их диаметр в среднем около 19—20 мкм. Двухконтурная оболочка толще, чем у *E. histolytica*. Ядер от 1 до 8, они могут быть заметны и в неокрашенных препаратах, но лучше видны после окраски йодом.

Стадия 4-ядерной цисты очень кратковременна и поэтому наблюдается редко в отличие от *E. histolytica*; нахождение 8-ядерных цист подтверждает их принадлежность к виду *E. coli*. В связи с тем что ядра лежат в разных плоскостях сферического тела цисты, то увидеть и правильно подсчитать их можно только, работая микрометрическим винтом. При окраске йодом можно заметить в ядре кариосому, а в протоплазме незрелых (1—2-ядерных) цист — большую гликогеновую вакуоль.

Endolimax nana — непатогенная амеба малого размера (в среднем около 7 мкм). В препарате свежeweделенного кала при температуре человеческого тела (на нагревательном столике) движения ее довольно активны, напоминают движения *E. histolytica*, но при остывании препарата они быстро прекращаются. Протоплазма, делящаяся на эндо- и эктоплазму, никогда не содержит эритроцитов, в ее вакуолях заметно лишь большое количество включенных микробов. Ядро в нативном препарате незаметно.

Цисты круглой или чаще овальной формы размером 8—16Х6—8 мкм содержат 1—4 ядра. Как в не окрашенном, так и в окрашенном йодом препарате их трудно отличить от мелких цист дизентерийной амебы.

Jodamoeba biltshlii — непатогенная амеба размером от 8 до 20 мкм. Движения медленные, быстро прекращающиеся при остывании препарата, псевдоподии образуются из эктоплазмы; эндоплазма зернистая, ее вакуоли содержат бактерии, крахмал и другие частицы, но никогда в них нет эритроцитов. В неокрашенных препаратах ядро обычно незаметно, при окраске гематоксилином оно довольно большого размера с тонкой оболочкой и большой кариосомой. Последняя лежит в центре ядра, занимая примерно половину его, и окружена светлой зоной.

Более характерными особенностями отличаются цисты этой амебы. Они имеют различную, часто неправильную форму, довольно толстую двухконтурную оболочку и, как правило, одно ядро. Наиболее характерен их вид при окраске раствором Люголя. На фоне зеленовато-желтой протоплазмы резко выступает ясно контурированная большая гликогеновая вакуоль, интенсивно окрашенная в красновато-коричневый цвет. Она занимает около половины протоплазмы. Изредка гликогеновых вакуолей бывает 2 или 3.

Класс жгутиковых (Flagellata). *Lambliа intestinalis*. Лямблии, как и описываемые ниже трихомонады, относятся к классу жгутиковых. Общей особенностью последних является наличие на поверхности тела одного или нескольких жгутиков, с помощью которых они передвигаются. В отличие от амеб тело жгутиковых покрыто оболочкой, наличие которой обуславливает постоянство их формы.

Лямблии паразитируют в тонком кишечнике человека, преимущественно в двенадцатиперстной кишке, а также в желчном пузыре. Существование вегетативной особи лямблии требует жидкой среды, поэтому, попадая в толстый кишечник, лямблии инцистируются и в кале находятся только цисты. Лишь при профузных поносах или после действия сильных слабитель-

ных с испражнениями могут быть выведены и вегетативные формы. Как правило, последние легко обнаруживаются в желчи при дуоденальном зондировании.

Вегетативные формы лямблий при рассмотрении их с передней поверхности имеют грушевидную форму, в профиль — ложкообразную. Это зависит от того, что на передней поверхности тела паразита имеется вдавление, представляющее собой присоску, с помощью которой он прикрепляется к клеткам кишечного эпителия. Питаются лямблии осмотически всей поверхностью тела. Длина последнего 10—20 мкм, ширина 8—10 мкм.

Живые лямблии находятся в состоянии непрерывного движения, преимущественно колебательного, осуществляемого четырьмя парами жгутиков. Несмотря на то что в нативном препарате внутреннее строение лямблии неразличимо и жгутики едва заметны вследствие быстрого их мелькания, облик паразита, особенно движущегося, настолько характерен, что спутать его ни с чем невозможно. Поэтому для диагностики, как правило, достаточно рассмотрения нативного препарата.

На окрашенных препаратах выявляется довольно сложное внутреннее строение лямблий. Они полностью билатерально симметричны. Посередине тела по его длине проходят два параллельных нитевидных опорных образования — аксостили. По обе стороны от них симметрично расположены 2 ядра и 4 пары блефаробластов — точечных телц, от которых отходит такое же число жгутиков. Имеется только одно непарное образование — парабазальное тело, отходящее в форме запятой от середины аксостили; назначение его неизвестно.

При исследовании кала наиболее важно уметь обнаружить и отличить цисты лямблий, обнаружение которых позволяет нередко поставить диагноз лямблиоза без дуоденального зондирования. В нативном препарате цисты лямблий выглядят овальными, реже круглыми, бесцветными, светопреломляющими образованиями длиной 10—14 мкм с двухконтурной прозрачной оболочкой.

Более ясная картина получается при окраске раствором Люголя. В таком препарате ясно видны оболочка цисты, аксостиль, 2 или 4 ядра, лежащие у одного из полюсов, блефаробласты, жгутики. Все это образует сложный, но характерный рисунок.

Trichomonas hominis. Кишечные трихомонады во многом похожи на влагалищные. Они имеют овальную или грушевидную форму, длина их 10—15 мкм. На переднем конне тела расположены 3—5 жгутиков, на заднем — один. От переднего конца к заднему тянется ундулирующая перепонка, которая находится в непрерывном движении, по ней как бы пробегают одна за другой волны, начинающиеся у переднего конца. Благодаря жгутикам и ундулирующей перепонке тело паразита находится в непрерывном движении: то поступательном, то колебательном, то вращательном. Движение ундулирующей перепонки хорошо заметно в нативном препарате под большим увеличением микроско-

па и позволяет определить вид простейшего. Цист трихомонада не образует. Вопрос о патогенности кишечных трихомонад окончательно не решен.

Chilomastix mesnli — непатогенный жгутиконосец, грушевидной формой тела напоминающий трихомонады. Отличается от последних отсутствием ундулирующей перепонки, наличием спиральной борозды, проходящей через все тело от переднего конца к заднему. Жгутиков четыре, расположены они у переднего конца, три из них направлены кпереди и обуславливают быстрое вращательное движение простейшего, и один жгутик лежит вдоль ротового отверстия. Последнее находится в переднем конце и по длине равно $\frac{1}{3}$ — $\frac{1}{2}$ тела. Длина *Chilomastix mesnli* 13—24 мкм, ширина 6—10 мкм. На окрашенном препарате видно круглое ядро, расположенное в передней части тела, с несколькими зернами хроматина и одной кариосомой. В протоплазме много пищевых вакуолей, наполненных бактериями. Аксостилия нет. Цисты формой напоминают лимон размером 7—9 X 5—6 мкм. В окрашенных йодом цистах видны одно ядро, извивающийся жгутиков аппарат и фибриллы, окаймляющие цнстостом.

Класс ресничных (Ciliata). *Balantidium coli*. Балантидий — единственная ресничная инфузория, паразитирующая в кишечнике человека и вызывающая заболевания различной тяжести — от легких Колитов до тяжелых язвенных поражений. Встречается и носительство у здоровых людей. *B. coli* — самый крупный из обнаруживаемых в кишечнике человека простейших организмов. Размер его овального тела 50—90 X 30—65 мкм, однако встречаются особи, достигающие 150—200 мкм.

Эту инфузорию вследствие больших размеров легко увидеть и отличить даже под малым увеличением микроскопа благодаря ее большой подвижности. Передвижение *B. coli*, совершаемое с помощью ресничек, настолько быстрое, что паразит то и дело исчезает из поля зрения и препарат приходится передвигать, чтобы за ним уследить. Подвижность его сохраняется довольно долго и после остывания кала.

Для обнаружения вегетативных форм *B. coli* обычно используют нативный препарат. Форма тела *B. coli* яйцевидная, несколько суженная к переднему концу, где помещается воронкообразное углубление — перистом играющее роль рта и пищевода. Все тело инфузории покрыто ресничками, располагающимися параллельными рядами, идущими по длине тела несколько наискосок. Перистом также покрыт ресничками, загоняющими внутрь его пищевые частички. В средней части тела расположено большое бобовидной формы ядро—макронуклеус, в углублении которого лежит маленький пузырьковидный микронуклеус (они лучше видны на окрашенных препаратах). В протоплазме имеются 2, (реже 1—3) пульсирующие сократительные вакуоли, служащие примитивными органоидами выделения, а также несколько пищеварительных вакуолей, содержащих бактерии, эритроциты, лейкоциты, зерна крахмала и другие продукты питания паразита.

B. coli образует цисты сферической формы диаметром 50—60 мкм. Они покрыты бесцветной двухконтурной оболочкой. В окрашенных препаратах у них виден макронуклеус и одна сократительная вакуоль (нефункционирующая).

Класс споровиков (Sporozoa). *Blastocystis hominis*. В кале нередко встречается образование, похожее на цисты простейших и могущее быть принято за них. Это бластоциста (гриб) *Blastocystis hominis*. Он обнаруживается чаще в жидком, чем нормальном, кале, но является, по-видимому, безвредным обитателем кишечника, Бластоцисты легко отличить от цист простейших при окраске йодом. Они имеют почти правильную круглую форму, различную величину — от 5 до 30 мкм в диаметре. Вся центральная часть их тела занята большой вакуолью — гомогенной, круглой, не окрашивающейся йодом. Протоплазма оттеснена к периферии и окружает вакуоль тонким слоем в виде кольца.

2.2.6. Обнаружение гельминтов

В СССР встречается несколько десятков видов червей, паразитирующих в кишечнике человека. Действие гельминтов на организм человека многообразно и различно. Они могут вызывать токсические и токсико-аллергические явления (аскариды, трихинеллы), оказывать механическое воздействие, травмируя стенку кишечника; паразиты (например, анкилостомы) могут вызывать кровотечения, приводящие к малокровию, а также способствовать проникновению патогенных микробов из содержимого кишечника; они могут закрыть просвет как кишок, так и выводящих протоков печени и поджелудочной железы (аскариды); развиваясь в тканях органов (эхинококк, цистицерк), они сдавливают и разрушают эти органы. Наконец, все гельминты используют питательные вещества из кишечника хозяина, что может привести к истощению макроорганизма (цепни) и авитаминозу, в частности к авитаминозу В₁₂ при инвазии широким лентецом (анемия типа пернициозной). Некоторые инфекционные заболевания, например бактериальная дизентерия, протекают тяжелее и труднее поддаются лечению при наличии в кишечнике гельминтов.

Гельминтологическое исследование — важная составная часть общего анализа кала, а нередко проводится как самостоятельное. При исследовании обнаруживают гельминты и их яйца. Первые выявляют в большинстве случаев макроскопическим путем; микроскопический метод позволяет обнаружить как яйца, так и мелкие особи червей или их личинки.

Паразитирующие у человека черви принадлежат к одному из двух подтипов — круглых (нематод) и плоских (платод). Последние в свою очередь делятся на ленточных червей — цестод и сосальщиков — трематод.

Макрогельминтологическое исследование производят для проверки результатов дегельминтизации, а также в тех случаях, когда пред-

полагается наличие паразита, не выделяющего яиц в просвет кишечника.

Для макроскопического исследования, в особенности после изгнания паразитов, следует осмотреть все выделенное количество фекалий. На поверхности оформленного кала можно увидеть остриц. Членики вооруженного и невооруженного цепней могут располагаться как на поверхности, так и внутри каловых масс. Зрелые членики (проглотнды) невооруженного цепня обладают способностью к самостоятельному движению и могут выползть из анального отверстия и вне дефекации. Одного осмотра их достаточно для установления характера паразита.

Для выяснения видовой принадлежности члеников цепней их помешают, слегка сдавливая, между двумя предметными стеклами и рассматривают на свет. Обычно при таком способе можно различить форму-матки в членике, что достаточно для распознавания вида паразита. Если картина недостаточно ясна, членики просветляют, подержав их немного в глицерине. Эту манипуляцию следует производить очень осторожно и аккуратно. При сдавлении зрелого членика (а отрываются и выделяются именно зрелые членики) из него выдавливаются в большом количестве яйца. При попадании в человеческий организм находящиеся в яйцах онкосферы (зародыши) разносятся по тканям, где превращаются в финны. Последние, попадая в мозг, глаз и т. д., могут вызывать тяжелые поражения (цистицеркоз). Поэтому нужно следить за тем, чтобы жидкость с выдавленными яйцами не попала на руки или окружающие предметы. Все предметы, бывшие в соприкосновении с зараженными яйцами материалом, должны тщательно дезинфицироваться. Наиболее действенным дезинфекционным средством, помимо кипячения, является 5 % раствор карболовой кислоты, в котором яйца тениид погибают в течение 2 ч.

Аскариды вследствие своего большого размера обычно обнаруживаются без обработки фекалий. Членики крупных цестод хорошо выделяются при суспендировании кала с небольшим количеством воды.

Однако одного осмотра кала недостаточно для обнаружения мелких гельминтов, а также для нахождения головки цепней и лентецов, что важно при изгнании. С целью более детальных поисков испражнения размешивают с водой и затем либо просматривают полученную взвесь, либо процеживают ее через сито.

В первом случае можно применить один из двух методов. Более простой состоит в том, что кал размешивают с относительно небольшим количеством воды до жидкой консистенции и затем всю полученную массу просматривают невооруженным глазом или с помощью лупы, наливая ее небольшими порциями тонким слоем в темные юветы или в чашки Петри, поставленные на черный фон.

При втором способе испражнения размешивают с 2—3 л воды в большом цилиндре или стеклянной банке. Через 1—2 ч, когда крупные частицы, в числе которых будут и гельминты,

осядут на дно, мутную надосадочную жидкость осторожно сливают, а на осадок снова наливают воду и размешивают содержимое сосуда. После вторичного осаждения крупных частиц воду снова сливают; такое промывание осадка повторяют до тех пор, пока надосадочная жидкость не станет прозрачной. Можно оставить разбавленный водой кал для отстаивания и на сутки, но в таком случае к нему прибавляют для консервирования формалин (примерно по 10 мл на 1 л воды). Отмытый осадок просматривают на темном фоне, как при первом способе. В случае поисков очень мелких гельминтов (трихостронгилиды, трихинеллы, стронгилоиды и т. п.) чашку Петри ставят на столик микроскопа и просматривают ее содержимое под малым увеличением.

Некоторые мелкие гельминты, как карликовый цепень и др., иногда всплывают из осадка. Поэтому при обнаружении на поверхности воды белых комочков их следует выловить пипеткой с насаженным на нее баллоном и просмотреть под лупой или микроскопом.

Сравнительные данные о яйцах гельминтов приведены в табл. 22.

Унифицированные методы исследования гельминтов, их фрагментов и яиц (1974). Обнаружение гельминтов. Принцип. При исследовании водной эмульсии каловых масс гельминтов обнаруживают на темном фоне.

Реактив: глицерин.

Ход исследования. Готовят водную эмульсию каловых масс, затем тщательно просматривают отдельные небольшие порции в черных фотографических юветях или в чашках Петри на темном фоне. Пинцетом извлекают все обнаруженные белые частицы. Крупные образования рассматривают под лупой между двумя предметными стеклами. Если предполагают обнаружение мелких форм гельминтов или головок цестод после лечения, то обнаруженные частицы исследуют под лупой в капле глицерина.

Оценка результатов исследования. Определение вида нематод возможно лишь по целым экземплярам, реже — по крупным фрагментам. Цестоды отличают со зрелым членикам, гермафродитным членикам и сколексам.

Примечание. При отсутствии глицерина возможно исследование в капле воды.

Обнаружение яиц гельминтов методом толстого мазка (метод Като). Принцип. При просветлении глицерином и подкрашивании малахитовым зеленым в толстом мазке обнаруживают яйца гельминтов.

Реактивы. 1. 3 % водный раствор малахитового зеленого. 2. Глицерин. 3. 6 % водный раствор фенола. 4. Смесь Като: 6 мл 3 % водного раствора малахитового зеленого, 500 мл глицерина, 500 мл 6 % раствора фенола. Стабилен при хранении в закрытой посуде при комнатной температуре. 5. Целлофановые покровные пластинки по Като размером 20 X 40 мм. Хранят в смеси Като (3—5 мг смеси на 100 пластинок). Готовы к употреблению через 24 ч.

Т а б л и ц а 22. Сравнительные данные о яйцах гельминтов¹

Наименование гельминта	Описание яйца	Размеры яйца, мкм	Где встре- чается
Круглые черви (нематоды)			
Аскарида (<i>Ascaris lumbricoides</i>)	Яйцо овальное с бугристой бурой белковой оболочкой. Она может отсутствовать, тогда оболочка гладкая, двухконтурная. В оплодотворенных яйцах содержимое на полюсах отстает от оболочки. Неоплодотворенные яйца длиннее, неправильной формы, с грубозернистым содержимым	Оплодотворенные: 45—78 × 35—60. Неоплодотворенные: 80—90 × 35—60.	В кале
Острица (<i>Enterobius vermicularis</i>)	Яйцо овальное, с одной стороны уплощенное, бесцветное, прозрачное	50—60 × 20—32	То же
Власоглав (<i>Trichocephalus trichiurus</i>)	Яйцо в виде бочонка с пробками на обоих полюсах, с толстой оболочкой желтого или коричневого цвета	50—55 × 22—25	» »
Томинкс (<i>Thominx aerophilus</i>)	Яйцо в виде бочонка с пробками на полюсах. Оболочка толстая сероватая, покрыта сложным узором	65—70 × 29—31	В мокроте и кале
Кривоголовка двенадцатиперстная (<i>Ancylostoma duodenale</i>)	Яйцо овальное бесцветное прозрачное с тонкой гладкой оболочкой. В свежих испражнениях содержит 2—8 шаров дробления	54—70 × 34—40	В кале
Некатор (<i>Necator americanus</i>)		64—76 × 36—40	То же
Трихостронгилиды (<i>Trichostrongyloidea</i>)	Яйцо овальное бесцветное прозрачное с тонкой гладкой оболочкой. Один конец более притуплен, другой сужен. В свежих испражнениях содержит 16 и более шаров дробления	70—80 × 40—43	» »
Ленточные черви (цестоды)			
Цепень невооруженный ² (<i>Taeniarynchus saginatus</i>)	Яйцо круглое с 2 нитевидными отростками, содержит онкосферу — зародыш в оболочке. В испражнениях только онкосферы, круглые или слегка овальные, с толстой радиально исчерченной коричневой оболочкой, внутри которой зародыш с 3 парами крючьев	30—40 × 20—30	В кале
Цепень вооруженный ² (<i>Taenia solium</i>)		30—40 × 20—40	
Цепень карликовый (<i>Hymenolepis nana</i>)	Яйцо круглой или эллиптической формы, сильно преломляет свет. Имеет 2 тонкие оболочки, из которых внутренняя одевает онкосферу. Между оболочками жидкость, в которой плавают извитые тонкие нити. В онкосфере 6 крючьев	45—60 × 35—45 Онкосфера 29—30	» »
Цепень крысиный (<i>Hymenolepis diminuta</i>)	Яйцо круглое или слегка овальное, желтоватое с толстой неясно радиарно исчерченной оболочкой. В онкосфере 6 крючьев	60—85 × 50—70	» »
Цепень тыквидный (<i>Dipylidium caninum</i>)	Яйца круглые, красноватого цвета, с 6 крючками в онкосфере. Группы яиц по 8—15 штук заключены в общую капсулу (кокон)	20—40	» »
Лентец широкий (<i>Diphyllobothrium latum</i>)	Яйца овальной формы, желтого или коричневого цвета. На одном полюсе крышечка, на противоположном — бугорок. Внутри яйца крупнозернистое содержимое	65—71 × 45—47	» »
Лентец малый (<i>Diphyllobothrium mi-</i> <i>num</i>)	Яйца неотличимы от яиц широкого лентеца	58—72 × 41—49	» »

Наименование гельминта	Описание яйца	Размеры яйца, мкм	Где встре- чается
Лентец узкий (<i>Diphyllobothrium strictum</i>)	Яйцо эллиптической формы с крышечкой, но без бугорка	54—57×40	В кале
Лентец тунгусский (<i>Diphyllobothrium tungussicum</i>)	Яйцо с крышечкой на одном и бугорком на другом полюсе. Отличается от яиц других лентецов неровной сетчатой обо- лочкой, похожей на скорлупу грецкого ореха	72—75×41—48	То же
Сосальщики (трематоды)			
Двуустка кошачья (<i>Opisthorchis felineus</i>)	Овальное яйцо с тонкой оболочкой, не- сколько более суживающееся к полюсу с крышечкой. На противоположном полюсе шипик. Содержимое мелкозернистое. Цвет светло-желтый	26—30×11—15	В кале и дуодена- льном соке
Двуустка китайская (<i>Clonorchis sinensis</i>)	Яйцо значительно суживается к полюсу с крышечкой. Крышечка уплощена, по ее краю — выступ оболочки. На противо- положном полюсе — маленький бугорок. Цвет темно-коричневый	27—35×12—19	То же
Двуустка печеночная (<i>Fasciola hepatica</i>)	Правильная яйцевидная форма. Гладкая тонкая оболочка с маленькой крышечкой. На противоположном полюсе плоский бугорок. Вся полость яйца заполнена равномерными желточными клетками	130—145×70—90	» »
Двуустка ланцетовид- ная (<i>Dicrocoelium lancea- tum</i>)	Яйцо овальное, слегка уплощенное с од- ной стороны, с толстой коричневой обо- лочкой и крышечкой. В зрелых яйцах 2 крупные овальные клетки на стороне, противоположной от крышечки	38—45×22—30	То же
Двуустка легочная [<i>Paragonimus west- ermani (ringeri)</i>]	Овальное золотисто-коричневое яйцо, похожее на яйцо печеночной двуустки. Крышечка как бы вдавлена в яйцо	80—118×48—65	В мокрот- е, изред- ка в кале
Метагонимус йокага- вай (<i>Metagonimus yoko- gawai</i>)	Походит на яйцо сибирской двуустки, но оболочка толще и грубее. Выступы вокруг крышечки меньше. Противоположный конец яйца расширен, на нем маленький шипик	26—30×15—17	В кале
Нанофетес Шихоба- ловой (<i>Nanophyetes schikhobalovi</i>)	Неотлично от яйца широкого лентеца	62—72×43—48	То же
Шистосома Мансона (<i>Schistosoma manso- ni</i>)	Яйцо овальной формы без крышечки. На боковой поверхности шип в виде слегка загнутого крючка	110—162×60—70	» »
Шистосома японская (<i>Schistosoma japoni- cum</i>)	Яйцо овальной формы с бледно-желтой оболочкой без крышечки. Крючковидный шип очень мал, почти незаметен	70—100×50—80	» »

¹ Из кн.: Михайлова Н. Д. Пособие по копрологическим исследованиям. — Л., 1962.

² Определение вида по яйцу невозможно. Необходимо ограничиться определением семейства (тенинды).

Специальное оборудование: микроскоп.

Ход исследования. Кусочек кала наносят на предметное стекло, покрывают пластинкой Като и придавливают так, чтобы кал размазывался по стеклу в пределах пластинки. Мазок оставляют при комнатной температуре для осветления, затем микроскопируют его. Время просветления должно быть не более 1 ч. В жаркое время года мазок микроскопируют через 30 мин. Чтобы избежать резкого высыхания препарата, на пластинку в некоторых случаях кладут влажную губку.

Оценка результатов. Подсчитывают обнаруженные яйца гельминтов во всем мазке с учетом их видовой принадлежности. Метод выявляет заражение аскаридами, власоглавами, трематодами, тениидами и другими видами, иногда анкилостомами и карликовым цепнем.

Обнаружение яиц гельминтов методом обогащения. **Принцип.** Используемый для подготовки суспензии каловых масс флотационный раствор имеет большую относительную плотность, чем яйца гельминтов. Яйца всплывают на поверхность, из образующейся пленки делают препараты и микроскопируют.

Реактивы. 1. Флотационный раствор по Калантарян: водный раствор нитрата натрия (на 1 л воды 1 кг вещества) кипятят до образования пленки и, не фильтруя, помещают в сухие бутылки. Относительная плотность раствора 1,38. 2. Возможно использование флотационного раствора по Брудастову и Красноносу: 900 г нитрата натрия и 400 г нитрата калия при подогревании растворяют в 1 л воды. Относительная плотность раствора 1,47—1,48.

Специальное оборудование. 1. Микроскоп. 2. Химические стаканы вместимостью 200 мл.

Ход исследования. В 100—200 мл одного из флотационных растворов размешивают 5—10 г кала. Удаляют стеклянной палочкой с поверхности всплывшие крупные частицы. К поверхности солевого раствора прикладывают предметное стекло. Предметное стекло должно полностью соприкасаться с поверхностью раствора. Раствор отстаивают 20—30 мин, затем предметное стекло снимают и просматривают под микроскопом без покровного стекла всю пленку, прилипшую к поверхности предметного стекла. Чтобы избежать высыхания препарата, пленку можно смешать с 2 каплями 50 % раствора глицерина.

Оценка результатов. Отмечают все яйца гельминтов, найденные в препарате. Можно обнаружить яйца аскарид, власоглавы, анкилостомид, тениид, трематод.

Обнаружение яиц гельминтов методом Крайликовича (применение детергентов). **Принцип.** Поверхностно-активные вещества, которые находятся в составе детергентов, осеждают яйца гельминтов от каловых масс и концентрируют яйца в осадке.

Реактив. 1 % раствор стирального порошка «Лотос» (порошок высушивают в сушиль-

ном шкафу при 100 °С в течение 1—2 ч; 10 г порошка растворяют в 1 л воды).

Специальное оборудование. 1. Сушильный шкаф. 2. Микроскоп. 3. Слянки с крышками вместимостью 30—50 мл. 4. Целлофановая пластинка по Като. 5. Пастеровские пипетки.

Ход исследования. **Метод 1:** в склянку к 20—30 мл раствора детергента добавляют порцию кала, так чтобы соотношение раствора и кала было примерно 1 : 20. Кал держат в растворе не менее суток. В образовавшийся на дне склянки осадок, состоящий из трех слоев, где средний слой составляют яйца гельминтов, вводят пастеровскую пипетку и набирают 1—3 капли жидкости из среднего слоя, переносят на предметное стекло. Каплю покрывают пластинкой Като и препарат микроскопируют. На одном стекле должно быть не менее 2 препаратов.

Метод 2: кал суспендируют в растворе детергента (соотношение по массе 1 : 10). Через 30 мин содержимое пробирки перемешивают в течение 1—2 мин и центрифугируют при 1000—1500 об/мин. На одном стекле готовят два препарата из осадка.

Оценка результатов. При исследовании учитывают все яйца гельминтов, обнаруженные в препаратах. Метод позволяет диагностировать заражение всеми видами гельминтов.

Примечания. 1. Кроме «Лотоса», можно использовать и другие порошки, но при условии подбора соответствующей концентрации раствора, для чего берут максимальную навеску, растворяющуюся без осадка. 2. Кал следует помещать в раствор детергента не более чем через 1 ч после дефекации.

Обнаружение яиц гельминтов в перианально-ректальных соскобах с помощью деревянного шпателя. **Принцип.** Яйца гельминтов счищают деревянным шпателем с перианальных складок.

Реактивы. 1. 50% раствор глицерина. 2. 1% раствор гидрокарбоната натрия (NaHCO_3).

Специальное оборудование: микроскоп.

Ход исследования. Соскоб производят с поверхности перианальных складок у ануса и в нижних отделах прямой кишки шпателем. Соскоб делают до дефекации утром или вечером (через 2—3 ч после того, как больной лег спать). Шпатель перед соскабливанием смачивают в 50 % растворе глицерина или в 1 % растворе гидрокарбоната натрия. Материал со шпателя помещают с помощью покровного стекла на предметное стекло в каплю 50 % глицерина и, накрыв покровным стеклом, микроскопируют. Шпатель после взятия соскоба сжигают.

Оценка результатов. Метод применяют для диагностики тениаринхоза и энтеробиоза.

Обнаружение личинок гельминтов по методу Бермана. **Принцип.** Метод основан на способности личинок гельминтов мигрировать по направлению к теплу.

Реактивы не требуются.

Специальное оборудование. 1. Микроскоп. 2. Металлическая сетка. 3. Штатив. 4. Зажимы. 5. Резиновые трубки. 6. Центрифуга.

Техника исследования. Стекланую воронку с резиновой трубкой на узком конце укрепляют в штативе (трубка зажата зажимом). Металлическую сетку с 5—10 г кала помещают в воронку, заполняют воронку водой (40—50 °С) так, чтобы вода касалась нижней части сетки. Через 4 ч, когда личинки перейдут в теплую воду и скопятся в нижней части трубки, зажим открывают и сливают воду в центрифужные пробирки. Центрифигируют 2—3 мин, надсадочную жидкость сливают, а осадок помещают на предметное стекло и микроскопируют.

Оценка результатов. Метод применяют при диагностике стронгилоидоза.

Обнаружение личинок гельминтов при культивировании их на фильтровальной бумаге (метод Харата и Мори). Принцип. В тепле на влажной фильтровальной бумаге из яиц анкилостом развиваются филяриевидные личинки.

Специальное оборудование: микроскоп.

Ход исследования. На фильтровальную бумагу (15 X 1,5 см) наносят 0,5 г кала. Бумагу помещают в пробирку, на 1/4 заполненную водой так, чтобы свободный от кала конец был под водой, а другой выступал из пробирки и был зажат пробкой. Пробирка 5—6 дней стоит в термостате при 28 °С. Личинки, появившиеся из яиц, оседают на дне пробирки. Бумагу извлекают из пробирки и уничтожают, жидкость исследуют с помощью лупы. Для уточнения можно центрифигировать жидкость и микроскопировать осадок.

Оценка результатов. Под лупой выявляют филяриевидные личинки анкилостомы или некаторов.

Примечания. 1. В теплое время года пробирку можно держать при комнатной температуре, время инкубации в этих условиях 8—10 дней. 2. Кал для исследования нужно брать не более чем через 1 ч после дефекации.

Ошибки, возможные при определении яиц гельминтов. Неопытный микроскопист может при исследовании кала на яйца гельминтов быть введен в заблуждение присутствием в препарате элементов, близко их напоминающих. Это растительные клетки, капельки жира, пузырьки воздуха и т. д. Отличительными признаками яиц гельминтов являются правильная, большей частью овальная или округлая форма, наличие ясно выраженной оболочки, определенный размер, характерное внутреннее содержимое. Пузырьки воздуха отличаются от яиц гельминтов очень резкими контурами и прозрачной серединой. Капли

жира при легком прижатии покровного стекла меняют свою форму, в то время как яйца гельминтов при этом не изменяются.

Растительные клетки иногда по величине и наличию двухконтурной оболочки могут напоминать яйца гельминтов, но контуры их обычно неправильные, а отдельные клетки, встречающиеся в одном препарате, имеют различные величины и форму. Одинаковыми по размеру и форме, похожими на яйца гельминтов оказываются споры некоторых грибов, хорошо сохраняющиеся в кале. Споры сморчка по форме очень похожи на яйца власоглава, споры подберезовика и подосиновика напоминают яйца острицы, крупные споры некоторых растений похожи на онкосферы цепней. Но все они значительно меньшего размера, чем яйца гельминтов, и не имеют характерного содержимого (например, крючьев в онкосферах цепней).

Из элементов, еще более похожих на яйца паразитических червей человека, следует упомянуть яйца *Heterodera marioni* — мелкой нематоды, паразитирующей на корнеплодах. Они похожи на яйца трихостронгилид, но отличаются бобовидной формой, а также тем, что на полюсах между оболочкой и содержимым яйца (шарами дробления) расположены бесцветные образования неправильно овальной формы. Эти яйца являются «транзитными». Встречаются в кале и крупные яйца мучного клеща, по размерам приближающиеся к яйцам печеночной двуустки. Они овальные, светло-желтые с тонкой оболочкой и без крышечки.

Некоторое сходство с личинками червей (например, строигилоида) могут иметь растительные волоски.

Сравнительные данные о яйцах гельминтов см. в табл. 18.

Литература. Бурдасов А. Н., Рустамов Б. Р., Краснонос Л. Я. — В кн.: Актуальные проблемы медицинской паразитологии и тропической медицины. Тбилиси, 1970, с. 185; Калатарян Е. В. — Мед. паразитол., 1938, № 1, с. 142; Красильников А. А. — Мед. паразитол., 1970, № 3, с. 318; № 6, с. 678; Майорова Л. А., Москвитина М. Г. Предложения по унификации методов лаб. диагн. гельминтозов. — В кн.: Унифицированные методы клин. лаб. исследований / Под ред. В. В. Меньшикова. М., 1972, вып. 4, с. 275; Махмудова Ш. А. — Мед. паразитол., 1968, № 2, с. 180; Михайлова Н. Д. Пособие по копрологическим исследованиям. — Л., 1962; Подъяпольская В. П., Капустин В. Ф. Глистные болезни человека. — М., 1958; Сафаралиев Р. С. Медицинская паразитология и паразитарные болезни. — М., 1963; Соловьев М. М., Москвитина М. Г. Предложения по унификации методов лаб. диагностики простейших кишечника. — В кн.: Унифицированные методы клин. лаб. исследований / Под ред. В. В. Меньшикова. М., 1974, вып. 5, с. 275; Катoh Katsuya. — Мед. паразитол., 1970, № 6, с. 733.

2.3. ЖЕЛУДОЧНАЯ СЕКРЕЦИЯ

Исследование желудочной секреции складывается из двух основных этапов — желудочного зондирования, проводимого с использованием стимуляторов секреции желудка, результатом которого является получение желудочного содержимого в различные периоды секреторной деятельности желудка, и исследования полученного желудочного содержимого. Результатом правильного проведения обоих этапов исследования являются данные, позволяющие достоверно оценивать секреторную деятельность желудка.

Общие требования к зондовому исследованию желудочной секреции: получение чистого желудочного сока, максимально достоверное изучение работы желез желудка в различные периоды секреторного цикла, применение адекватного поставленным целям стимулятора желудочной секреции, изучение качественного и количественного состава желудочного сока, простота выполнения и правильная оценка противопоказаний к данному исследованию.

2.3.1. Методы желудочного зондирования

Метод исследования толстым зондом надо расценивать как устаревший, так как одномоментность получения желудочного содержимого не позволяет достоверно оценить желудочную секрецию ни с качественной, ни с количественной стороны. Преимущество многомоментного исследования желудочной секреции тонким зондом заключается в получении чистого желудочного сока на протяжении длительного времени, т. е. на различных этапах секреторной деятельности желудка.

Унифицированная методика зондирования желудка при многомоментном исследовании желудочной секреции (1974). Принцип зондирования тонким зондом. Получение чистого желудочного секрета путем активной аспирации на различных этапах секреторной деятельности желудка.

Оборудование. 1. Тонкий зонд (полая резиновая трубка диаметром 4—5 мм, длиной около 1,5 м с метками на расстоянии 50—55 см и 70—75 см от слепого конца зонда. 2. Пробирки. 3. Штативы для пробирок. 4. Лоток. 5. Воронка. 6. Шприц вместимостью 20 мл или водоструйный насос стандартной конструкции, или аспирационный вакуум-отсос. 7. Один из активных стимуляторов желудочной секреции.

Ход зондирования. Зондирование лучше проводить в специальном помещении. Исследование начинают утром натощак после 14-часового голодания. Конец тонкого зонда помещают в глубине глотки на корень языка и предлагают пациенту сделать несколько неторопливых глотательных движений, благодаря чему зонд продвигается по пищеводу. Введение зонда до первой метки свидетельствует о том, что внутренний конец его находится в области дна желудка, а продвижение зонда до второй метки указывает на то, что он достиг привратни-

ка желудка. Необходимым условием полного извлечения желудочного содержимого является введение зонда на глубину, рассчитанную следующим образом: рост пациента в сантиметрах минус 100. В случае необходимости положение зонда можно контролировать рентгенологически. После введения зонда полностью извлекают содержимое желудка натощак, что составляет отдельную порцию для исследования. Надо стремиться, чтобы от введения зонда до извлечения порции натощак прошло не более 5 мин, т. е. длительности латентного периода возбуждения желудочных желез. Затем в течение часа собирают секрет желудка, выделяющийся в результате стимулирующего влияния зонда и аспирации (базальный секрет), а потом уже начинают активную стимуляцию работы слизистой оболочки желудка, после чего желудочный сок собирают также в течение часа. Аспирацию базального и стимулированного сока проводят по 5 мин через 10-минутные интервалы или непрерывно, отмечая при этом 15-минутные порции желудочного секрета. Таким образом, за каждый час получают 4 порции желудочного сока, которые составляют так называемое часовое напряжение соответствующего периода желудочной секреции. Полученные порции желудочного сока подвергают физико-химическому исследованию.

Метод зондирования желудка по Н. И. Лепорскому. Принцип. Получение чистого желудочного сока натощак и после стимуляции секреции введением в желудок капустного сока или 7 % отвара сухой капусты. Влияние их на желудочную секрецию одинаково. В практической медицине чаще пользуются 7 % отваром сухой капусты.

Приготовление унифицированного стимулятора желудочной секреции отвара из сухой капусты (1974): 21 г сухой капусты заливают 500 мл воды и кипятят 30—40 мин, пока не останется приблизительно 300 мл жидкости. Отвар процеживают через 2 слоя марли и хранят в холодильнике. Окончательная стандартизация стимулятора достигается последующим титрованием. 10 мл отвара титруют 0,1 н. раствором едкого натра в присутствии 1—2 капель 1 % спиртового раствора фенолфталеина до легкого потемнения, в качестве контроля используют исходный отвар сухой капусты. Количество щелочи, пошедшей на титрование, умножают на 10. Полученная величина является титром приготовленного отвара. Титр отвара для стимуляции желудочной секреции должен быть 20; если он больше, то отвар разбавляют кипяченой водой, если меньше, то кипятят до получения нужной концентрации.

Ход исследования. После аспирации содержимого желудка натощак через зонд при помощи воронки в желудок вводят 200 мл отвара капусты, подогретого до 37°C, через 10 мин извлекают 10 мл содержимого (контрольная порция), а еще через 15 мин аспирируют из желудка все содержимое, затем в течение часа

с интервалами 15 мин собирают чистый желудочный сок, который наряду с порцией натошак подвергают исследованию (всего 5 порций желудочного сока).

Субмаксимальный гистаминовый тест (модифицированный метод Лямблея). Принцип. Получение чистого желудочного сока до и после стимуляции секреции введением раствора гистамина.

Ход исследования. После аспирации желудочного содержимого натошак в течение часа собирают базальный секрет с интервалами 15 мин, затем пациенту вводят подкожно гистамин дигидрохлорид 0,008 мг/кг (0,08 мг на 10 кг) или гистамина фосфат 0,01 мг/кг, далее на протяжении часа получают четыре 15-минутные порции желудочного сока, отделяющегося в ответ на введение гистамина.

Максимальный гистаминовый тест Кейя в модификации Е. С. Рыса и А. Р. Лужис. Принцип. Получение чистого желудочного сока до и после стимуляции секреции максимальной дозой гистамина на фоне антигистаминных препаратов.

Ход исследования. После аспирации желудочного сока натошак в течение 30 мин собирают базальный секрет, затем внутримышечно вводят 2 мл 2 % раствора супрастина (или другого блокатора Н₁-рецепторов гистамина) и продолжают еще 30 мин собирать базальный секрет. Далее вводят подкожно дигидрохлорид гистамина 0,025 мг/кг и после этого в течение часа продолжают собирать желудочный сок, отмечая 15-минутные интервалы.

Примечание. Как эффективные стимуляторы секреции, позволяющие получить чистый желудочный сок и не дающие побочных эффектов, применяют также гастрин (2 мкг/кг) и его синтетический аналог пентагастрин (6 мкг/кг) подкожно.

2.3.2. Исследование желудочного содержимого

Исследование желудочного сока включает определение физических свойств, химическое и микроскопическое исследование.

Физические свойства. Количество. Измеряют каждую порцию желудочного сока и высчитывают его объем во все фазы секреторного цикла. Объем сока натошак не должен превышать 50 мл, в условиях базальной секреции объем сока за час может быть 50—100 мл, при исследовании по Лепорскому после стимуляции часовой объем секреции 50—110 мл, при субмаксимальной стимуляции гистамином — 100—140 мл за час, а в ответ на максимальную стимуляцию за час выделяется 180—220 мл желудочного сока.

Цвет. Обычно желудочное содержимое бесцветное, желтая или зеленоватая окраска желудочного сока говорит о примеси желчи, а красноватая или коричневая — о примеси крови.

Запах. Нормальный желудочный сок запаха практически не имеет, появление неприятного

гнилостного запаха свидетельствует о нарушении эвакуации из желудка.

Примеси. Обычно в желудочном соке примесей практически нет, за исключением небольшого количества слизи. Остатки пищевых масс, которые могут быть обнаружены, говорят о нарушении эвакуации из желудка, а примесь большого количества слизи — о поражении его слизистой оболочки.

Химическое исследование. Определение кислотности. Принцип. Определение концентрации свободной, связанной НСІ и общей кислотности методом нейтрализации при титровании щелочью в присутствии индикаторов, меняющих окраску в зависимости от рН среды. Диметиламиноазобензол меняет окраску с красной на желтую в диапазоне рН от 2,4 до 4,0, ализаринсульфоновокислый натр — с желтой на фиолетовую в зоне рН от 5,0 до 6,8, а фенолфталеин приобретает красную окраску при рН более 8,2.

Посуда и оборудование. 1. Бюретки вместимостью 20; 25 или 50 мл. 2. Штатив Бунзена. 3. Химические стаканы вместимостью 50 мл. 4. Пипетки Мора или градуированные на 5 мл. 5. Воронки. 6. Пробирки. 7. Фильтры бумажные.

Метод Михаэлиса. Реактивы. 1. 1 % спиртовой раствор фенолфталеина. 2. 0,5 % спиртовой раствор диметиламиноазобензола. 3. 0,1 н. раствор едкого натра.

Ход исследования. В химический стакан отмеривают 5 мл профильтрованного желудочного сока, затем вносят каплю раствора диметиламиноазобензола и каплю раствора фенолфталеина. Титруют из бюретки раствором едкого натра, предварительно отметив уровень реактива в бюретке (I уровень). При появлении желто-оранжевой окраски (цвет семги) отмечают II уровень, а при первом появлении лимонно-желтой окраски — III уровень, затем продолжают титровать до перехода окраски в стойко розовый цвет — IV уровень.

Расчет. Количество щелочи, пошедшей на титрование до первого изменения окраски (разница между II и I уровнем), определяет концентрацию свободной НСІ в желудочном соке. Количество щелочи, пошедшей на все титрование, от красной окраски диметиламиноазобензола в резко кислой среде до красной окраски фенолфталеина в щелочной среде, т. е. разница между IV и I уровнем, соответствует общей кислотности. Количество щелочи, пошедшей на титрование до уровня, oznaчающего среднее арифметическое между III и IV уровнем, соответствует концентрации всей НСІ (т. е. сумме свободной и связанной), а концентрацию связанной НСІ находят по разности между всей НСІ и свободной НСІ. Разность между общей кислотностью и всей НСІ называют кислотным остатком, который определяется содержанием в желудочном соке органических кислот и кислых солей фосфорной кислоты. Таким образом, все кислореагирующие вещества определяют в одной порции.

Пример расчета. Уровень I в бюретке — 4, уровень II — 5,4 (желто-оранжевая

окраска), уровень III — 6 (лимонно-желтый цвет), уровень IV — 6,8 (стойкий розовый), среднее арифметическое между III и IV уровнем — 6,4.

Для титрования было взято 5 мл желудочного сока; расчет ведется на 100 мл, поэтому количество щелочи, потраченной на разных этапах титрования, умножают на 20 (если титруют 10 мл сока, то умножают соответственно на 10).

1. Свободная HCl: $5,4 - 4 = 1,4 \times 20 = 28$.
2. Общая кислотность: $6,8 - 4 = 2,8 \times 20 = 56$.
3. Сумма свободной и связанной HCl: $6,4 - 4 = 2,4 \times 20 = 48$.
4. Связанная HCl: $48 - 28 = 20$.
5. Кислотный остаток: $56 - 48 = 8$.

Унифицированное определение кислотности методом Тепффера (1974). Реактивы. 1. 1% спиртовой раствор фенолфталеина. Интервал перехода окраски при pH 8,2—10,0. 2. 0,5% спиртовой раствор 4-диметиламиноазобензола. Интервал перехода окраски при pH 2,9—4,0. 3. 1% водный раствор ализаринсульфоновокислого натра. Интервал перехода окраски при pH 4,3—6,3. 4. 0,1 н. раствор едкого натра.

Ход исследования В 2 стакана отмеривают по 5 мл профильтрованного желудочного сока. В первую порцию вносят по 2 капли диметиламиноазобензола и фенолфталеина и определяют концентрацию свободной HCl и общую кислотность. Во вторую порцию желудочного сока прибавляют каплю ализаринсульфоновокислого натра и титруют до перехода желтой окраски в слабо-фиолетовую. В зоне перехода этого индикатора нейтрализуются кислореагирующие вещества, кроме связанной HCl, которую находят по разности между объемом щелочи, пошедшей на нейтрализацию всех кислых валентностей желудочного сока (титрование с фенолфталеином), и объемом, пошедшим на титрование с ализаринсульфоновокислым натром. Все полученные величины умножают на 20 для пересчета на 100 мл желудочного сока.

Метод определения кислотности в одной порции желудочного сока с тремя индикаторами. Реактивы. 1. 0,5% спиртовой раствор диметиламиноазобензола. 2. 1% спиртовой раствор фенолфталеина. 3. 0,5 г метилового красного; 0,5 г майгрюнвальда; 100 мл 50% спирта. 4. 0,1 н. раствор едкого натра.

Ход исследования К 5 мл профильтрованного желудочного сока добавляют по капле реактивов 1 и 2, титруют едким натром до желто-оранжевой окраски (цвет семги), затем прибавляют каплю реактива 3, при этом окраска изменяется на розово-фиолетовую, титруют едким натром до появления зеленого цвета, а затем до стойкой розовой окраски.

Общую кислотность и свободную HCl рассчитывают так же, как в описанных выше методах, а концентрации связанной HCl соответствует количество щелочи, пошедшей на титрование за время изменения зеленой окраски до стойкой розовой.

Микрохимический способ определения кислотности. Оборудование; микробюретка. Реактивы те же, что и для метода Михаэлиса.

Ход исследования. В стакан для титрования помещают 1 мл профильтрованного сока и 5 мл дистиллированной воды. Титруя из микробюретки, определяют концентрацию свободной HCl и общую кислотность по методу Михаэлиса.

Расчет. 1. Содержание свободной HCl равно количеству щелочи, пошедшей на титрование до желто-оранжевой окраски (цвет семги) диметиламиноазобензола, умноженному на 100.

2. Общей кислотности соответствует количество щелочи, пошедшей на все титрование, уменьшенное на 0,05 (индикаторная поправка) и умноженное на 100. При низкой кислотности индикаторная поправка должна быть равна 0,03 мл.

Примечание. Метод применяют в тех случаях, когда объем полученного желудочного сока небольшой.

Способы выражения кислотности. Традиционным способом выражения кислотности желудочного сока являются титрационные единицы (ТЕ) — объем 0,1 н. едкого натра, необходимый для нейтрализации кислых валентностей в 100 мл желудочного сока. Последние годы концентрацию HCl в желудочном соке более принято выражать в миллимолях на 1 л желудочного секрета. Известно, что 1 мл 0,1 н. раствора едкого натра эквивалентен 1 мл 0,1 н. раствора HCl (1 ТЕ), или 0,1 ммоль HCl, отсюда концентрация HCl в 100 мл сока, выраженная в миллимолях HCl, в 10 раз меньше, чем в титрационных единицах.

Пример. Если концентрация HCl 40 ТЕ, то это соответствует концентрации 4 ммоль в 100 мл сока, или 40 ммоль в 1 л сока. Таким образом, числовое значение концентрации HCl, выраженное в титрационных единицах, совпадает с числовым значением концентрации HCl, выраженным в миллимолях на 1 л ($40 \text{ ТЕ} = 40 \text{ ммоль/л HCl}$).

Нормальные величины. Общепринятое представление о нормальной концентрации HCl в желудочном соке является весьма относительным, однако Ю. И. Фншзон-Рысс в своей монографии приводит наиболее характерные величины концентрации кислоты в зависимости от фазы секреторного периода и метода стимуляции желудочной секреции.

Натощак: общая кислотность — до 40 ТЕ (40 ммоль/л), свободная HCl — до 20 ТЕ (20 ммоль/л).

В условиях базальной секреции: общая кислотность от 40 до 60 ТЕ (40—60 ммоль/л); свободная HCl от 20 до 40 ТЕ (20—40 ммоль/л); при исследовании по методу Н. И. Лепорского после энтеральной стимуляции капустым отваром концентрация HCl остается такой же, как и в условиях базальной секреции. При применении в качестве стимуляции субмаксимальных доз гистамина концентрация общей HCl от 80 до 100 ТЕ (80—100 ммоль/л), свободной HCl —

от 65 до 85 ТЕ (65—85 ммоль/л), а при использовании в качестве стимулятора максимальной дозы гистамина общая кислотность колеблется от 10,0 до 12,0 ТЕ (100—120 ммоль/л), а свободная НСІ — от 9,0 до 10,0 ТЕ (90—110 ммоль/л).

Определение дебита НСІ. Дебит НСІ отражает валовое количество выделенной желудком НСІ за определенный промежуток времени. Наиболее часто вычисляют за час исследования в различные фазы желудочной секреции. Различают дебит: 1) свободной НСІ; 2) связанной НСІ; 3) НСІ (кислотная продукция). Последний показатель определяют, исходя из цифр общей кислотности. При этом более правильно титровать желудочный сок под контролем рН-метра до рН 7,0. Дебит-час определяют только при условии получения всего желудочного содержимого за час.

Величину кислотовыделения вычисляют по двум формулам, которые несколько отличаются друг от друга в зависимости от выражения дебита (в миллиграммах или миллиэквивалентах, т. е. миллимолях) НСІ.

Для расчета дебита НСІ в миллиграммах применяют следующую формулу:

$$D = v \cdot E - 0,0365 + v_2 \cdot 0,0365 + \dots,$$

где u — дебит НСІ (мг); v — объем порции желудочного сока (мл); E — концентрация НСІ (в титрационных единицах); $0,0365$ — количество миллиграммов НСІ в 1 мл сока при концентрации ее, равной 1 ТЕ. Число слагаемых определяется числом порций за время исследования.

Для расчета дебита НСІ в миллимолях (для НСІ эти величины совпадают) применяют другую формулу:

$$D = \frac{v_1 \cdot E_1}{1000} + \frac{v_2 \cdot E_2}{1000} + \dots,$$

где D — дебит НСІ (ммоль), а остальные обозначения те же, что и в предыдущей формуле, так как числовые значения концентрации НСІ, выраженные в титрационных единицах на 100 мл и в миллимолях на 1 л желудочного сока, совпадают.

Для облегчения подсчета дебит-часа НСІ можно пользоваться номограммой. Линейкой соединяют нанесенные на противоположных ветвях кривой цифры, соответствующие объему и кислотности данной порции желудочного сока. В месте пересечения линейки с вертикальной линией находят значение дебита, выраженное в миллиграммах НСІ или в миллимолях НСІ (для НСІ числовые значения миллиэквивалентов и миллимолей совпадают).

В нашей стране принято определять дебит свободной НСІ. За рубежом ориентируются на дебит, вычисляемый на основании величин общей кислотности. Часовой дебит НСІ базальной секреции обозначают как ВАО — basal acid output (базальная кислотная продукция). Аналогичный показатель при максимальной гистаминовой стимуляции получил название МАО — maximal acid output. Есть еще показатель продукции, получивший название РАО — peak

acid output (пиковая кислотная продукция), который вычисляют при проведении максимального гистаминового теста, беря две смежные порции желудочного сока, полученные за 30 мин и отличающиеся наибольшей концентрацией НСІ. Показатели 15-минутной продукции складывают, а полученный результат удваивают (для пересчета получасового дебита НСІ на часовой).

Вычислять ВАО, МАО и РАО целесообразнее всего на основании данных о концентрации НСІ, полученных при титровании с использованием рН-метра.

Нормальные величины. Количество НСІ натошак не более 2 ммоль, свободной НСІ не более 1 ммоль. В условиях базальной секреции дебит-час НСІ колеблется от 1,5 до 5,5 ммоль, свободной НСІ — от 1 до 4 ммоль. В период стимуляции желудочной секреции по методу Н. И. Лепорского дебит-час НСІ колеблется от 1,5 до 6 ммоль, свободной НСІ — от 1 до 4,5 ммоль. При субмаксимальной стимуляции гистамином дебит-час НСІ — от 8 до 14 ммоль, свободной НСІ — от 6,5 до 12 ммоль.

В ответ на максимальную стимуляцию гистамином часовая кислотная продукция бывает от 18 до 26 ммоль, а дебит-час свободной НСІ — от 16 до 24 ммоль.

Определение дефицита НСІ. Принцип. Определение дефицита НСІ основывается на титровании анацидного желудочного сока 0,1 н. раствором этой кислоты до появления ее в свободном виде.

Реактивы. 1. 1 % спиртовой раствор диметиламиноазобензола. 2. 0,1 н. раствор НСІ.

Ход исследования. К 5 мл (или 10 мл) желудочного сока добавляют каплю раствора диметиламиноазобензола и титруют раствором НСІ до появления розовой окраски. Полученный результат умножают на 20 или 10 в зависимости от объема титруемого сока. Количество НСІ, затраченное на титрование 100 мл сока, будет соответствовать ее дефициту.

Клиническое значение. Максимально возможный дефицит НСІ составляет 40 ТЕ. Такой дефицит указывает на полное прекращение секреции НСІ (абсолютная, действительная или целлюлярная ахлоргидрия). Если дефицит выражается меньшей величиной, то НСІ выделяется, но из-за нейтрализации не может быть обнаружена (относительная, мнимая или химическая ахлоргидрия).

Определение молочной кислоты. Принцип. Методы основаны на изменении окраски раствора за счет образования лактата железа.

Проба с карболовой кислотой. Реактивы. 1. 1 % раствор карболовой кислоты. 2. 10 % раствор хлорного железа.

Ход исследования. К 2—3 мл раствора карболовой кислоты приливают каплю хлорного железа; раствор приобретает фиолетовое окрашивание. Затем по каплям приливают предварительно профильтрованный желудочный сок, который опускается на дно пробирки, где появляется желтоватое окрашивание.

Примечания. 1. Присутствие свободной НСІ снижает чувствительность пробы, поэто-

му при ее наличии следует проводить исследование с эфирной вытяжкой из желудочного сока, которую готовят следующим образом: 5—10 мл профильтрованного желудочного сока тщательно взбалтывают с 3—5 мл эфира. Эфирный слой отсасывают пипеткой в химический стаканчик, затем выпаривают на водяной бане и остаток растворяют в 2—3 мл воды, с этим раствором проводят описанную выше пробу. 2. Пробу можно проводить без карболовой кислоты, внося только раствор хлорного железа. В этом случае слабо-желтое окрашивание при наличии молочной кислоты становится более интенсивным.

Клиническое значение. Молочная кислота в желудочном содержимом обычно отсутствует, а начинается образовываться в результате усиленной жизнедеятельности палочек молочнокислого брожения при отсутствии или очень низкой концентрации свободной HCl. Существует мнение, что она может быть продуктом метаболизма раковых клеток.

Исследование ферментообразующей функции унифицированным методом Туголукова (1974). Принцип. Определение протеолитической активности желудочного сока по количеству расщепленного белка.

Реактивы. 1. 2% раствор сухой плазмы на 0,1 н. растворе HCl. 2. 10% раствор трихлоруксусной кислоты.

Оборудование. 1. Центрифужные пробирки (точно градуированные). 2. Пробирки химические. 3. Пипетки вместимостью 1; 2 и 10 мл. 4. Микропипетки вместимостью 0,1 мл. 5. Центрифуга. 6. Термостат.

Ход исследования. Желудочный сок, профильтрованный через бумажный фильтр, разводят в 100 раз (9,9 мл воды н 0,1 мл желудочного сока, отмеренного микропипеткой). В одну градуированную центрифужную пробирку помещают 1 мл разведенного сока (опыт), в другую — 1 мл предельно прокипяченного разведенного сока (контроль). В обе пробирки добавляют по 2 мл 2% раствора сухой плазмы и ставят их в термостат при 37 °С на 20 ч. По прошествии этого времени в каждую пробирку приливают по 2 мл 10% трихлоруксусной кислоты, перемешивают стеклянной палочкой до однородной суспензии и центрифугируют 10 мин при 1500 об/мин.

Расчет. По разнице величин осадка в контроле и опыте определяют степень переваривания белка с последующим пересчетом на количество пепсина. Показатель переваривания субстрата вычисляют по формуле:

$$M = (A - B) \cdot \frac{40}{A}$$

где M — показатель переваривания; A — объем осадка в контроле; B — объем осадка в опыте; 40 — постоянная величина, установленная экспериментальным путем.

Пересчет показателя переваривания на содержание фермента производят с помощью табл. 23. В связи с тем что для исследования берут 0,1 мл разведенного в 100 раз желудочного

Таблица 23. Таблица Туголукова для пересчета показателей переваривания белкового субстрата (2% раствор сухой плазмы) на содержание пепсина в 0,01 мл желудочного сока или уропепсина в 1 мл мочи

Показатель переваривания	Содержание пепсина или уропепсина - (мг)	Показатель переваривания	Содержание пепсина или уропепсина (мг)
1	0,005	20	0,08
2	0,008	21	0,09
3	0,010	22	0,10
4	0,015	23	0,12
5	0,017	24	0,16
6	0,020	25	0,20
7	0,025	26	0,27
8	0,027	27	0,34
9	0,030	28	0,42
10	0,035	29	0,50
11	0,037	30	0,59
12	0,040	31	0,68
13	0,045	32	0,77
14	0,047	33	0,86
15	0,050	34	0,96
16	0,055	35	1,06
17	0,062	36	1,20
18	0,067	37	1,50
19	0,075	—	—

сока, полученный результат умножают на 10 000 (для выражения концентрации фермента в миллиграмм-процентах) или на 100 (для выражения концентрации фермента в граммах на 1 л).

Нормальные величины. Поданным В. Н. Туголукова, концентрация пепсина в желудочном соке натощак составляет 0—2100 мг % (0—21 г/л), а после стимуляции энтеральным раздражителем (например, отваром капусты) — 2000—4000 мг % (20—40 г/л). Фармакопейный препарат пепсина, которым пользовался В. Н. Туголуков для составления таблицы, содержит 1% кристаллического пепсина. Следовательно, истинная концентрация пепсина натощак 0—21 мг % (0—0,21 г/л), а после энтеральной стимуляции — 20—40 мг % (0,2—0,4 г/л). Концентрация пепсина, определенная методом Туголукова, при субмаксимальной стимуляции гистамина составляет 50—65 мг % (0,5—0,65 г/л), а при максимальной — 50—75 мг % (0,5—0,75 г/л).

Унифицированный метод определения протеолитической активности по Ансио и Мирскому и модификации М. П. Черникова (1974). Принцип. Метод основан на способности пепсина расщеплять белковую молекулу гемоглобина с освобождением тирозина и триптофана, не осаждаемых трихлоруксусной кислотой.

Реактивы. 1. 0,1 М глициновый буфер рН 1,5: глицина 7,505 г и хлорида натрия 6,85 г растворяют в воде, доводя объем до 1 л; к 73 мл приготовленного раствора добавляют 67 мл 0,1 М раствора HCl. Тщательно перемешивают, вели-

чину рН определяют потенциометрически. Хранят в холодильнике. 2. 1 % раствор гемоглобина в 0,1 М глициновом буфере рН 1,5. 3. Калибровочные растворы пепсина: для стандартного раствора 7,5 мг лиофилизированного кристаллического пепсина растворяют в 1 л воды. Полученная концентрация пепсина в растворе равна 7,5 мкг/мл. Из этого раствора готовят разведения в 2; 4 и 8 раз и получают растворы с содержанием пепсина 3,75; 1,87 и 0,94 мкг/мл. 4. 10 % раствор трихлоруксусной кислоты. 5. 0,1 н. раствор НСІ.

Специальное оборудование. 1. Секундомер. 2. Спектрофотометр.

Ход исследования. Опытная проба: в центрифужную пробирку наливают 1 мл раствора гемоглобина и 1 мл разведенного в 10 или 100 раз желудочного сока. Инкубируют при 37 °С 10 мин (точно по секундомеру). Затем добавляют 3 мл 10 % раствора трихлоруксусной кислоты и оставляют при комнатной температуре на 1 ч. Центрифугируют 10 мин при 1500 об/мин. Измеряют оптическую плотность надосадочной жидкости при длине волны 280 им против дистиллированной воды.

Холодную пробу проводят так же, как опытную, но без добавления трихлоруксусной кислоты.

Расчет. Концентрацию пепсина в исследуемом соке определяют по калибровочному графику; активность пепсина выражают в микрограммах на 1 мл желудочного содержимого.

Построение калибровочного графика. Пробы с калибровочными растворами пепсина ставят так же, как опытные, беря вместо желудочного содержимого 1 мл соответствующего раствора пепсина.

Из экстинкции калибровочных проб вычитают экстинкцию холодной пробы. Строят калибровочную кривую, откладывая на оси ординат полученную разницу экстинкции, а на оси абсцисс— содержание пепсина (мкг/мл). Для вычисления активности пепсина в желудочном содержимом значения, найденные по калибровочному графику, умножают на степень разведения желудочного сока.

Нормальные величины. Активность пепсина должна быть выведена на донах в каждой лаборатории, так как она зависит от активности кристаллического пепсина, используемого для построения калибровочного графика.

2,3.3. Беззондовые методы

Беззондовые методы дают ориентировочное представление о желудочной секреции и применяются при наличии противопоказаний к фракционному зондированию.

Десмоидная проба Сали. Принцип. Выявление окраски мочи метиленовым синим в результате попадания его в желудок из десмоидного мешочка при растворении кетгута под действием НСІ и пепсина.

Реактивы. 1. Метиленовый синий. 2. Тонкая резинка. 3. Кетгут № 5.

Ход исследования. В мешочек из тонкой резины помещают 0,15 г метиленового синего, перевязывают кетгут. Концы нити коротко обрезают. Больной проглатывает мешочек непосредственно перед завтраком и собирает мочу через 3; 5 и 20 ч. Определяют время появления и интенсивность окраски мочи метиленовым синим в голубой, синий или зеленый цвет.

Нормальные показатели. Первая порция мочи не окрашена, вторая окрашена в бледно-зеленый, третья — интенсивно-зеленый или синий цвет.

Примечания. 1. При отсутствии окраски мочу необходимо прокипятить, так как метиленовый синий иногда может выделяться в виде бесцветных соединений, из которых освобождается при нагревании. 2. Для облегчения расфасовки метиленового синего можно пользоваться прописью шариков-пилюль: Methyleni caerulei 0,15 г; Butyri сасао 0,3 г. Шарик хранят в холодильнике. 3. Вместо метиленового синего в качестве индикатора можно использовать 0,4 г йодида калия. Последний после переваривания кетгута появляется в слюне (в норме через 35—45 мин) и может быть обнаружен в реакции с раствором крахмала.

Клиническое значение. При отсутствии в желудочном соке пепсина или НСІ, способной активировать этот фермент, кетгут не переваривается и изменения окраски мочи или появления йодида калия в слюне не происходит. Десмоидная проба является простым способом ориентировочной диагностики ахлоргидрии; особенно удобна она при массовых обследованиях населения.

В клинической практике при массовых обследованиях для определения количества НСІ широкое распространение получили препараты гастротест («Cilak», Швейцария) и аидотест («Chinoin», Венгрия). В состав гастротеста входит красящее вещество 3-фенил-азо-2,6-диаминопиридин, а в аидотесте красящим веществом является 2,4-диамино-4-этоксиазобензол. О количестве кислоты судят по окраске мочи. Колориметрию проводят визуально при помощи цветной шкалы. Подробно правила работы с препаратами изложены в приложенных к ним инструкциях.

В качестве беззондового метода можно использовать определение уропепсина. Уропепсин определяют методом Туголукова; исследование осуществляют в той же последовательности, как и при изучении протеолитической активности желудочного сока, но вместо последнего берут 1 мл мочи. Результат выражают в протеолитической активности часовой или суточной мочи.

Нормальные величины. За сутки 38—96 мг, «часовое напряжение» натощак — 2—3 мг/ч.

Литература. Фишзон-Рысс Ю. И. Современные методы исследования «желудочной секреции». — Л., 1972; Anson M. I. — J. Physiol., 1939, vol. 22, p. 79.

2.4. МОКРОТА

Мокрота — выделяемый при кашле патологически измененный трахеобронхиальный секрет; в носовой части глотки и в полости рта к нему обычно примешивается слюна и секрет слизистой оболочки носа.

Сборание мокроты. Свежевыделенную мокроту собирают в чистую сухую широкогорлую склянку. Больным следует указать на то, что исследованию подлежит только мокрота, отделяющаяся при кашле, а не при отхаркивании. Чтобы предотвратить примешивание к мокроте содержимого полости рта, перед выделением мокроты больной должен тщательно прополоскать рот кипяченой водой. Желательно как можно скорее исследовать собранную мокроту; если же такой возможности нет, хранить ее следует в холодильнике или прохладном месте. Наиболее достоверное представление о состоянии дыхательных путей можно получить, исследуя содержимое трахеобронхиального дерева, полученное при бронхоскопии.

Для обеззараживания мокроты и посуды, в которой она находилась, используют 5 % раствор хлорамина. Обеззараживаемый материал выдерживают в растворе не менее 4 ч.

2.4.1. Физические свойства (определение характера и общих свойств мокроты)

Для исследования мокроту помещают в чашку Петри и рассматривают на светлом и темном фоне.

Количество. Объем отделяющейся за сутки мокроты колеблется в широких пределах: он может быть небольшим (1—2 мл), например при остром бронхите, бронхиальной астме, и весьма значительным (более 200—300 мл), что наиболее характерно для заболеваний, сопровождающихся образованием полости в органах дыхания. Для определения количества выделенной за сутки мокроты ее собирают и выливают потом в градуированную стеклянную посуду.

Цвет. Окраска мокроты определяется ее составом, она может быть бесцветной или иметь желтоватый оттенок, особенно при примеси гноя; зеленоватый цвет свидетельствует о застое гнойной мокроты и объясняется присутствием фермента вердопероксидазы, содержащейся в нейтрофильных лейкоцитах и освобождающейся при их распаде с последующим превращением железопорфириновой группы фермента. Желтый цвет мокроты может иметь из-за присутствия большого количества эозинофилов. Ржавый цвет мокроты чаще бывает при крупозной пневмонии в связи с появлением гематина, освобождающегося при распаде эритроцитов, проникающих в просвет альвеол в процессе диапедеза. Черный цвет мокроты зависит от примеси к ней частиц угольной пыли. Присутствие билирубина может окрашивать мокроту в желтый или зеленоватый цвет. Некоторые лекарственные веще-

ства или случайные примеси могут также влиять на окраску мокроты.

Запах. Обычно свежевыделенная мокрота запаха не имеет. Гнилостный запах она приобретает при абсцессе, гангрене легкого, а также при гнилостном бронхите в результате присоединения гнилостной инфекции; появлению запаха способствует нарушение оттока мокроты.

Консистенция. Различают жидкую, густую и вязкую мокроту. Реологические свойства мокроты зависят от ее состава, а также эластичности и вязкости слизи.

Деление на слои. При обильном отделении не очень густой мокроты она при стоянии расслаивается. При гнилостном бронхите, гангрене легких, бронхоэктазах мокрота обычно разделяется на три слоя: верхний — пенистый, состоящий из слизисто-гнойных комков со значительным содержанием пузырьков воздуха; средний — мутноватая желтовато-зеленая жидкость и нижний — непрозрачная масса желтоватого цвета.

Разделение мокроты на два слоя часто наблюдается при абсцессе легких: верхний слой состоит из серозной жидкости, а нижний — из непрозрачной зеленоватой-желтой гнойной массы, содержащей клеточные элементы. Все описанное позволяет сделать заключение о характере мокроты.

Характер. Состав мокроты неоднороден; ее характер зависит от патологического процесса. При описании характера мокроты преобладающий компонент выносят на второе место. Различают следующие виды мокроты:

1) слизистая мокрота — бесцветная, тягучая, вязкая (особенно вязкой — стекловидной — она бывает при бронхиальной астме);

2) гнойная мокрота — без примеси слизи встречается очень редко (например, при вскрытии эмпиемы плевры в полости бронха), так как при прохождении через дыхательные пути к мокроте обычно примешивается слизь;

3) слизисто-гнойная и гнойно-слизистая мокрота встречается наиболее часто; она образуется при многих заболеваниях бронхов и легких и представляет мутную вязкую массу, в которой тесно смешаны слизь и гной;

4) кровянистая мокрота, содержащая прожилки или сгустки крови; иногда примесь крови бывает измененной и ее присутствие можно заподозрить лишь по цвету мокроты (например, ржавая мокрота при крупозной пневмонии);

5) серозная мокрота — прозрачная пенящаяся, жидкая, иногда слегка розоватого цвета; можно наблюдать при отеке легкого.

Клиническое значение. Результаты макроскопического исследования мокроты с заключением о ее характере позволяют сделать вывод о характере патологического процесса.

Определение реакции. Исследования проводят с помощью индикаторной бумаги для определения pH в интервале от 5,0 до 9,0 или на pH-метре.

Клиническое значение. Величина рН во многом определяется характером и интенсивностью воспаления бронхов. Реакция мокроты, как правило, слабощелочная, кислой она становится при разложении мокроты или при примешивании к ней желудочного содержимого. Важно определение рН мокроты для решения вопроса об источнике кровотечения.

2.4.2. Химическое исследование

Определение белка. Для исследования пригодна мокрота, собранная не ранее 12 ч до момента исследования; при сборе мокроты надо следить, чтобы к ней не примешивалось содержимое полости рта и носоглотки.

Принцип тот же, что и при исследовании белка в моче.

Реактивы. 1. Те же, что для определения белка в моче любым количественным методом. 2. 3% раствор уксусной кислоты.

Ход исследования. В широкую пробирку помещают 10 мл мокроты, приливают 20 мл 3% раствора уксусной кислоты и несколько раз сильно встряхивают. Содержимое фильтруют через бумажный фильтр. Фильтрат проверяют на полноту осаждения муцина, добавляя к небольшому его количеству 2—3 капли уксусной кислоты. Если при этом появляется муть, то осаждение муцина повторяют. После полного удаления муцина проводят одну из качественных реакций на белок, а при наличии белка определяют его количество, учитывая разведение мокроты (см. определение белка в моче).

Клиническое значение. Следы белка содержатся во всякой мокроте. Наибольшие концентрации белка (более 3%) можно наблюдать при отеке легкого, когда источником белка является плазма крови. Значительные концентрации белка можно обнаружить при крупозной пневмонии и туберкулезе. На основании исследования количества белка в мокроте пытались дифференцировать бронхит и туберкулез легких, когда не находили микобактерий. Однако наблюдения носили разноречивый характер, и в настоящее время считают, что определение белка в мокроте не может иметь большого диагностического значения.

Определение билирубина (метод Обермайера — Поппера). Принцип. Образование биливердина.

Реактив. Смесь следующего состава: воды 625 мл, 95% этилового спирта 125 мл, натрия хлорида 75 г, калия йодида 12 г, 10% йодной настойки 3,5 мл.

Ход исследования. К 10—15 мл мокроты прибавляют равный объем этилового спирта, смешивают, фильтруют, на фильтрат наслаивают реактив, при наличии билирубина на границе появляется зеленое или синеватое кольцо.

См. с. 48—50.

Клиническое значение. Билирубин в мокроте может появиться при прорыве в легкое абсцесса печени, но в незначительных количествах билирубин находят и при пневмонии.

2.4.3. Микроскопия

Посуда и оборудование. 1. Чашки Петри. 2. Покровные и предметные стекла. 3. Препаровальные иглы или металлические палочки с плоскими концами. 4. Микроскоп.

Для микроскопического исследования мокроты прежде всего готовят неокрашенные (нативные) препараты мокроты. Полноценность исследования зависит от правильного приготовления и количества просмотренных препаратов. Материал для исследования выбирают из разных мест и переносят металлической иглой на предметное стекло, затем покрывают покровным стеклом так, чтобы мокрота не выступала за его края.

Препараты должны быть тонкими, элементы в них должны располагаться однослойно. Микроскопию проводят сначала при малом увеличении микроскопа (объектив 8X, окуляр 10X), просмотр с малым увеличением дает представление о качестве выбранного материала, позволяет обнаружить скопление клеток, кристаллических образований, найти эластические волокна, спирали Куршмана, элементы новообразования. Дальнейшее исследование производится при большом увеличении микроскопа (объектив 40X, окуляр 10X).

При этом в мокроте можно обнаружить в большем или меньшем количестве лейкоциты и среди них по более темной окраске и наличию в цитоплазме обильной, четкой, преломляющей свет зернистости различить эозинофилы, наличие которых характерно для бронхиальной астмы и других аллергических состояний. Эритроциты в мокроте имеют вид желтоватых дисков. Единичные эритроциты встречаются в каждом виде мокроты, большое же их количество характерно для кровянистой мокроты и встречается при инфаркте легкого, легочных кровотечениях, застое в малом круге кровообращения.

В мокроте всегда можно обнаружить эпителий. Плоский эпителий попадает в мокроту из полости рта и носоглотки. Большое число клеток говорит о недостаточно хорошем туалете полости рта перед взятием мокроты для исследования.

Обнаружение в мокроте цилиндрического мерцательного эпителия, выстилающего слизистую оболочку гортани, трахеи и бронхов, свидетельствует о поражении соответствующих отделов. Клетки имеют удлиненную форму, расширение с одного конца, где расположено округлое ядро, и мерцательные реснички. Располагаются эти клетки группами, и в свежее выделенной мокроте можно наблюдать активное движение ресничек. При воспалительных процессах (бронхиты, пневмонии, профессиональные заболевания легких) в мокроте встречаются альвеолярные макрофаги — клетки гистиоцитарной системы. Это крупные клетки округлой формы с нали-

чием в цитоплазме включений. Если альвеолярные макрофаги содержат гемосидерин, то их называют сидерофагами или образно «клетками сердечных пороков», так как они могут появиться при застое крови в легких, при декомпенсированных пороках сердца. С достоверностью выявить эти клетки можно реакцией образования берлинского лазури.

Реакция образования берлинского лазури. Реактивы. 1. 2—5 % раствор HCl. 2. 5 % раствор желтой кровяной соли.

Ход реакции. Кусочек мокроты помещают на предметное стекло, прибавляют 1—2 капли реактива № 1 и 1—2 капли реактива № 2. Перемешивают стеклянной палочкой и покрывают покровным стеклом. Излишек реактива отсасывают фильтровальной бумагой. При производстве этой реакции нельзя пользоваться металлическими палочками.

Гемосидерин, лежащий внутриклеточно, окрашивается в голубой или сине-зеленый цвет. Эти клетки обнаруживают в мокроте при застойных явлениях в легком, инфарктах легкого, кровоизлияниях.

Пылевые клетки называют макрофаги с фагоцитированными частицами пыли. При хронических воспалительных процессах альвеолярные макрофаги часто подвергаются дегенеративным изменениям. **Жирно перерожденные клетки** (или клетки с жировой дистрофией, липофаги, жировые шары) имеют разную величину, округлую форму и цитоплазма их заполнена каплями жира, которые при добавлении к препарату капли раствора Судана III окрашиваются в оранжевый цвет. Скопление таких клеток характеризует хронические заболевания (туберкулез, абсцедирующая пневмония, актиномикоз, эхинококк легкого и др.). Иногда в мокроте можно обнаружить *спирали Куршмана* — образования, состоящие из слизи и имеющие осевую часть — извитую, резко преломляющую свет нить и окружающую ее нежную слизистую мантию. Спирали Куршмана чаще всего встречаются при бронхиальной астме; в результате спазма бронхов слизистый секрет, который в них находится, уплотняется и при разрывании приступа кашлевыми толчками выталкивается, закручиваясь в спиралевидные образования. Спирали Куршмана можно встретить и при других патологических процессах (пневмония, абсцесс легкого, опухоль), сопровождающихся обструктивным компонентом.

Эластические волокна, встречающиеся в мокроте при деструктивных процессах в легких, являются элементами соединительной ткани. В нативном препарате эластические волокна имеют вид блестящих, двухконтурных, волокнистых образований с дихотомическим делением на концах, иногда рисунок их повторяет строение альвеол. При кавернозном туберкулезе в результате наложения на волокна капель жирных кислот и мыл они становятся более грубыми и имеют бугристые утолщения, за что получили название коралловидных. Находка эта весьма редкая.

Обыкновенные эластические волокна — грубые, пропитанные солями извести палочко-

видные образования. Обломки их напоминают вид пунктирной линии, состоящей из сероватых, преломляющих свет палочек. Обнаруживают в мокроте при распаде петрифицированного очага как результат туберкулезного процесса, абсцесса легкого, новообразования. Элементы распада петрифицированного очага носят название тетрады Эрлиха и включают: 1) обызвествленные эластические волокна; 2) обызвествленный казеозный детрит; 3) кристаллы холестерина, 4) микобактерии туберкулеза.

Для обнаружения эластических волокон мокроту нагревают до гомогенного состояния с равным объемом 10 % раствора KOH, затем центрифугируют, предварительно перемешав после добавления 2—3 капель 2 % спиртового раствора эозина. Из осадка делают препараты. При такой обработке разрушаются слизь и клеточные элементы, а эластические волокна окрашиваются эозином и имеют вид блестящих ровных двухконтурных нитей, но этот способ не имеет существенных преимуществ перед исследованием нативных препаратов. Посторонние волокна и нити тоже могут окраситься эозином и мешать распознаванию эластических волокон.

Окраска эластических волокон резорцин-фуксином Вейгерта. Принцип. Окраска специфическая для эластических волокон.

Реактивы. 1. Фуксин основной. 2. Резорцин. 3. Хлористое железо. 4. 96 % этиловый спирт. 5. 25 % HCl.

0,5 г основного фуксина и 1 г резорцина растворяют в 50 мл дистиллированной воды, нагревают до кипения и постепенно приливают раствор из 2 г хлористого железа в 10 мл воды. Смесь кипятят 5 мин, осторожно встряхивая, после охлаждения фильтруют. Фильтр с осадком переносят в колбу, заливают 70 мл 96 % этилового спирта и, осторожно нагревая, доводят до кипения, осадок краски при этом должен раствориться, после удаления фильтра к охлажденному раствору добавляют 1 мл 25 % HCl. Раствор красителя сразу готов к употреблению; хранить его можно в течение нескольких месяцев.

Ход исследования. Препараты мокроты фиксируют в 96 % этиловом спирте в течение 2 мин, затем, слив спирт, помещают их на 15 мин в бюкс с раствором красителя (резорцин-фуксин Вейгерта). После окраски препараты ополаскивают водой и выдерживают 2 мин в 96 % этиловом спирте. Высушенные препараты микроскопируют с малым увеличением. Эластические волокна окрашиваются в красновато-фиолетовый цвет, и в препаратах бывают видны не только древовидные, ветвящиеся волокна, но и их обрывки.

Из **кристаллических образований** в мокроте можно встретить кристаллы Шарко—Лейдена в виде вытянутых блестящих ромбов различной величины. Кристаллы Шарко—Лейдена образуются из белковых продуктов при распаде эозинофилов, поэтому в свежeweделенной мокроте их можно обнаружить не всегда, несмотря на наличие эозинофилов. Характерно нахождение этих кристаллов, так же как спиралей Куршмана и эозинофилов, для бронхиальной астмы.

Кристаллы гематоидина золотисто-желтого цвета, имеют форму ромбов, звезд, пучков и встречаются при кровоизлияниях в некротической ткани. Кристаллы холестерина имеют вид бесцветных прямоугольной формы табличек с выломанным углом. Образуются при разложении жира в замкнутой полости и встречаются при абсцессе, гангрене, туберкулезе и новообразованиях легкого.

В гнойной мокроте иногда встречаются *пробки Дитриха* (макроскопически это желтовато-серые образования величиной от булавочной головки до просяного зерна, микроскопически — детрит с бактериями, иглами жирных кислот и каплями нейтрального жира); эти образования характерны для застоя мокроты в полостях главным образом при абсцессе легкого, бронхоэктазах.

Элементы эхинококка в виде крючьев или обрывков хитиновой оболочки пузыря иногда с эозинофилами и кристаллами Шарко—Лейдена можно найти в гнойной части мокроты при вскрывшемся эхинококке легкого.

Друзы актиномицетов макроскопически имеют вид мелких желтоватых зёрнышек, содержащихся в гнойной части мокроты. Микроскопически это сплетение тонкого мицелия, концы которого заканчиваются колбообразными вздутиями. Характерно при этом присутствие в мокроте ксантомных (жирно перерожденных) клеток. Друзы актиномицетов находят в мокроте при актиномикозе легкого. Препарат, в котором обнаружены друзы, рекомендуется красить по Грану (см. ниже). При этом нити мицелия грамположительны, колбообразные вздутия — грамотрицательны.

Миелиновые образования, встречающиеся главным образом в слизистой или гнойно-слизистой мокроте, имеют различную форму (округлые, овальные, почкообразные) и величину. Миелин может лежать свободно, а может заполнять цитоплазму макрофагов. Миелин является конечным продуктом аутолиза клеток, состоит из фосфолипидов, Суданом III не окрашивается. Самостоятельного диагностического значения, по-видимому, он не имеет.

Обнаружение в мокроте клеток злокачественных опухолей при микроскопическом исследовании. Предварительно просматривают под микроскопом неокрашенные (нативные) препараты, которые делают тонкими, осторожно распределяя материал на предметном стекле препаративальными иглами. Препараты, в которых обнаруживают клетки с признаками атипии, красят по Романовскому, гематоксилин-эозином или каким-либо другим методом, позволяющим изучать клеточные структуры.

Признаки злокачественности клеток — полиморфизм их размеров, нарушение ядерно-цитоплазматического соотношения в сторону увеличения ядра, изменение формы ядра, наличие в нем множественных ядрышек неправильной формы, митоз клеток. Для подтверждения диагноза необходимо искать групповое расположение клеток с перечисленными признаками, что связано с необходимостью изучения боль-

шого числа препаратов. Проводить цитологическое исследование при подозрении на опухоль и давать заключение должен специалист-цитолог.

Цитологическая диагностика опухолей требует специальной подготовки, так как в мокроте больных с воспалительными процессами и доброкачественными новообразованиями в легких (пневмосклероз, бронхоэктатическая болезнь, пневмония, аденома) встречаются метастазированные клетки больших размеров с выраженными признаками атипии. В таких случаях следует обращать внимание на окружающий фон и отыскивать клетки и структуры, характерные для рака, или, наоборот, скопление макрофагов или моноцитарных элементов, имеющих морфологические признаки, сходные с трудно дифференцируемыми клетками.

Плоскоклеточный рак. Клетки плоскоклеточного рака с ороговением располагаются разрозненно или скоплениями в виде тканевых клочков и очень редко в виде лукович. Клетки очень полиморфны. Ядра крупные, плотные, гиперхромные, форма разнообразная, распределение хроматина неравномерное. В клетках, находящихся в состоянии некролиза, ядра разрушаются. Иногда даже в четко очерченной клетке видны лишь контуры бывшего ядра. Цитоплазма многих клеток плотная, блестящая. При плоскоклеточном раке с ороговением нередко отмечается раннее ороговение, и в таких случаях в молодых клетках с нежным ядром цитоплазма становится плотной, блестящей. Клетки плоскоклеточного рака без ороговения чаще располагаются скоплениями, округлые, круглые. Ядра занимают большую часть клетки, обычно в центре, нежный хроматин распределен равномерно. Цитоплазма скудная, неомогенная.

Железистый рак. Клетки в препарате представлены в виде железистых структур. Крупные или средних размеров клетки имеют округлую, овальную или призматическую форму, Ядра, занимающие большую часть клетки и расположенные эксцентрично, полиморфны. Хроматин ядер нежный, мелкоглыбчатый или мелкопетлистый, расположен равномерно. Встречаются дву- и трехядерные клетки, в ядрах можно наблюдать множественные, гипертрофированные ядрышки. Цитоплазма или обильна и вакуолизована, или расположена узким ободком вокруг ядра.

Аденоматоз. Клетки мелкие, кубической или призматической формы с ядрами округлой формы, занимающими большую часть клетки. Контур ядра четкие, ровные, нежный хроматин расположен равномерно. Цитоплазма или вытянута в одну сторону, или еле заметная, скудная.

Недифференцированный рак. При недифференцированном мелкоклеточном раке клетки опухоли располагаются плотными группами, следующими друг за другом по тяжу слизи, или отдельными скоплениями. Клетки округлые, небольших размеров. Ядра их крупные, плотные, гиперхромные, занимают почти всю клетку, ядрышек практически не содержат. Иногда встречаются и крупные клетки, расположенные разрозненно или в виде плотных структур, имею-

ших разнообразных формы (треугольную, полукруглую и др.).

При недифференцированном полиморфноклеточном раке клеточные элементы расположены чаще разрозненно. Встречаются как небольшие клетки с полиморфными ядрами, так и гигантские с ядром, занимающим почти всю клетку, нередко можно встретить многоядерные клетки. Хроматин ядра компактный, со смазанным рисунком, иногда просматриваются ядрышки. Цитоплазма либо обильная и вакуолизирована, либо тонким ободком окружает ядро.

2.4.4. Алгоритмический анализ мокроты

Метод Капрала. Принцип. Для оценки степени активности воспалительного процесса в легких, выраженности аллергического, и обструктивного компонентов в течение патологического процесса результатам микроскопического исследования дают количественную оценку, выраженную цифровыми показателями.

Оборудование то же, что и для обычного микроскопического исследования, а также специальный бланк (см. с. 96) состоящий из 3 отрезков (А, В и С), и клавишный счетчик клеток.

Ход исследования. I. Оценка активности воспалительного процесса. Измеряют суточное количество мокроты и результат вносят в графу бланка (отрезок А). Если за сутки выделяется менее столовой ложки (т. е. менее 15 мл), то это оценивают как «мало» и обводят в бланке цифру 1; если выделяется от 1 до 3 столовых ложек (15–45 мл), то это количество («среднее») оценивают цифрой 2; более 3 ложек (т. е. более 45 мл) оценивают как обильное выделение («много»), что соответствует цифре 3. Полученный результат выносят в клетку этого же ряда свободной колонки.

Характер мокроты оценивают следующим образом: слизистая (1), слизисто-гнойная (2), гнойная (3). Результат переносят в соответствующий ряд свободной колонки в отрезке В. В отрезке С фиксируют, результаты специальных дополнительных назначений и микроскопических находок.

Количество лейкоцитов определяют, производя подсчет в тонких нативных препаратах при равномерном распределении материала на предметном стекле. Клетки подсчитывают не менее чем в 20 полях зрения (окуляр 7 X, объектив 40 X).

Критерий оценки: до 10 лейкоцитов в поле зрения — мало (1), от 10 до 50 в поле зрения — среднее количество (2), более 50 — много (3). Результат фиксируется по принципу предыдущих.

Количество эритроцитов (микроровахарканье) как показатель активности воспалительного процесса оценивают по отношению к числу лейкоцитов (на 1000 лейкоцитов). Подсчет ведут в разных местах тонких препаратов; для облегчения можно использовать клавишный

счетчик, предназначенный для подсчета лейкоцитарной формулы. Критерии оценки: до 25 эритроцитов на 1000 лейкоцитов — мало (1), от 25 до 50 эритроцитов — среднее количество (2) и более 50 — много (3). Оценивают и фиксируют результат в том же порядке, что и в предыдущих показателях. После этого суммируют цифровые показатели четырех описанных выше компонентов (количество мокроты, ее характер, число лейкоцитов и число эритроцитов) и ставят итог против слова «всего».

Количество альвеолярных макрофагов оценивают при микроскопическом исследовании не менее 2 препаратов. Критерий оценки: единичные в препарате альвеолярные макрофаги — мало (1), единичные скопления из нескольких клеток в поле зрения — среднее количество (2), большие скопления альвеолярных макрофагов — много (3). В противоположность предыдущим показателям число альвеолярных макрофагов вычитают из суммы первых четырех показателей.

Итоговую величину переносят в графический показатель интенсивности воспалительного процесса. Максимальная активность воспаления выражается цифрой II. Уменьшение показателя в процессе терапии говорит об ее эффективности.

II. Степень выраженности аллергического компонента оценивают по количеству эозинофильных лейкоцитов и кристаллов Шарко—Лейдена. Критерий оценки: эозинофильные лейкоциты единичные в препарате — 0, единичные небольшие скопления в препарате — мало (1), небольшие скопления по всему препарату — среднее количество (2), если основной состав лейкоцитов представлен эозинофильными, — много (3); по такому же принципу производят количественную оценку числа кристаллов Шарко—Лейдена. Для окончательной оценки выраженности аллергического компонента цифры суммируют, и числовой показатель колеблется от 0 до 6.

III. Выявленность интенсивности обструктивного компонента оценивают по наличию и количеству спиралей Куршмана и капель липидов в альвеолярных макрофагах. Критерий оценки капель липидов: отсутствие липидов — 0; в цитоплазме макрофагов маленькие блестящие капли липидов — 1, цитоплазма макрофагов заполнена липидами — 2, блестящие капли липидов видны не только в клетках, но и в окружающем их детрите — 3. Критерий оценки числа спиралей Куршмана: спирали Куршмана не найдены — 0, единичные в нескольких (3–4) препаратах — 1, единичные в препарате — 2, почти в каждом поле несколько спиралей — 3. Показатель интенсивности обструктивного компонента может колебаться от 0 до 6.

Примечания. 1. Оценивать активность воспалительного процесса можно только по результатам исследования мокроты, проведенного не позднее 2–3 ч после ее взятия. 2. Наличие специальных бланков желательно, но не обязательно. 3. Если примесь крови в мокроте обнаруживают при микроскопическом исследовании, то это обяза-

Экспресс-исследование мокроты №
(алгоритмический анализ)

A
Заполняется
направляющим через копиру

Фамилия, имя, отчество _____

Лечебное учреждение, отделение _____

Пульмонологический диагноз _____

По назначению врача _____

	мало	среднее количество	много	Число
Количество мокроты в сутки	1	2	3	
Характер мокроты	слизистая 1	слизисто-гнойная 2	гнойная 3	
Количество лейкоцитов в мокроте	мало 1	среднее количество 2	много 3	
Микроррвохарканье	мало 1	среднее количество 2	много 3	

Всего:

B

	мало	среднее количество	много	
Количество альвеолярных макрофагов	1	2	3	—

Сумма:

1
Степень остроты воспалительного процесса



	Липиды в альвеолярных макрофагах	Эозинофильные лейкоциты	Спиральи Нуршмана	Кристаллы Шарко-Лейдена	Интенсивность признаков
2 Признаки аллергического компонента		0;1;2;3		0;1;2;3	
3 Признаки обструктивного компонента	0;1;2;3		0;1;2;3		

C
Дополнительные
назначения и
микроскопические находки

Дата 19 .. г.

Лаборант:

тельно следует отметить, так как в этих случаях судить об активности воспаления по числу эритроцитов нельзя.

2.4.5. Бактериоскопия

Этот этап исследования мокроты включает в себя микроскопию препаратов, окрашенных по Цилю—Нильсену, для выявления микобактерий туберкулеза и препаратов, окрашенных по Грану, для изучения микрофлоры мокроты. Иногда для выявления микобактерий туберкулеза прибегают к обогащению методом флотации. Препараты мокроты для бактериоскопического исследования, приготовленные на предметном стекле, высушивают, фиксируют над пламенем горелки и затем окрашивают.

Окраска по Цилю—Нильсену. Реактивы. 1. Карболовый фуксин: 1 г основного фуксина растворяют в 10 мл этилового спирта, раствор выливают в 100 мл 5 % раствора карболовой кислоты. 2. 3 % спиртовой раствор HCl: 3 мл HCl и 97 мл этилового спирта. 3. Водный 0,5 % раствор метиленового синего.

Ход окраски. На препарат кладут кусочек фильтровальной бумаги и наливают раствор карболового фуксина, затем препарат нагревают над пламенем горелки до появления паров, охлаждают и снова нагревают (3 раза). После остывания препарата сбрасывают фильтровальную бумагу и опускают его в солянокислый спирт для обесцвечивания. Обесцвечивают до полного удаления краски, промывают водой и докрашивают метиленовым синим 20—30 С. Снова промывают водой и высушивают на воздухе. Микроскопируют с иммерсионной системой.

Туберкулезные микобактерий окрашивают, в красный цвет, все остальные элементы мокроты и бактерии — в синий. Туберкулезные микобактерий имеют вид тонких, слегка изогнутых палочек различной длины с утолщениями на концах или посередине, располагаются группами и поодиночке.

При окраске по Цилю—Нильсену в красный цвет красятся также кислотоупорные сапрофиты. Дифференциальная диагностика туберкулезных микобактерий и кислотоупорных сапрофитов ведется бактериологическими методами исследования.

Примечание. При исследовании следует избегать: 1) приготовления толстых мазков мокроты; 2) фиксации плохо высушенных мазков; 3) , недостаточной фиксации; 4) обугливания препарата при длительной фиксации.

Если микобактерий выделяется мало, то в обычных мазках их не находят и прибегают к методу накопления.

Метод флотации (всплывание) по Поттенджеру. Ход исследования. Свежевыделенную мокроту (не более 10¹⁵ мл) помещают

в узкогорлую бутылку, приливают двойное количество 0,5% раствора едкого щелочи, смесь энергично встряхивают 10—15 мин. Затем добавляют 1 мл ксилола (можно бензина, толуола) и около 100 мл дистиллированной воды для разжижения мокроты и снова встряхивают 10—15 мин. Доливают дистиллированную воду в таком количестве, чтобы уровень жидкости поднялся до горлышка бутылки. Оставляют на 1—2 ч для отстаивания. Образовавшийся верхний беловатый слой снимают по каплям пипеткой и наносят на предметное стекло, предварительно подогретые до 60 °С (стекла для подогревания можно положить на металлический подносик и покрыть им водяную баню). Каждую последующую каплю наносят на предыдущую подсушенную. Препарат фиксируют и красят по Цилю—Нильсену.

Наиболее достоверные результаты в обнаружении микобактерий туберкулеза дают бактериологические методы исследования. Другие бактерии, встречающиеся в мокроте, например стрептококки, стафилококки, диплобациллы, палочки Фридендера и пр., могут быть распознаны только методом посева. Бактериоскопическое исследование препарата в этих случаях имеет только ориентировочное значение. Препараты красят метиленовым синим, фуксином или по Граму.

Окраска по Граму. Реактивы. 1. Карболовый раствор генцианового фиолетового: 1 г генцианового фиолетового растворяют в 10 мл 96% спирта, раствор выливают в 100 мл 1—2 % карболовой кислоты, взбалтывают, 2. Раствор Люголя: 1 г йода, 2 г йодида калия и 300 мл дистиллированной воды; йод и йодид калия растворяют сначала в 5—8 мл воды, а затем приливают остальную воду. 3. 96 % спирт или сырец. 4. 10% раствор карболового фуксина: 10 мл карболового фуксина и 90 мл дистиллированной воды.

Ход исследования. На фиксированный препарат кладут полоску фильтровальной бумаги и наливают раствор генцианового фиолетового. Красят 1'/2—2 мин. Бумажку сбрасывают и заливают препарат раствором Люголя на 2 мин, а потом прополаскивают препарат в спирту до сероватого цвета. Промывают водой и окрашивают 10% раствором карболового фуксина 10—15 с. После этого препарат опять промывают водой, высушивают и микроскопируют с иммерсионным объективом.

Литература. *Альтгаузен А. Я.* Клиническая лабораторная диагностика.— М., 1959; *Калинин В. С.* Методика лабораторных клинических исследований.— М., 1932; *Руководство по клинической лабораторной диагностике* /Под ред. М. А. Базарновой.— Киев, 1981; *Руководство по цитологической диагностике опухолей человека* / Под ред. А. С. Петровой, М. П. Птохова.— М., 1976; *Экспресс-исследование мокроты (алгоритмический анализ): Методические рекомендации для врачей и клинических лаборантов.*— Таллин, 1978.

2.5. ЭКССУДАТЫ И ТРАНССУДАТЫ

Выпотные жидкости, которые скапливаются в серозных полостях (плевральной, брюшной, полости перикарда), добывают для исследования пункцией полостей. Полученный при пункции материал собирают в чистую сухую посуду, добавляют цитрат натрия (из расчета 1 г на 1 л жидкости) или гепарин и тотчас все количество отправляют в лабораторию для исследования.

2.5.1. Виды пунктатов

Транссудаты появляются вследствие разнообразных причин: 1) изменений сосудистых стенок; 2) повышения эндокпиллярного давления; 3) гидремических изменений. Обычно это прозрачная жидкость слабощелочной реакции, светло-желтого цвета; изменения цвета и прозрачности можно наблюдать только в геморрагических и хилезных транссудатах. Относительная плотность жидкости колеблется от 1,002 до 1,015; транссудаты никогда не превышают этой верхней границы, всегда содержат белок в концентрации 5—25 г/л, лишь в некоторых случаях количество белка в асците может подниматься до 40 г/л.

Экссудаты образуются в результате воспалительных процессов, вызываемых разнообразными причинами. Это жидкость щелочной реакции, относительная плотность которой больше 1,018, а концентрация белка больше 25—30 г/л. Серозные экссудаты прозрачные, желтого цвета, с низкой концентрацией белка — около 30 г/л (наблюдают чаще при туберкулезе легких). Гнойные экссудаты мутные, желто-зеленого цвета, концентрация белка около 70—80 г/л, относительная плотность высокая. Геморрагические экссудаты коричнево-красноватого цвета (при злокачественных новообразованиях плевры). Хилезные и хилусоподобные экссудаты имеют вид молока и содержат большое количество жира. Помутнение таких экссудатов исчезает после добавления едкого натра и встряхивания с эфиром. Хилусоподобные жидкости образуются не вследствие примеси хилуса, а благодаря распаду жироперерожденных клеток и освобождению липидов (наблюдают при хронических воспалительных процессах оболочек серозных полостей). Холестериновые экссудаты встречаются крайне редко (осумкованные выпоты давностью несколько лет) и представляют собой густую жидкость с желтоватым или коричневатым оттенком. При микроскопии видны кристаллы холестерина.

2.5.2. Физико-химические свойства

Определение относительной плотности выпотных жидкостей см. 2.1.

Унифицированный метод определения белка по помутнению (1972). Принцип. Белок с сульфосалициловой кислотой дает помутнение, интенсивность которого пропорциональна концентрации белка.

Реактивы. 1. 3% раствор сульфосалициловой кислоты. 2. 0,9% раствор хлорида натрия. 3. Стандартный раствор альбумина — 1% раствор.

Лиофилизированный альбумин (из человеческой или бычьей сыворотки) в количестве 1 г растворяют в небольшом количестве 0,9% раствора хлорида натрия в мерной колбе вместимостью 100 мл и доводят объем до метки раствором хлорида натрия. Реактив нестойкий. Для стабилизации к стандартному раствору прибавляют 1 мл 5% раствора азида натрия (NaN₃). В этом случае раствор хранят в течение 2 мес; 1 мл раствора содержит 10 мг альбумина.

Специальное оборудование: фотоэлектроколориметр.

Ход исследования. Ввиду высокого содержания белка в транссудатах и экссудатах перед определением их следует разводить 0,9% раствором хлорида натрия. Степень разведения определяют ориентировочно по качественной пробе с сульфосалициловой кислотой. После проведения пробы готовят основное разведение выпотной жидкости (1:100), для чего к 0,1 мл выпотной жидкости приливают 9,9 мл 0,9% раствора хлорида натрия. Из основного разведения при высоком содержании белка можно делать еще большие. В конечном расчете учитывают разведение.

В пробирку вносят 1,25 мл разведенной в 100 раз (или более) жидкости и 3,75 мл (до 5 мл) 3% раствора сульфосалициловой кислоты, пробу перемешивают. Через 5 мин измеряют на фотоэлектроколориметре при длине волны 590—650 нм (светофильтр оранжевый или красный) в кювете с длиной оптического пути 0,5 см против контроля. Контроль: 1,25 мл разведенной жидкости и 3,75 мл 0,9% раствора хлорида натрия.

Расчет производят по калибровочному графику. Для построения калибровочного графика из стандартного раствора готовят разведения, как указано ниже, и обрабатывают их, как опыт. Концентрация белка в экссудатах — от 30 до 80 г/л, в транссудатах — 5—25 г/л.

№ пробирки	Объем стандартного раствора, мл	Объем 0,9% раствора хлорида натрия, мл	Концентрация белка, мг/л
1	0,05	9,95	50
2	0,1	9,9	100
3	0,2	9,8	200
4	0,5	9,5	500
5	1,0	9,0	1000

Примечание. Прямолинейная зависимость калибровочного графика сохраняется до концентрации белка 1000 мг/л.

Проба Ривальта. Проба используется для отличия экссудатов от трансудатов. Последние содержат серомуцин (вещество глобулиновой природы), дающий положительную пробу Ривальта.

Ход определения. В цилиндр вместимостью 100 мл с дистиллированной водой, подкисленной 2—3 каплями концентрированной уксусной кислоты, добавляют 1—2 капли исследуемой жидкости. Если образующееся беловатое облачко при добавлении жидкости опускается до дна цилиндра,— проба положительная. Если падающие капли растворяются, исследуемая жидкость не содержит серомуцина,— проба отрицательная.

Проба Ривальта не всегда позволяет отличить трансудат от экссудатов при исследовании смешанных жидкостей. Большое значение для их отличия имеет микроскопическое исследование.

2.5.3. Микроскопия

Микроскопическое исследование выпотных жидкостей производят после центрифугирования и приготовления препаратов из осадка, Экссудат, доставленный в лабораторию в свернутом виде, подвергают дефибринированию путем взбалтывания со стеклянными бусами. Исследование такой жидкости дает лишь ориентировочное представление о клеточном составе, так как часть клеток разрушается при дефибринировании и остается в сгустках фибрина.

Микроскопическое исследование жидкостей следует производить в нативных и окрашенных препаратах.

Нативные препараты. Исследование нативных препаратов (каплю осадка наносят на предметное стекло и накрывают покровным стеклом) дает возможность ориентировочно оценить количество клеточных элементов, преобладание различных элементов, наличие клеток опухолевой природы. Микроскопически в нативных препаратах можно обнаружить следующие элементы.

Эритроциты являются постоянными клетками жидкостей. В трансудатах и серозных экссудатах эритроциты находятся в небольшом количестве; их присутствие связано с травматической примесью крови (в момент прокола). Геморрагические экссудаты обычно содержат очень много эритроцитов, что значительно затрудняет исследование нативных препаратов. В этих случаях надо готовить тонкие препараты или добавлять каплю слабого, раствора уксусной кислоты (для гемолиза эритроцитов), но такой препарат в дальнейшем красить нельзя.

Лейкоциты содержатся в небольшом количестве (до 15—20 в поле зрения) в трансудатах и в большом количестве в жидкостях воспалительного происхождения (особенно много их в гнойных экссудатах). Соотношение отдельных видов лейкоцитов исследуют в окрашенных препаратах.

Клетки мезотелия — крупные клетки размером до 25 мкм. Обнаруживаются в большом

количестве в трансудатах, в экссудатах при злокачественных новообразованиях, а иногда при туберкулезе. В трансудатах большой давности клетки мезотелия могут быть в виде цитоплазмы с эксцентрично расположенным ядром — так называемые перстневидные клетки.

Опухолевые клетки с выраженным полиморфизмом расположены в препаратах обычно конгломератами без четких клеточных границ.

Другие клеточные элементы распределяются в окрашенных препаратах. Помимо различных клеток, в нативных препаратах могут встречаться и неклеточные элементы.

Детрит встречается в виде мелкозернистой сероватой массы. Характерен для гнойных экссудатов.

Жировые капли имеют вид резко преломляющих свет круглых капелек, окрашивающихся судакон III. Их находят при гнойных экссудатах с большим клеточным распадом, при хилезных и хилусоподобных экссудатах,

Кристаллы холестерина — тонкие бесцветные таблички с обрезанными углами. Обнаруживаются при старых осумкованных выпотах, чаще туберкулезного происхождения (холестериновые экссудаты).

Слизь обнаруживается крайне редко и является указанием на наличие бронхопульмонального свища.

Друзы актиномицетов можно найти в плевральном экссудате при актиномикозе.

Окрашенные препараты. Небольшую каплю осадка жидкости помещают на предметное стекло. Препарат готовят так же, как мазок крови, высушивают на воздухе и окрашивают обычными гематологическими методами. В случае геморрагического экссудата мазки следует готовить из верхнего слоя осадка, содержащего лейкоциты и другие клеточные элементы. Клеточные элементы экссудатов окрашиваются более интенсивно, чем клетки крови, поэтому красить препарат следует не дольше 8—10 мин. Окрашенный препарат просматривают с малым увеличением, затем с иммерсионной системой. В мазках подсчитывают процентное соотношение отдельных видов лейкоцитов, исследуют морфологию других клеточных элементов.

В окрашенных препаратах обнаруживают следующие элементы.

Нейтрофильные лейкоциты — преобладающие клетки гнойного экссудата. По морфологии нейтрофилов можно судить о тяжести воспалительной реакции. Дегенеративные изменения нейтрофилов (токсигенная зернистость и вакуолизация протоплазмы, гиперсегментация и пикноз ядер и др.) с явлениями клеточного распада наблюдаются при наиболее тяжелых случаях гнойного воспаления. Нейтрофилы с явлениями фагоцитоза встречаются при более доброкачественных процессах. При серозном воспалении нейтрофилы можно обнаружить в начальной стадии процесса, а также в случаях неблагоприятного течения (туберкулезный экссудативный плеврит).

Лимфоциты являются преобладающими элементами серозного выпота (до 80—90 % всех лейкоцитов). При экссудативном плеврите лю-

бой этиологии лимфоцитарный характер экссудата проявляется обычно на 2-й неделе заболевания.

Эозинофилы нередко встречаются в серозном экссудате и рассматриваются как аллергическое проявление процесса. Преобладание эозинофилов (30—80 % всех лейкоцитов — эозинофильный плеврит) наблюдается при ревматических выпотах, туберкулезе, травматическом плеврите, опухолях, паразитарных заболеваниях.

Плазматические клетки могут обнаруживаться в серозном или гнойном экссудате при затяжных воспалительных процессах и при травматических плевритах.

Гистиоциты — тканевые моноциты — клетки различного размера с базофильной или серовато-голубой цитоплазмой и ядром моноцитондальной формы. Их находят в значительном количестве в гнойных экссудатах, особенно в случаях высоковирулентной флоры.

Макрофаги — крупные клетки, сходные с моноцитами, с включениями в цитоплазме и с ядром неправильной формы — обнаруживаются при кровоизлияниях в плевральную полость, опухолях, гнойных плевритах.

Клетки мезотелия — крупные клетки (до 30 мкм) правильной формы, с центрально расположенным круглым ядром и широкой зоной цитоплазмы (от сероватого до темно-голубого цвета), иногда двуядерные и многоядерные — постоянно обнаруживаются в трансудатах, в экссудатах в начальной стадии воспалительного процесса, при реактивном раздражении плевры, а также при опухолях. В жидкостях большой давности отмечаются выраженные де-

генеративные изменения этих клеток (вакуолизация цитоплазмы — так называемые перстневидные клетки и ее жировая дистрофия).

Клетки опухолей, отличаются резко варьирующими размерами, выраженным клеточным полиморфизмом (различная величина, структура и окраска ядра, крупные ядрышки, анизохромия клеток и т. д.). Достоверными для диагноза злокачественных новообразований являются находки комплексов (конгломератов) опухолевых клеток.

2.5.4. Бактериоскопия

Сухие фиксированные мазки окрашивают по Цилю—Нильсену, Граму и т. д. Для исследования на туберкулезные микобактерии экссудат подвергают длительному центрифугированию или обработке способом флотации (см. раздел 2.4). При необходимости производят бактериологическое исследование.

Л и т е р а т у р а. *Абрамов М. Г.* Клиническая цитология.— М.: Медицина, 1974; *Калинин В. С.* Методика лабораторных клинических исследований.— М., 1932; *Михеева А. И., Богодарова И. А.*— Лабор. дело, 1969, № 7, 441; *Руководство по клинической лабораторной диагностике*/Под ред. М. А. Базарновой.— Киев, 1981; *Яновский Д. Н., Челенова М. А.* Атлас цитологии экссудатов и трансудатов.— Киев, 1968; *Kingsbury F. B., Clark C. P., Williams J., Post A. J.* Lab. Clin. Med., 1926, vol. 11, p. 981.

2.6. СПИННОМОЗГОВАЯ ЖИДКОСТЬ

Получение. Для получения спинномозговой жидкости производят люмбальную пункцию между остистыми отростками III и IV яви IV и V поясничных позвонков. Для пункции больной укладывается на бок с сильно согнутым позвоночником, согнутыми в коленях и притянутыми к животу ногами. Чтобы найти место пункции, необходимо соединить линией (йодным тампоном) высшие точки гребней подвздошных костей (линия Якобн); эта линия обычно пересекает остистый отросток IV поясничного позвонка (верхний край V поясничного позвонка). Кожу тщательно дезинфицируют и вводят иглу с мандреном. Когда игла достигает подпаутинного пространства (расстояние от поверхности кожи до канала 6—7 см), мандрей вынимают и собирают вытекающую жидкость. Количество жидкости, извлекаемой без вреда для больного, — 8—10 мл. Место пункции закрывают стерильным материалом и больного оставляют в положении на спине без подушки в течение 24 ч; в течение последующих суток больной может вставать, но на короткое время.

Ликвор представляет в нормальных условиях прозрачную, как вода, жидкость слабощелочной реакции — pH 7,35—7,4; относитель-

ная плотность 1,003—1,008; содержит 0,2—0,3 г/л белка, хлоридов — 7—7,5 г/л, форменных элементов — от 0 до 3 в 1 мкл.

2.6.1. Физические свойства

Цвет. *Желтый цвет* (ксантохромия), а также *буровато-коричневый* бывает обусловлен наличием продуктов распада гемоглобина. Различают застойную и геморрагическую ксантохромия. Застойная ксантохромия — результат замедления тока крови в сосудах мозга, что приводит к поступлению плазмы в ликвор. Геморрагическая ксантохромия обусловлена попаданием крови в ликворное пространство и сочетается с эритрохромией. Очень редко желтая окраска может быть обусловлена примесью лекарственных веществ, например пенициллина.

Красный цвет придает ликвору примесь неизменной крови (эритрохромия), которая может быть результатом кровоизлияния.

Зеленоватая окраска ликвора может быть обусловлена окислением билирубина в биливердин и примесью гноя, в последнем случае ликвор становится мутным. Мутность спинномозговой

жидкости зависит от присутствия большого количества форменных элементов, микроорганизмов и фибриногена.

Фибриновая пленка образуется в ликворе при большой концентрации фибриногена. Следует иметь в виду, что свертывается только наружный слой фибриногена, образуя мешочек, наполненный жидкостью. Мешочек разрывают концом пипетки и исследуют излившуюся жидкость. При микроскопическом исследовании в свернувшейся фибрине можно видеть клеточные элементы, а при туберкулезном менингите — иногда обнаружить микобактерии туберкулеза.

2.6.2. Микроскопия

Унифицированный метод подсчета количества форменных элементов (1974). Принцип. При помощи микроскопа и счетной камеры подсчитывают число в ликворе лейкоцитов после разрушения эритроцитов.

Реактивы. 10% раствор уксусной кислоты, подкрашенной метиловым фиолетовым; ледяной уксусной кислоты 5 мл, воды — до 50 мл, метилового фиолетового 0,1 мл.

Специальное оборудование. 1. Микроскоп. 2. Камера Фукса—Розенталя. 3. Смесители для подсчета лейкоцитов (меланжеры).

Ход исследования. В меланжер (смеситель) для подсчета лейкоцитов набирают до метки «I» 10% раствор уксусной кислоты, подкрашенный метиловым фиолетовым; затем до метки «II» набирают спинномозговую жидкость. Раствор уксусной кислоты гемолизует возможную примесь эритроцитов и подкрашивает в синий цвет лейкоциты, что в дальнейшем облегчает их подсчет. После встряхивания заполняют содержимым меланжера, предварительно выпустив первую каплю, камеру Фукса—Розенталя, которая состоит из 16 больших квадратов, каждый из которых разделен на 16 малых — всего 256 квадратов. Глубина камеры 0,2 мм, общий объем камеры 3,2 мкл. При отсутствии смесителя допускается смешивание ликвора с реактивом на часовом стекле: 10 капель ликвора и 1 капля реактива. После тщательного перемешивания полученной смесью заполняют камеру. Лейкоциты считают во всех 256 квадратах и полученное число делят на 3,2 (объем камеры). Результат соответствует количеству форменных элементов в 1 мкл ликвора; кроме того, полученный результат необхо-

димо разделить на $\frac{10}{3,2 \cdot 10}$ (степень разведения ликвора). Таким образом, формула для пересчета выглядит следующим образом:

$$\frac{A \cdot 11}{3,2 \cdot 10} = \frac{A \cdot 10}{32} = \frac{A}{3},$$

где A — число форменных элементов в объеме над 256 квадратами.

Источник ошибок. Длительное хранение спинномозговой жидкости.

Нормальные величины. Нормальное содержание лейкоцитов (цитоз) в 3 мкл спинномозговой жидкости следующее: в жидкости из желудочков мозга 0—3 клетки, в жидкости из большой цистерны — 0—2 клетки, в жидкости, полученной при люмбальной пункции, — 7—10 клеток. У детей цитоз выше, чем у взрослых, и с возрастом постепенно падает; если у ребенка до 3 мес в 1 мкл содержится 20—23 клетки, а к году 14—15 клеток, то постепенно падает их число (приблизительно на 1 клетку за год жизни) и к 10 годам составляет 4—5 клеток в 1 мкл.

Клиническое значение. Повышенный цитоз (плеоцитоз) наблюдают при воспалительных поражениях мозговых оболочек и органических поражениях вещества мозга.

Количество эритроцитов подсчитывают в счетной камере Горяева или Фукса—Розенталя. Эритроциты могут быть обнаружены в прозрачной бесцветной жидкости. При наличии 900—1000 эритроцитов в 1 мкл наблюдается опалесценция жидкости, при наличии 2000 эритроцитов появляется едва заметное розовое окрашивание, при наличии 4000—5000 эритроцитов жидкость приобретает геморрагический характер. Для диагностики внутричерепной геморрагии значение имеет не только абсолютное количество эритроцитов, но и нарастание их числа при повторном исследовании спинномозговой жидкости.

Дифференциация клеточных элементов в счетной камере. В счетной камере с сухой системой (окуляр 15X или 10X, объектив 40X) можно дифференцировать почти все клеточные элементы. Реактив окрашивают ядра клеток в красновато-фиолетовый цвет, цитоплазма остается бесцветной. При этом обращают внимание на величину клеток, форму и расположение ядра, ядерно-цитоплазмное соотношение, наличие включений в цитоплазме и т. д. В практической работе метод используют наиболее часто.

Дифференциация в окрашенных препаратах. Окраска по Розиной. Жидкость центрифугируют 7—10 мин. Надосадок сливают, осадок помещают на обезжиренное стекло, легким покачиванием распределяют его на поверхности стекла, через 1—2 мин жидкость сливают. При небольшом плеоцитозе (менее 50 в 3 мкл) осадок распределяют на участке 1 см²; при плеоцитозе, превышающем 100 в 3 мкл, — на участке 1,5—2 см²; при плеоцитозе 500 в 3 мкл — на участке 2—3 см². При очень большом количестве клеточных элементов и наличии крови осадок распределяют на всей поверхности предметного стекла и тотчас сливают. Стекло ставят в вертикальное положение. При этом достигается минимальная толщина мазка. Мазки высушивают в сушильном шкафу при температуре 40—50 °С. Затем фиксируют метанолом 1—2 мин и красят по Романовскому: тонкий препарат с небольшим цитозом и кровью 6—7 мин, с большим цитозом и кровью 10—12 мин. Затем краску сливают, мазок промывают дистиллированной водой и высушивают. Если ядра имеют бледно-голубой цвет, мазок докрасивают еще 2—3 мин.

Окраска по Возной. Осадок выливают на стекло; слегка покачивая его, жидкость равномерно распределяют на поверхности. Мазок высушивают при комнатной температуре в течение суток, фиксируют метиловым спиртом 5 мин, покрывают раствором азур-эозина (таким же, как для окраски крови, но разведенным в 5 раз). Красят в течение 1 ч. Если клетки бледны, докрасивают неразведенной краской под контролем микроскопа от 2 до 10 мин. Чем больше форменных элементов в ликворе, особенно при наличии крови, тем больше надо дополнительно красить.

Окраска по Алексееву. На высушенный, но не фиксированный препарат наносят 6—10 капель красителя Романовского. Той же пипеткой осторожно распределяют краску на весь препарат и оставляют на 30 с. Затем добавляют на препарат (не сливая краски) 12—20 капель дистиллированной воды, предварительно нагретой до температуры 50—60 °С. Соотношение капель краски и воды должно быть 1:2. Покачиванием препарата перемешивают краску с водой и оставляют на 3 мин. Смывают краску струей дистиллированной воды, сушат препарат фильтровальной бумагой и микроскопируют. Метод пригоден для проведения срочного цитологического исследования.

Морфология клеточных элементов. *Лимфоциты* по величине сходны с эритроцитами. При дифференцировании клеток в камере лимфоциты, окрашенные фуксином, имеют круглое ядро и узкий неокрашенный ободок цитоплазмы, иногда только с одной стороны. Лимфоциты в небольшом количестве (8—10 в 3 мкл) встречаются в нормальной жидкости. Количество их нередко увеличивается при опухолях ЦНС. Значительный и резкий лимфоидный плеоцитоз наблюдают при хронических воспалительных процессах в оболочках (туберкулезный менингит, цистицеркозный арахноидит и др.), в послеоперационном периоде (спустя несколько дней после операции вслед за нейтрофильным плеоцитозом) и пр.

Плазматические клетки. Фуксин хорошо окрашивает ядро и цитоплазму, клетки крупнее лимфоцита, ядро круглое, эксцентрично расположенное, большое количество цитоплазмы при сравнительно небольшом размере ядра (размер клеток 6—12 мкм). Плазматические клетки обнаруживаются только в патологических случаях: при длительно текущих воспалительных процессах в мозге и оболочках (энцефалит, туберкулезный менингит, цистицеркозный арахноидит), в послеоперационном периоде при вяло текущем заживлении раны.

Тканевые моноциты. Размер клеток от 7 до 10 мкм. В нормальной жидкости иногда могут встречаться в виде единичных экземпляров. В большом количестве обнаруживаются после оперативного вмешательства на ЦНС, при длительно текущих воспалительных процессах в оболочках (туберкулезный менингит, цистицеркоз) и др. Наличие тканевых моноцитов в послеоперационном периоде говорит об активной тканевой реакции и нормальном заживлении раны.

Макрофаги могут иметь ядра различной формы, чаще ядро расположено на периферии клетки, цитоплазма содержит включения и вакуоли. Величина от 7 до 17 мкм, иногда 20—30 мкм. В нормальном ликворе макрофаги не встречаются. Наличие макрофагов при нормальном цитозе наблюдают после кровотечения или при воспалительном процессе. Как правило, их встречают в послеоперационном периоде, что имеет прогностическое значение и говорит об активной санации ликвора.

Зернистые шары (липофаги, клетки с жировой инфильтрацией, жировой дистрофией) — это макрофаги с наличием в цитоплазме капель жира. В счетной камере они имеют различную величину, чаще округлую форму, окрашены в темно-коричневый цвет, ядра клеток не видны. В окрашенных препаратах клетки имеют небольшое периферическое расположенное ядро и крупноячеистую цитоплазму. Величина ячеек различна и зависит от величины включенных капель жира. Перекладки ячеек могут быть в виде тонких нитей или более грубой базофильной сетки. Зернистые шары обнаруживаются в патологической жидкости, полученной из мозговых кист, в очагах распада мозговой ткани, при опухолях.

Нейтрофилы в камере идентичны по виду нейтрофилам периферической крови. Наличие в ликворе нейтрофилов даже в минимальных количествах указывает на бывшую или имеющуюся воспалительную реакцию. Нейтрофилы могут обнаруживаться при наличии свежей крови в ликворе и после операций на ЦНС. Благодаря цитологическим свойствам ликвора клетки, особенно нейтрофилы, подвергаются изменениям (лизис ядра, распад клеток, наличие голых ядер). Преобладание в ликворе неизменных нейтрофилов свидетельствует об остром воспалительном процессе, присутствие измененных — указывает на затухание воспалительного процесса, сочетание измененных нейтрофилов с сохранившимися служит признаком продолжающегося воспаления. Неизменные нейтрофилы всегда обнаруживаются в ликворе с примесью свежей крови.

Эозинофилы в камере можно определить по характерной равномерной блестящей зернистости. Эозинофилы встречаются при субарахноидальных кровоизлияниях, токсических реактивных менингитах, туберкулезных и сифилитических менингитах, опухолях мозга, цистицеркозе. Для последнего характерны лимфоидный плеоцитоз, небольшое количество тканевых моноцитов, плазматических клеток и эозинофилов. Измененные клетки и тени клеток сохраняют только контуры цитоплазмы и остатки ядра. Определить природу таких клеток ни в камере, ни в окрашенных препаратах невозможно.

Эпителиальные клетки (мезотелиальные, арахноэндотелиальные), ограничивающие подпаутинное пространство, встречаются редко. Это довольно крупные клетки, чаще круглые, с небольшими круглыми или овальными ядрами. В камере имеют сходство с клетками плоского эпителия, обнаруживаются при новообразованиях, иногда при воспалительных процессах.

Опухолевые клетки и их комплексы находят в камере и в окрашенном препарате. Злокачественные клетки могут относиться к следующим видам опухолей: медуллобластоме, мультиформной спонгиобластоме, астроцитоме, раку. Изучение этих клеток требует специальных знаний.

Кристаллы встречаются в спинномозговой жидкости редко. В случае распада опухоли в содержимом кисты можно обнаружить кристаллы гематоидна, холестерина, билирубина.

Элементы эхинококка — крючья, сколексы и обрывки хитиновой оболочки пузыря — могут быть при множественном эхинококкозе оболочек (их находят чрезвычайно редко).

2.6.3. Химическое исследование

Унифицированный метод определения белка с сульфосалициловой кислотой и сульфатом натрия (1972). Принцип. Интенсивность помутнения при коагуляции белка сульфосалициловой кислотой пропорциональна его концентрации.

Реактивы. 1. 6% раствор сульфосалициловой кислоты. 2. 14% раствор безводного сульфата натрия. Для анализа применяют свежеприготовленную смесь равных объемов этих реактивов (рабочий раствор). 3. Стандартный раствор альбумина — 1% раствор: 1 глиофилизированного альбумина (из человеческой или бычьей сыворотки) растворяют в небольшом количестве 0,9% раствора хлорида натрия в мерной колбе вместимостью 100 мл и доводят объем раствором хлорида натрия до метки. Реактив нестойкий. Для стабилизации к стандартному раствору прибавляют 1 мл 5% раствора азиды натрия (NaN_3). В этом случае при хранении в холодильнике реактив годен к употреблению в течение 2 мес; 1 мл раствора содержит 10 мг альбумина. 4. 0,9% раствор хлорида натрия.

Специальное оборудование: фотоэлектроколориметр.

Ход определения. В пробирку наливают 5 мл свежеприготовленного рабочего раствора и 0,5 мл ликвора. Тщательно перемешивают. Через 10 мин интенсивность помутнения измеряют на фотоэлектроколориметре в кювете с длиной оптического пути 1 см против контроля, длина волны 410—480 им (сине-фиолетовый светофильтр). В контроль вместо реактива берут 0,9% раствор хлорида натрия. Расчет ведут по калибровочному графику. Построение калибровочного графика: из стандартного раствора готовят разведения и обрабатывают их, как опыт. В 5 пробирок наливают соответственно 0,05; 0,1; 0,2; 0,5 и 1 мл стандартного раствора альбумина и в каждую из них доливают до объема 10 мл 0,9% раствора хлорида натрия. Концентрация белка в этих растворах составляет соответственно 0,05; 0,1; 0,2; 0,5 и 1 г/л.

Примечания. 1. Если муть начинает оседать, перед измерением на фотоэлектроколориметре пробирку следует тщательно

встряхнуть. 2. Перед опытом целесообразно поставить реакцию Панди (качественная проба на белок), и если результат реакции оценивают 3+ или 4+ то перед количественным исследованием ликвор надо развести изотоническим раствором хлорида натрия и при расчете учесть степень разведения. 3. Прямолинейная зависимость при построении калибровочного графика сохраняется до 1 г/л, поэтому при более высоких концентрациях белка ликвор следует разводить.

Нормальные величины. Нормальное содержание белка в ликворе из желудочков мозга 0,12—0,2 г/л, из большой цистерны — от 0,1 до 0,22 г/л, при люмбальной пункции — от 0,22 до 0,33 г/л.

Клиническое значение. Повышенные содержания белка отмечают при нарушении гемодинамики, воспалительных процессах, органических поражениях ЦНС и оболочек мозга. Наиболее характерно увеличение содержания белка для экстрамедуллярно расположенных опухолей спинного мозга. Пониженное содержание белка в ликворе наблюдают при гидроцефалии и гиперсекреции ликвора.

Белок спинномозговой жидкости состоит из альбуминов и глобулинов, отношение глобулинов к альбуминам колеблется в пределах 0,2—0,3.

Унифицированный метод определения глобулинов высаливанием (реакция Нонне—Апельта) (1974). Принцип. Реакция основана на свойстве солей в определенной концентрации осаждать избирательно глобулины.

Реактивы. Насыщенный раствор сульфата аммония х. ч.: 85 г соли растворяют в 100 мл воды при кипячении. Полученный раствор выдерживают 48 ч при комнатной температуре и после фильтрования употребляют для постановки реакции. Реакция раствора нейтральная (рН 7,0—7,1).

Специальное оборудование не требуется.

Ход исследования. В пробирку вносят 0,5 мл ликвора, приливают 0,5 мл реактива и перемешивают (опыт). В контрольную пробирку равного диаметра наливают 1 мл воды (контроль).

Оценка результатов. Регистрацию результатов реакции производят в течение 3 мин после смешивания ликвора с реактивом, так как в последующем помутнение может произойти и в нормальной спинномозговой жидкости. Сравнение опыта с контролем производят на темном фоне. Для выражения результатов пользуются системой 4 плюсов: значительное помутнение 4+, умеренное 3+, заметная опалесценция 2+, слабая опалесценция 1+.

Источники ошибок. 1. Неточная величина рН реактива. 2. Загрязнение посуды. 3. Поздняя регистрация результатов.

Клиническое значение. Реакция дает относительное представление о нормальном и патологическом содержании глобулинов в ликворе. Слабую опалесценцию иногда находят и в нормальной спинномозговой жидкости при

небольшом повышении содержания общего белка (больше 0,2 г/л). Наиболее достоверное представление о содержании глобулинов и их фракций можно получить при электрофоретическом исследовании ликвора, которое целесообразно проводить при положительной реакции Нонне—Апельта.

Унифицированный метод определения глобулинов осажждением карболовой кислотой (реакция Панди) (1974). Принцип. Реакция основана на осаждении глобулинов насыщенным раствором карболовой кислоты.

Реактивы. Насыщенный раствор карболовой кислоты: 100 г карболовой кислоты растворяют в 1 л воды, встряхивают и оставляют в термостате при 37 °С на 6—8 ч. После пребывания при комнатной температуре в течение 7 дней надосадочную жидкость сливают и используют в качестве реактива.

Специальное оборудование не требуется.

Ход исследования. На часовое стекло, помещенное на черную бумагу, наливают 1 мл реактива и по краю настилают 1—2 капли ликвора.

Оценка результатов. В случае положительного результата в месте соприкосновения реактива с исследуемой спинномозговой жидкостью образуется молочно-белое облачко, переходящее в муть. Для обозначения результатов реакции Панди пользуются системой четырех плюсов: слабая опалесценция 1+, заметная опалесценция 2+, умеренное помутнение 3+, значительное помутнение 4+.

Примечание. Реакция Панди осаждает такие белковые фракции, которые остаются неосажденными в реакции Нонне—Апельта, поэтому целесообразно ставить обе реакции одновременно.

Унифицированная коллоидная реакция с хлорным золотом (реакция Ланге) (1974).

Принцип. Коллоидные растворы, не изменяющиеся под влиянием различных разведений нормальной спинномозговой жидкости, в патологически измененной жидкости при тех же условиях меняют степень дисперсности в зависимости от разведения жидкости, при этом изменяется цвет, растворимость и может выпадать осадок.

Реактивы. 1. Хлорид натрия — 4,5 г на 1 л воды. 2. Хлорное золото — 1 % раствор в воде. 3. Цитрат натрия ($C_6H_5Na_3 \cdot 5H_2O$) — 1 % раствор в воде. 4. Рабочий раствор хлорного золота: к 95 мл воды приливают 1 мл 1 % хлорного золота, нагревают до 90—95 °С, прибавляют 5 мл 1 % раствора цитрата натрия и кипятят до появления вишнево-красного окрашивания. В процессе кипячения окраска раствора меняется, переходя из синей в фиолетовую, затем красную и вишневую. Приготовленный раствор можно хранить в темном месте 2 мес.

Специальное оборудование не требуется.

Ход исследования. Готовят разведение спинномозговой жидкости в 11 пробирках следующим образом: в первую пробирку нали-

вают 0,9 мл, а в остальные по 0,5 мл 0,45% раствора хлорида натрия. В первую пробирку приливают 0,1 мл исследуемой спинномозговой жидкости и после перемешивания 0,5 мл переносят во вторую пробирку; эту процедуру последовательно повторяют с 10 пробирками, из последней 0,5 мл смеси удаляют. Таким образом получают серию разведений от 1:10 до 1:5120. В 11-ю пробирку спинномозговую жидкость не добавляют, она является контролем. Во все пробирки добавляют по 2,5 мл рабочего раствора хлорного золота. После энергичного встряхивания пробирки оставляют на 16—18 ч при комнатной температуре.

Оценка полученных результатов. Практически результаты регистрируют на следующий день после постановки реакции. Если спинномозговая жидкость нормальная, смесь во всех 11 пробирках остается пурпурно-красной или в одной из первых становится пурпурно-фиолетовой. При патологическом ликворе на дне пробирок появляется осадок и цвет жидкости меняется. Изменение цвета принято регистрировать цифрами: 0 — отсутствие изменения окраски, 1 — красно-фиолетовый цвет, 2 — фиолетовый, 3 — красно-синий, 4 — синий и сине-фиолетовый, 5 — светло-синий и голубой, 6 — бесцветный.

Цифровое выражение по пробиркам отрицательной реакции — 0000000000, дегенеративной кривой — 6666543210, воспалительной — приблизительно 00124566530.

Клиническое значение. Если соотношение белковых фракций ликвора не изменено, то реакция Ланге не обнаруживает отклонений от нормы, при изменении альбумино-глобулинового коэффициента происходит изменение коллоидной реакции. Воспалительный тип реакции Ланге наблюдается при повышении содержания в основном (J- и -у-глобулинов, а дегенеративный и дегенеративно-воспалительный тип реакции бывает за счет увеличения мелкодисперсной фракции белка — альбуминов к снижению содержания глобулинов.

Большое значение имеют глобулиновые реакции при дифференциальной диагностике органических и функциональных нарушений, например неврастных и начинающегося прогрессивного паралича или латентного сифилиса.

Реакция Фридмана. Принцип. Метод основан на окислительно-восстановительной реакции раствора перманганата калия и осаждения белка трихлоруксусной кислотой.

Реактивы. 1. 1% водный раствор перманганата калия, приготовленный на бидистиллированной воде и постоявший не менее 2—3 нед. 2. 20% раствор трихлоруксусной кислоты х. ч.

Ход исследования. К 1 мл ликвора прибавляют 0,05 мл (1 каплю) реактива 1, смесь хорошо взбалтывают. В нормальной спинномозговой жидкости наблюдается яркое фиолетовое окрашивание, которое долго сохраняется. Цвет не меняется от прибавления 2—3 капель реактива 2.

Клиническое значение. Реакция используется для ранней диагностики менинги-

та. В ранней стадии менингита при смешивании ликвора с раствором перманганата калия фиолетовый цвет очень быстро (в течение 1—2 мин) переходит в красно-желтый и коричнево-желтый цвет. При добавлении трихлоруксусной кислоты (реактив 2) в случаях гнойного менингита цвет доходит до светло-желтого или наступает полное обесцвечивание с одновременным помутнением и осаждением белка. Изменения цвета по типу менингитической реакции не наступает при других органических поражениях мозга: травме, опухолях мозга, сифилисе мозга, рассеянном склерозе и др., протекающих без менингеальных симптомов.

Количественное определение крови. Принцип. Метод основан на сравнении уровня гемоглобина в периферической крови и спинномозговой жидкости. М. М. Гунер использовал для определения гемоглобина в ликворе 0,04 % раствор аммиака, предложенный для фотометрического определения гемоглобина в периферической крови.

Ход определения. 5 мл геморрагической спинномозговой жидкости центрифугируют 10 мин при 1500 об/мин, осадок растворяют в 5 мл 0,04 % раствора аммиака (необязательно брать 5 мл жидкости, важно, чтобы количество жидкости и раствора аммиака было одинаковым). Кровь из пальца в количестве 20 мкл (пипетка Сали) смешивают с 5 мл 0,04 % раствора аммиака. Концентрацию гемоглобина

в крови, и ликворе определяют на спектрофотометре при длине волны 542 нм. Количество крови рассчитывают по формуле:

$$X = 20 \cdot \frac{D_2}{D_1} \cdot V,$$

где X — количество крови в ликворе (мкл/мл); D_2 и D_1 — соответственно оптическая плотность раствора оксигемоглобина крови и спинномозговой жидкости; V — объем жидкости.

У больных с-кровоизлиянием в головной мозг количество крови находится в пределах 1—123 мкл/мл.

Определение в спинномозговой жидкости концентрации глюкозы, хлоридов, электролитов, активности ферментов производят так же, как при исследовании крови; эти методы описаны в соответствующих разделах справочного руководства.

Литература. Бургман Г. П., Возная А. Ц. Практическое руководство по исследованию спинномозговой жидкости.— М., 1956; Бургман Г. П., Лобкоба Т. Н. Исследование спинномозговой жидкости.— М., 1968; Гунер М. М. Определение количества крови в спинномозговой жидкости.— Лаб. дело, 1972, № 3, с. ПТС-ISO; Калинин В. С. Методика лабораторных клинических исследований.— М., 1932; Фридман А. П. Основы ликворологии.— М., 1971.

Раздел 3

МЕТОДЫ ГЕМАТОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Анализ крови является одним из самых распространенных лабораторных исследований. Наиболее широко применяется так называемый общий клинический анализ, включающий исследование концентрации гемоглобина в 1 мкл крови (в 1 л по системе СИ), подсчет числа эритроцитов в 1 мкл крови, вычисление цветового показателя, подсчет числа лейкоцитов в 1 мкл крови, исследование лейкоцитарной формулы (процентного соотношения различных лейкоцитов) и определение скорости оседания эритроцитов (СОЭ) в миллиметрах за 1 ч. Такие исследования проводят всем стационарным больным и по показаниям — амбулаторным. Весьма

распространен укороченный анализ крови — так называемая тройка (исследование количества гемоглобина, подсчет числа лейкоцитов и определение СОЭ), который проводят при профилактических осмотрах, направлении на санаторно-курортное лечение, диспансеризации определенных контингентов рабочих и служащих в различных отраслях народного хозяйства.

При необходимости, особо в экстренных случаях (при подозрении на воспалительный процесс, острую кровопотерю и др.), исследуют только один показатель (подсчет числа лейкоцитов в крови, определение содержания гемоглобина).

3.1. ВЗЯТИЕ КРОВИ

Для исследования крови на общий клинический анализ кровь берут из пальца обычно утром, желательнее до физической нагрузки и различных диагностических процедур. Некоторые авторы рекомендуют для избежания пищеварительного лейкоцитоза брать кровь натощак, хотя это представляется и нестрогим обязательным.

Реактивы. 1. 5% раствор трехзамещенного цитрата натрия; хранят 1—2 нед, при помутнении негоден. 2. Трансформирующий раствор (см. 3.2.1). 3. Изотонический раствор натрия хлорида или реактив Гайема (см. 3.3.1). 4. 3—5% раствор уксусной кислоты. 5. Спирт. 6. Йод.

Оборудование. 1. Копье для укола пальца (необходимо стерилизовать сухим жаром в течение 1 ч при 160 °С или автоклавированием в течение 30 мин при 1,5 атм или кипячением не менее 30 мин). 2. Пробирки. 3. Пипетки вместимостью 0,02 мл (стерильные). 4. Капилляры от аппарата Панченкова (стерильные). 5. Пипетки вместимостью 5 и 1 мл (для разводящих жидкостей) или бюретки. 6. Предметные стекла, шлифованные стекла.

Способ взятия крови. 1. Заранее наливают в пробирки соответствующие реактивы: для определения СОЭ — в капилляр Панченкова набирают (до метки 0,75) реактив 1; для определения концентрации гемоглобина — 5 мл реактива 2; для подсчета числа эритроцитов — 4 мл реактива 3, для подсчета числа лейкоцитов — 0,4 мл реактива 4.

2. Тщательно протерев кожу мякоти пальца (лучше IV пальца) ватным шариком, смоченным спиртом, делают укол индивидуальным стерильным копьём до упора.

3. Первую выступившую каплю крови вытирают, из следующих капель крови, выступающих из мест укола при легком надавливании, быстро набирают необходимое количество крови. Начинают взятие обычно с разведения крови для определения СОЭ, так как для этого исследования требуется наибольшее количество крови.

4. Для определения СОЭ в капилляр от аппарата Панченкова, промытый в реактиве 1, набирают кровь до метки 0 (100 делений) и тщательно выдувают ее в пробирку с подготовленным раствором цитрата натрия (соотношение при этом крови и реактива 4:1), пробирку встряхивают. Мякоть пальца вытирают сухим ватным шариком и после надавливания собирают выступившую каплю крови.

5. Для определения концентрации гемоглобина в сухую стерильную пипетку вместимостью 0,02 мл набирают кровь до метки, выдувают ее в пробирку с раствором 2 и несколько раз ополаскивают пипетку в этом растворе, заполняя ее и выдувая раствор. Снова вытирают место укола и выдавливают свежую каплю крови.

6. Для подсчета числа эритроцитов кровь берут в количестве 0,02 мл в пипетку и выдувают в пробирку с реактивом 3.

Применявшиеся ранее смесители (меланжеры) для взятия крови с целью подсчета

эритроцитов и лейкоцитов в настоящее время заменены пробирочным методом, так как он точнее, проще и удобнее при мытье посуды.

В целях более точного разведения крови (в 200 раз) пипетку после выдувания крови несколько раз промывают раствором, находящимся в пробирке.

7. Для подсчета лейкоцитов кровь берут пипеткой до метки (0,02 мл) и выдувают ее в пробирку с раствором 4, промывают несколько раз в растворе уксусной кислоты (разведение крови в 20 раз). Для взятия крови у одного пациента можно пользоваться одной пипеткой вместимостью 0,02 мл, но обязательно набирать кровь для лейкоцитов в последнюю очередь (так как уксусная кислота гемолизует эритроциты).

8. Для исследования лейкоцитарной формулы, морфологии эритроцитов, лейкоцитов, тромбоцитов готовят мазки крови: вытирают место укола сухим шариком ваты и наносят каплю крови на сухое обезжиренное предметное стекло, затем быстро готовят тонкие мазки с помощью шлифованного стекла, краем которого быстрым движением продвигают по предметному стеклу каплю крови (см. 3.3.2).

Для профилактики сывороточного гепатита запрещается брать кровь одной микропипеткой

у нескольких лиц. При недостаточном количестве микропипеток рекомендуется применять часовые стекла или лунки, при этом у каждого пациента кровь берут стерильным индивидуальным капилляром от аппарата Панченкова, помещают в часовое стекло или лунку, из которых быстро набирают кровь для соответствующего разведения, необходимого для того или иного исследования.

В настоящее время в связи с появлением гематологических автоматов стали шире использовать для общего клинического анализа венозную кровь. Кровь из вены берут либо в специальные пластиковые пробирки одноразового пользования с порошком ЭДТА, либо в стеклянные пробирки с другим антикоагулянтом. Необходимо точно после взятия крови закрыть пробирку пробкой и несколько раз тщательно перемешать кровь, не взбалтывая ее (опрокидывая пробирку сначала пробкой вниз, затем пробкой вверх). Тщательное перемешивание крови позволяет избежать образования сгустков, наличие которых искажает результаты исследования.

Л и т е р а т у р а . Бейер Б. А. Краткое пособие по гематологии. 2-е изд. — Л., 1967, с. 219; Приказ Министерства здравоохранения СССР № 300 от 08.04.77 г.

3.2. ГЕМОГЛОБИН

Гемоглобин — основной дыхательный пигмент эритроцитов, относящийся к хромопротеидам и обеспечивающий ткани кислородом; состоит из белка — глобина и тема — соединения протопорфирина IX с железом. Последний придает гемоглобину характерную окраску. Присоединение к тему различных химических групп сопровождается изменением окраски, на этом основано и определение концентрации гемоглобина в крови.

3.2.1. Содержание гемоглобина

Исследование содержания гемоглобина в крови (гемоглобинометрия) включает определение гемоглобина и его дериватов, которые присутствуют в крови здоровых людей или выявляются при различных патологических состояниях. У здоровых в крови гемоглобин находится главным образом в виде оксигемоглобина, восстановленного гемоглобина и в небольшом количестве — метгемоглобина, карбоксигемоглобина и вердоглобина.

Для определения содержания гемоглобина в крови предложено много различных методов. Наибольшее распространение получили колориметрические, основанные на колориметрии производных гемоглобина. Наиболее простым и широко распространенным в прошлом методом была колориметрия солянокислого гематина, на котором основан метод Сали. Метод чрезвычайно прост и быстро выполняем, но недостаточно точен.

Поданным М. С. Кушаковского (1968), при суммировании различных погрешностей этого метода ошибка при определении гемоглобина составляет $\pm 30\%$. Поэтому в настоящее время метод не может быть рекомендован.

В качестве унифицированного метода в нашей стране принят гемиглобинцианидный метод с применением ацетонцианидрина.

Унифицированный гемиглобинцианидный метод (1974). Принцип. Гемоглобин окисляют в метгемоглобин (гемиглобин) железосинеродитом калием (красная кровяная соль); образующийся с ацетонцианидрином окрашенный цианметгемоглобин (гемиглобинцианид) определяют колориметрически.

Р е а к т и в ы. 1. Трансформирующий раствор: ацетонцианидрин — 0,5 мг; калий железосинеродистый — 0,2 г; натрия гидрокарбонат — 1 г; дистиллированная вода — до 1 л. Раствор желтого цвета, прозрачный. При обесцвечивании или появлении осадка непригоден. Стабилен в течение нескольких месяцев при хранении в посуде из темного стекла при комнатной температуре. 2. Калибровочный раствор гемиглобинцианида. Можно использовать стандартный раствор фирмы «Имуна» (ЧССР) с концентрацией гемиглобинцианида 61,23 мг/100 мл и фирмы «Реанал» (ВНР) с концентрацией вещества 59,75 мг/100 мл. Это соответствует концентрации гемоглобина в крови 15,4 г/100 мл и 15 г/100 мл при разведении ее в 251 раз. Стандартные растворы хранят в холодильнике (в замороженном виде) в защищенном от света месте.

Специальное оборудование. Фотоэлектроколориметр (ФЭК-56М или другой).

Ход определения. В пробирку к 5 мл трансформирующего раствора добавляют 0,02 мл крови (разведение в 251 раз). Содержимое пробирки тщательно перемешивают и оставляют стоять на 10 мин. Измеряют на фотоэлектроколориметре при длине волны 500—560 нм (зеленый светофильтр) в кювете с толщиной слоя 1 см против холостой пробы (трансформирующий раствор). Измеряют при тех же условиях стандартный раствор.

Расчет содержания гемоглобина производят по калибровочному графику (см. ниже), построенному по стандартному раствору гемиглобинцианида, или по формуле:

$$Hb (\text{г}\%) = \frac{E_{\text{оп}}}{E_{\text{ст}}} \cdot C \cdot K \cdot 0,001,$$

где $E_{\text{оп}}$ — экстинкция опытной пробы; $E_{\text{ст}}$ — экстинкция стандартного раствора; C — концентрация гемиглобинцианида в стандартном растворе, мг%; K — коэффициент разведения крови; 0,001 — коэффициент для пересчета мг/100 мл в г/100 мл.

№ пробирки	Стандартный раствор, мл	Трансформирующий раствор, мл	Содержание гемоглобина в крови, г %
1	—	6	«Холостая» проба
2	2	4	5
3	4	2	10
4	6	—	15

Измеряют против «холостой» пробы.

Определение содержания гемоглобина с помощью счетчика к гематологического автомата. Принцип см. «Унифицированный гемиглобинцианидный метод».

Оборудование. Счетчик или гематологический автомат.

Ход исследования соответствует инструкции, приложенной к прибору.

Нормальные величины. У здоровых людей концентрация гемоглобина в крови составляет 13,2—16,4 г/100 мл (132—164 г/л в международной системе единиц — СИ) у мужчин и 11,5—14,5 г/100 мл (115—145 г/л) у женщин [Грибова И. А., 1979].

Клиническое значение. Снижение концентрации гемоглобина в крови является основным лабораторным симптомом анемии. При этом содержание гемоглобина варьирует в широких пределах в зависимости от формы анемии и ее степени. Так, при наиболее частой форме малокровия — железодефицитной анемии — у большинства больных отмечается относительно умеренное снижение гемоглобина (8,5—11,4 г/100 мл, или 85—114 г/л), а более выраженное уменьшение (6—8,4 г/100 мл, или 60—84 г/л) наблюдается реже. Значительное снижение концентрации гемоглобина в крови

характерно для острой кровопотери, гипопластической анемии, гемолитической анемии в стадии гемолитического криза, рецидива В₁₂-дефицитной анемии (5—8 г/100 мл, или 50—80 г/л). Следует, однако, иметь в виду, что диагностика анемии ни в коей мере не может быть проведена лишь на основании определения концентрации гемоглобина в крови. Это исследование устанавливает только факт наличия малокровия. Для уточнения его характера необходимо исследование количества эритроцитов, цветового показателя, других расчетных индексов эритроцитов, морфологии эритроцитов.

Повышение концентрации гемоглобина в крови может наблюдаться при миелопролиферативных заболеваниях и симптоматических эритроцитозах, сопутствующих различным состояниям. Среди миелопролиферативных заболеваний наиболее характерно повышение гемоглобина при эритремии, концентрация которого может быть в пределах 18—21 г/100 мл (180—210 г/л). Для диагностики эритремии важно исследование и количества эритроцитов, лейкоцитов, тромбоцитов в крови, которые, как правило, при этом заболевании повышаются.

Симптоматические реактивные эритроцитозы могут быть абсолютными (обусловлены пролиферацией элементов эритропоэза) и относительными (гемоконцентрационные). Физиологическое увеличение содержания гемоглобина свойственно новорожденным.

Литература. Кушаковский М. С. Клинические формы повреждения гемоглобина.— Л., 1968, с. 22; Грибова И. А. Гематологическая норма.— В кн.: Руководство по гематологии /Под ред. А. И. Воробьева, Ю. И. Лорие. М.: Медицина, 1979, с. 52.

3.2.2. Фракции гемоглобина

У здорового человека имеется три основных типа гемоглобина: примитивный — Р, фетальный — F и взрослый А, каждый из которых делится на подтипы. Гемоглобин Р, характерный для ранней эмбриональной стадии, состоит из подтипов Говер I и Говер П. В составе гемоглобина Р, кроме основной, выделены еще две формы: 1) Фессаса и Папаспиру и 2) Александра:

Гемоглобин А имеет несколько фракций: А₁, А₂, А₃. У здорового взрослого человека фракция А₁ является основной, составляя %—98 %; фракция А₂ не превышает 3 %, А₃ — в виде следов, гемоглобин F не более 2 %. Фракция А₁ делится на несколько подфракций: А_{1a}, А_{1b}, А_{1c}, А_{1d}. У плода до 3-месячного возраста преобладает тип Р, который затем заменяется гемоглобином F, а у новорожденного последний составляет всего 20 %, остальной представлен типом А. В дальнейшем гемоглобин F продолжает уменьшаться и к 4—5 мес достигает величин взрослого человека (1—2%).

Гемоглобин F отличается от А значительной устойчивостью к действиям щелочи. Химическое различие состоит в структуре полипептидных цепей глобина: в гемоглобине А имеются 2а-

и 2в-цепи (a_2, v_2), в гемоглобине F в-цепи заменены у-цепями (a_2, y_2).

Метод Зингера [Singer et al., 1951]. Принцип. Определение основано на щелочестойкости гемоглобина F; с помощью щелочи проводят денатурацию гемоглобина A, а F определяют спектроскопически.

Реактивы. 1. Раствор едкого натра 1/12 н. (рН 12,7); хранят в парафинированном сосуде в холодильнике. 2. Раствор сульфата аммония; к 350 г аммония ($(NH_4)_2SO_4$ добавляют 500 мл дистиллированной воды, дают постоять и смешивают 400 мл этого раствора с равным объемом дистиллированной воды. Затем к 800 мл полунасыщенного раствора добавляют 2 мл 10н. HCl. 3. 5 % раствор цитрата натрия.

Специальное оборудование. Спектрофотометр.

Ход определения. Приготовление гемоглобинового раствора — гемолизата: 0,2—1 мл исследуемой крови помещают в пробирку с 3 мл 5 % раствора цитрата натрия, перемешивают и центрифугируют в течение 5 мин при 3000 об/мин. Верхний слой отсасывают и повторно 2—3 раза отмывают эритроциты с центрифугированием до полного обесцвечивания надосадочного слоя. Затем добавляют к осадку равный объем дистиллированной воды, хорошо перемешивают, Центрифугируют 15—20 мин при 6000 об/мин. Отобранный верхний слой исследуют. Гемолизат можно хранить в холодильнике несколько недель.

В 1 мл дистиллированной воды разводят 0,2 мл гемолизата с приблизительной концентрацией 10 г% (100 г/л). Определяют общее содержание гемоглобина (A + F) на спектрофотометре при длине волны 541 нм в кювете с толщиной слоя 1 см.

Для изоляции гемоглобина F в пробирку с 3,2 мл 1/12 н. раствора едкого натра, предварительно помещенную в водяную баню на 10 мин при 20 °С, быстро вливают 0,2 мл гемолизата, сильно взбалтывают в водяной бане в течение 10 с, затем включают секундомер. Через 1 мин добавляют 6,8 мл раствора сульфата аммония. Смесь хорошо перемешивают, переворачивая пробирку до 6 раз, и затем фильтруют через двойной слой обезоленных фильтров. На фильтре остается гемоглобин A, а фильтрат содержит гемоглобин F, который определяют спектроскопически в тех же условиях, что и раствор общего гемоглобина.

Проводят также и «холостой» опыт — определяют экстинкцию смеси 3,2 мл 1/12 н. едкого натра, 6,8 мл раствора сульфата аммония и 0,2 мл воды.

Расчет проводят по формуле:

$$\frac{E_2 - E_3}{E_1} \cdot 100 = \% \text{ гемоглобина F,}$$

где E_1 — экстинкция общего раствора гемоглобина; E_2 — экстинкция раствора гемоглобина F; E_3 — экстинкция «холостой» пробы.

Менее точное представление о содержании гемоглобина F дает цитохимическое исследование (метод Бетке) (см. 3.3.9).

Клиническое значение. Повышение гемоглобина F является важным критерием для диагностики Р-талассемии, при которой одновременно повышается и содержание гемоглобина A2. Особенно высокие цифры гемоглобина F могут быть при гомозиготной в-талассемии до 20—90 %. При гетерозиготной в-талассемии содержание гемоглобина F может быть нормальным или умеренно повышенным (2,5—7 %).

Однако надо иметь в виду, что повышение гемоглобина F не является специфичным для Р-талассемии. Оно встречается при различных формах малокровия: других гемолитических анемиях, железодефицитной анемии, гипопластической анемии, лейкозах и других состояниях, сопровождающихся гипоксией. Возможно, что повышение гемоглобина F при этих заболеваниях развивается компенсаторно.

Гемоглобин A2 отличается от гемоглобина A более медленной миграцией при электрофорезе, на этом основаны методы его определения. Химическая структура полипептидных цепей гемоглобина у гемоглобина A2 характеризуется наличием двух цепей а и двух цепей б (a_2, b_2). Исследование гемоглобина A₂ наиболее информативно при использовании электрофореза на ацетилцеллюлозе (см. исследование белков).

Клиническое значение. Повышение содержания гемоглобина A₂ характерно для р-талассемии; при гетерозиготной форме болезни содержание A₂ составляет 4,2—8,9 %.

Литература. Kunkel H. C., Wallenius G — Science, 1955, vol. 122, p. 288; Singer K., Chernoff A., Singer L. — Blood, 1951, vol. 6, p. 413; Vella F. — Nature, 1959, vol. 184, p. 272.

3.2.3. Патологические формы гемоглобина

К настоящему времени известно, более 200 форм патологических гемоглобинов, отличающихся от нормальных структурой полипептидной цепи глобина, когда одна или несколько аминокислот заменены другими или отсутствуют.

Наиболее частой наследственной патологией является гемоглобинопатия S (серповидноклеточная анемия), которая может быть подтверждена пробами на серповидность эритроцитов (см. 3.3.2). Исследование патологических гемоглобинов является трудоемким и проводится в специализированных лабораториях.

3.3. ЭРИТРОЦИТЫ

Эритроциты — наиболее многочисленные форменные элементы крови, основное содержание которых составляет гемоглобин. Мембрана клеток имеет двойной слой липидных и белковых компонентов и содержит большой набор ферментов. Зрелые эритроциты человека и млекопитающих двояковогнутой формы, не имеют ядра. Эритроциты обладают антигенными свойствами, участвуют в гемостазе, но основная роль их — снабжение тканей кислородом и участие в транспорте углекислоты.

3.3.1. Подсчет количества

В качестве унифицированных методов подсчета эритроцитов в крови приняты два метода: подсчет в счетной камере и в автоматическом счетчике.

Унифицированный метод подсчета в счетной камере (1972). Принцип. Подсчет эритроцитов под микроскопом в определенном количестве квадратов счетной сетки и пересчет на 1 мкл крови, исходя из объема квадратов и разведения крови.

Реактив в ы. 0,9 % раствор хлорида натрия или раствор Гайема: ртуть хлористая 0,5 г, натрия сульфат 5 г, натрия хлорид 1 г, вода дистиллированная до 200 мл.

Специальное оборудование. 1. Счетная камера Горяева. 2. Микроскоп.

Ход исследования. Разводят исследуемую кровь в 200 раз. Для этого в сухую пробирку отмеривают 4 мл реактива 1 или 2. Пипеткой набирают 0,02 мл крови. Кончик пипетки вытирают фильтровальной бумагой или марлей и кровь выдувают на дно пробирки; пипетку тщательно промывают в верхнем слое жидкости, повторно набирая ее и выдувая в пробирку, содержимое пробирки перемешивают и оставляют стоять до момента счета (рекомендуется считать эритроциты в ближайшие 2—3 ч после взятия крови, а при гемолитических и В12-дефицитных анемиях — сразу после взятия, так как эритроциты могут разрушиться). Недопустимо оставлять взятую кровь с несосчитанными эритроцитами на следующий день, так как эритроциты частично разрушаются.

Подготавливают счетную камеру: протирают насухо камеру с сеткой и покровное стекло, затем покровное стекло притирают к камере, слегка надавливая на стекло таким образом, чтобы по краям его появились радужные полосы (это свидетельствует о требуемой высоте камеры — 0,1 мм).

Заполняют счетную камеру разведенной кровью: предварительно несколько раз тщательно встряхивают содержимое пробирки, затем пастеровской пипеткой или стеклянной палочкой отбирают каплю разведенной крови и подносят ее к краю покровного стекла, следя за тем, чтобы она равномерно без пузырьков воздуха заполнила всю поверхность камеры с сеткой, не затекая в бороздки. Заполненную камеру оставляют

в горизонтальном положении 1 мин (для оседания эритроцитов).

Для подсчета эритроцитов, не меняя горизонтального положения камеры, помещают ее на столик микроскопа и с помощью малого увеличения микроскопа (объектив 8X, окуляр 10X) находят верхний левый край сетки (для лучшего контрастирования следует опустить конденсор и прикрыть диафрагму). Счет производят в 5 больших квадратах, разделенных на 16 малых, т. е. в 80 малых квадратах. Рекомендуется считать клетки в квадратах сетки, расположенных по диагонали. Для того чтобы одни и те же эритроциты, лежащие на линиях, не попали дважды в счет, принято для каждого квадрата, кроме элементов, лежащих внутри квадрата, считать расположенные на определенных двух линиях (например, на левой и верхней).

Расчет количества эритроцитов в 1 мкл крови производят, исходя из разведения крови (200), числа сосчитанных квадратов (80) и объема

1 малого квадрата $\left(\frac{1}{40000} \text{ мюл} \right)$, последующей формуле:

$$X = \frac{a \cdot 4000 \cdot 200}{80}$$

где X — число эритроцитов в 1 мкл крови; a — число сосчитанных эритроцитов.

В результате сокращения $X = a \cdot 10\ 000$.

Подсчет эритроцитов в счетной камере является трудоемким и недостаточно точным методом. На результатах подсчета сказываются малейшая неточность при взятии крови в пипетку, неудовлетворительная градуировка пипеток, неравномерное заполнение камеры, любое отклонение от правил подготовки счетной камеры, ее заполнения и подсчета клеток.

Унифицированный метод автоматического подсчета эритроцитов (1972) с помощью счетчика форменных элементов облегчает выполнение этого исследования и делает его более производительным. Отечественный гематологический комплекс КГ-2, а также многочисленные зарубежные образцы — «Пикоскел» (ВНР), «Тиг» (ГДР), «Celloscope» (Швеция), «Cell-Counter» (ФРГ), СС-1006 (Япония) и др. — предусматривают в своей программе подсчет количества эритроцитов в крови.

Помимо счетчиков форменных элементов, подсчет эритроцитов включен в программу всех существующих гематологических автоматов: «SMA-7a», «Гемалог-8» фирмы «Technicon» (США), «Coulter Counter S» фирмы «Coulter-ronics France SA» (Франция) и др.

При использовании счетчиков разведение крови (подготовка пробы для подсчета) осуществляется вручную. При использовании гематологических автоматов отбор пробы крови и ее разведение происходят автоматически.

Принцип работы большинства счетчиков основан на кондуктометрическом методе. Опреде-

ленное количество разведенной изотоническим раствором натрия хлорида или другим электролитом крови пропускают через микроотверстие. Проходящая клетка увеличивает сопротивление между электродами, возникающий импульс передается на счетное устройство с цифровой индикацией.

Ход исследования соответствует инструкции, приложенной к прибору.

Нормальные величины. Количество эритроцитов в крови, по данным В. В. Соколова, а также И. А. Грибовой (1979), составляет $4 \cdot 10^6$ – $5,1 \cdot 10^6$ в 1 мкл ($4 \cdot 10^{12}$ /л– $5,1 \cdot 10^{12}$ /л) у мужчин и $3,7 \cdot 10^6$ – $4,7 \cdot 10^6$ в 1 мкл (или $3,7 \cdot 10^{12}$ /л– $4,7 \cdot 10^{12}$ /л) у женщин.

Клиническое значение. Снижение числа эритроцитов в крови является одним из основных лабораторных критериев анемии. Однако степень эритроцитопении широко варьирует при разных формах малокровия. Так, при наиболее распространенном заболевании — железодефицитной анемии на почве хронических кровопотерь — количество эритроцитов может быть нормальным или несущественно сниженным ($3 \cdot 10^6$ – $3,6 \cdot 10^6$ в 1 мкл, или $3 \cdot 10^{12}$ /л– $3,6 \cdot 10^{12}$ /л). При острой кровопотере, Вп-дефицитной анемии (в стадии рецидива), гипопластической анемии, гемолитических анемиях (в период криза) число эритроцитов в крови может значительно снизиться и достигнуть $1 \cdot 10^6$ в 1 мкл, или $1 \cdot 10^{12}$ /л и менее.

Повышение количества эритроцитов в крови — эритроцитоз — может быть обусловлен многими причинами. Значительный эритроцитоз ($6,5 \cdot 10^6$ – $8,5 \cdot 10^6$ в 1 мкл, или $6,5 \cdot 10^{12}$ /л– $8,5 \cdot 10^{12}$ /л крови) является одним из важных лабораторных симптомов эритремии. Другие гемобластозы миелопролиферативной природы (сублейкемический миелоз или миелофиброз и хронический миелолейкоз) реже сопровождаются эритроцитозом и только в начальной стадии заболевания.

Вторичный (симптоматический) эритроцитоз может сопутствовать широкому кругу различных заболеваний и бывает абсолютным (связанный с усилением нормального эритропоэза) и относительным (гемоконцентрационный). Абсолютные эритроцитозы сопутствуют хроническим obstructивным заболеваниям легких, врожденным порокам сердца, первичной легочной гипертензии, синдрому Пиквика, наследственным гемоглинопатиям, гипернефроидному раку, гемангиобластому мозжечка, гепатоме, гормонально-активным опухолям, заболеваниям, сопровождающимся стенозом почечных артерий, заболеваниями ЦНС и др. Вторичные относительные эритроцитозы связаны с нарушением гемоконцентрации и характеризуются нормальным объемом циркулирующих эритроцитов при снижении массы циркулирующей крови и массы циркулирующей плазмы.

Литература. *Грибова И. А.* Гематологическая норма.— В кн.: Руководство по гематологии / Под ред. А. И. Воробьева, Ю. И. Лорие. М.: Медицина, 1979, с. 53.

3.3.2. Исследование морфологии эритроцитов

Морфологию эритроцитов можно исследовать в световом микроскопе в нативных препаратах и в окрашенных мазках крови. В клинической практике морфологию эритроцитов обычно исследуют в окрашенных мазках крови.

Приготовление мазков крови унифицированным методом (1979). Мазки крови готовят на предметных стеклах, которые предварительно моют и обезжиривают.

Подготовка стекол. Реактивы. 1. Хозяйственное мыло — 2 % раствор или раствор стирального порошка: 20 г растворить в 975 мл воды и добавить 20 мл пергидроля. 2. Смесь Никифорова: равные части этилового спирта % % и диэтилового эфира.

Специальное оборудование не требуется.

Ход обработки стекол. Стекла (новые и бывшие в употреблении) помещают в эмалированную посуду в 2 % раствор хозяйственного мыла или стирального порошка на 8–10 ч. Кипятят в указанном растворе 5–10 мин, старые мазки предварительно стирают ветошью или ватным тампоном. Более длительное кипячение или использование алюминиевой посуды не рекомендуют, так как стекла мутнеют. Промывают в проточной воде. Насухо вытирают и помещают в смесь Никифорова на 30–60 мин. Насухо вытирают чистым полотенцем и хранят в широкогорлой чистой посуде с притертой пробкой. Чистые стекла рекомендуют брать либо пинцетом, либо за края (соприкосновение пальцев с поверхностью стекла оставляет жирные следы).

Техника приготовления мазков. На сухое подготовленное описанным выше способом предметное стекло наносят мазок крови следующим образом. На стекло ближе к короткой стороне наносят стеклянной палочкой (или непосредственно из места укола пальца) небольшую каплю крови. Оставляют стекло в горизонтальном положении и размазывают каплю крови по стеклу с помощью чистого шлифованного стекла, помещая его под углом 45°; коротким ребром, подождав, пока вся кровь расплывется по нему, быстро проводят по предметному стеклу. Не следует сильно нажимать на стекло, так как при этом травмируются форменные элементы крови.

Мазки высушивают на воздухе и маркируют (лучше простым карандашом). Высохший мазок должен быть равномерно тонким, желтоватого цвета, достаточной величины (располагаться на 1–1,5 см от краев, занимать почти всю длину стекла) и оканчиваться «метелочкой». Толстые (густо-розового цвета) мазки не следует использовать, так как в них морфология клеток плохо различима.

Более качественные мазки крови получают при использовании автоматических устройств: «Hemarep» фирмы «Oplon» (ФРГ), «Slide Spinner» фирмы «Corning Scientific Instruments» (США) и др., предназначенных для приготовления мазков. Благодаря такому устрой-

ству мазки получаются равномерные и имеют стандартные размер и толщину.

Фиксация и окраска мазков унифицированным методом (1979). В качестве унифицированных приняты методы окраски по Нохту и Паппенгейму.

Реактивы для фиксации: метиловый спирт х. ч. или раствор эозинметиленового синего по Маю — Грюнвальду.

Реактивы для окраски мазков по Нохту. 1. Основной раствор азура II: 1 г краски растворяют в 1000 мл дистиллированной воды. Оставляют в посуде из темного стекла на 12—14 дней при комнатной температуре, после чего используют. 2. Основной раствор эозина калия: 1 г краски растворяют в 1000 мл дистиллированной воды. Оставляют в посуде из темного стекла при комнатной температуре на 12—14 дней, затем используют. 3. Фосфатный буфер (смесь Вейзе) pH 7,4—7,5: смешивают 0,49 г калия фосфата однозамещенного безводного (KH_2PO_4) и 0,909 г натрия фосфата двузамещенного безводного. (Na_2HPO_4 и дистиллированной воды 1000 мл. 4. Рабочий раствор азур-эозина: перед употреблением смешивают 25 мл основного раствора азура II, 20 мл основного раствора эозина калия и 55 мл буферного раствора (пропорции красителей могут варьировать, их устанавливают опытным путем при приготовлении свежих партий основных растворов).

Реактивы для окраски мазков по Паппенгейму. 1. Раствор эозин-метиленового синего по Маю — Грюнвальду. При отсутствии готового раствора красителя его можно приготовить, растворив 1 г сухого красителя в 1000 мл метилового спирта. Раствор готов к употреблению через 4 дня. 2. Рабочий раствор азур-эозина по Нохту.

Специальное оборудование. Кювета для фиксации и окраски мазков со штативом-контейнером (при отсутствии используют эмалированные лотки с установленными для стекол «рельсами» из пары стеклянных палочек, соединенных резиновыми трубками).

Фиксация мазков. Фиксатор мазков наливают либо в кювету, либо в широкогорлую посуду с притертой пробкой. Высушенные на воздухе мазки помещают в контейнер, который опускают в кювету с фиксатором (или кладут по одному в посуду) на 5—10 мин. Вынимают контейнер со стеклами из кюветы (или вынимают пинцетом стекла и устанавливают в штативе), оставляют на воздухе до полного высыхания.

Окраска по Нохту. Высохшие фиксированные мазки, не вынимая из контейнера, помещают в кювету с рабочим раствором краски на строго определенное время, подобранное для каждой партии красителя (от 20 до 45 мин). При отсутствии кюветы с контейнером стекла помещают горизонтально на «рельсы» (мазком кверху) и наливают высокий слой (3—4 мл на мазок) рабочего раствора краски. Вынимают контейнер со стеклами из кюветы с красителем и помещают его в кювету с водопроводной водой (при отсутствии кюветы краску со стекол смывают, не снимая их с «рельсов», водопроводной водой). Высушивают мазки на воздухе.

Окраска по Паппенгейму. Сухие нефиксированные мазки помещают в кювету с раствором Мая—Грюнвальда на 3—5 мин (или наливают на мазок, помещенный на «рельсы» высоким слоем). Контейнер с мазками ополаскивают в кювете с дистиллированной водой (или на мазок, помещенный на «рельсы», не сливая краситель, добавляют дистиллированную воду на 1 мин). Помещают контейнер с мазками в кювету с азур-эозиновой краской по Нохту (или наливают на мазок краску) на 8—15 мин. Смывают краску водопроводной водой. Мазки высушивают на воздухе.

Окраска по Романовскому—Гимзе производится так же, как и по Нохту; в качестве красителя используют готовый раствор Романовского—Гимзы, который перед употреблением разводят из расчета 1 капля краски на 1 мл дистиллированной воды. Время окраски устанавливают опытным путем для каждой новой партии красителя (25—40 мин).

Автоматическая окраска мазков может быть осуществлена с помощью специальных устройств: «Nematek» фирмы «Ames» (США), WL-600 фирмы «Veb Kombinat Medirin und Labortechnik» (ГДР) и др., в которые ручным способом загружают нефиксированные мазки. Последующее автоматическое дозирование красителей и буферных растворов обеспечивает стандартную и равномерную окраску мазков.

Исследование морфологии эритроцитов. Принцип. Исследование окрашенных мазков крови с помощью иммерсионной системы микроскопа.

Специальное оборудование. Микроскоп.

Реактивы. 1. Иммерсионное масло. 2. Диэтиловый эфир.

Ход исследования. Предметное стекло с окрашенным, высохшим на воздухе мазком крови помещают на столик микроскопа и с помощью малого увеличения (окуляр 7X, объектив 8X) находят край мазка. Не меняя положения стекла, наносят каплю иммерсионного масла на край мазка на место, расположенное под объективом. Переводят иммерсионный объектив в положение, вертикальное к мазку, при этом объектив погружается в каплю масла.

Осторожно слегка вращают макровинт до появления изображения в поле зрения микроскопа. Затем с помощью микровинта устанавливают четкую видимость препарата (критерием правильно подобранного для каждого глаза фокусного расстояния будет ясное изображение клеток с четкими границами и внутриклеточной структурой). После установки микроскопа приступают к исследованию морфологии эритроцитов, обращая внимание на форму, размеры клеток, интенсивность их окраски, наличие внутриклеточных включений и пр. Поскольку клетки имеют определенный объем, для лучшего их рассмотрения надо постоянно менять фокусное расстояние с помощью микровинта.

Для получения полного представления о морфологии эритроцитов необходимо просмотреть несколько полей зрения, передвигая мазок либо

Т а б л и ц а 24. Характеристика эритроцитов при некоторых формах анемий

Формы анемий	Цветовой показатель	Эритроциты			Ретикулоциты	Ядерные формы
		форма	диаметр	объем		
Железодефицитные	Гипохромия	Пойкилоциты	Микроциты	Нормальный или снижен	Нормальные или снижены	Отсутствуют
В ₁₂ - и фолиеводефицитные	Гиперхромия	>	Макроциты, мегалоциты	Резко повышен	Снижены	Часто мегалобласты, нормобласты
Гипопластические	Нормохромия	>	Макроциты	Нормальный или повышен	Резко снижены	Часто нормобласты
Гемолитические: наследственный	>	Сфероциты	Микроциты	Повышен	Резко повышены	То же
ми кроксе роцитоз талассемия	Гипохромия	Мишеневидные	»	Снижен	Повышены	Единичные нормобласты

рукой, либо с помощью крестообразного устройства. Рассматривать морфологию эритроцитов надо только в тонких мазках, где эритроциты расположены одиночно, не образуют «монетных столбиков».

По окончании микроскопии с помощью макровиты поднимают тубус микроскопа, снимают стекло с предметного стекла, стирают масло с иммерсионного объектива и предметного стекла марлей, смоченной эфиром,

У здоровых людей эритроциты имеют примерно одинаковый размер. Для более точного представления о размере клеток проводят эритроцитометрию — измерение диаметра эритроцитов (см. 3.3.3). Эритроцит имеет форму двояковогнутого диска. В окрашенных препаратах эритроциты круглой формы, розового цвета. Оксифилия клетки обусловлена присутствием гемоглобина, поэтому по интенсивности окраски можно судить о степени насыщенности эритроцитов гемоглобином. Эритроциты здоровых людей имеют равномерную окраску и небольшое просветление в центре (нормохромия).

Клиническое значение. Изменения морфологии эритроцитов в виде появления эритроцитов разного размера (анизоцитоз), разной формы (пойкилоцитоз), разной окраски (анизохромия) являются важными морфологическими симптомами различных форм анемии.

Наиболее часто наблюдается бледная окраска эритроцитов с более широкой неокрашенной центральной частью — *гипохромия* эритроцитов, которая обусловлена низким насыщением эритроцита гемоглобином и характерна для распространенных форм малокровия, связанных с дефицитом железа (постгеморрагические анемии, анемии беременных, при опухолях, сепсисе и других тяжелых инфекционных заболеваниях, заболеваниях желудочно-кишечного тракта и пр.). При этом гипохромия, как правило, сочетается с уменьшением размера эритроцитов —

микроцитозом (табл. 24). Гипохромия эритроцитов сопутствует и более редким формам малокровия, не связанным с дефицитом железа; свинцовому отравлению, талассемии и другим наследственным повреждениям эритроцитов. Следует иметь в виду, что гипохромия эритроцитов может наблюдаться не только при снижении концентрации гемоглобина и числа эритроцитов в крови, но и при нормальных количественных показателях. Реже встречается усиленная окраска эритроцитов — *гиперхромия*, связанная с повышенным насыщением эритроцитов гемоглобином и сочетающаяся с увеличенным их размером — макроцитозом, мегалоцитозом. Эти изменения эритроцитов характерны для дефицита таких факторов кроветворения, как витамин В₁₂, фолиевая кислота, и наблюдаются при анемии Аддисона — Бирмера, дифиллоботриозе, органических заболеваниях желудка, кишечника, алкоголизме, беременности и др.

Изменение окраски в виде *полицхроматофилии* (эритроциты сероватого цвета) обусловлено окраской кислыми и основными красителями. В норме встречаются единичные полицхроматофильные эритроциты. Их число повышается при усиленном эритропоэзе (постгеморрагические анемии, гемолитические анемии и др.).

При талассемии и других формах малокровия встречаются так называемые *мишеневидные* эритроциты — с окрашенным участком в центре клетки на фоне неокрашенной зоны.

Появление *базофильной пунктации* в эритроцитах связано с патологическим кроветворением и характерно для свинцового отравления, но встречается при других формах анемии. *Эритроциты с ядром* — нормобласты, эритробласты — встречаются в мазках крови при различных анемиях. Большое количество нормобластов характерно для гемолитических анемий, метастазов опухоли в костный мозг. Гигантские ядерные эритроциты — *мегалобласты* — свидетельствуют

о патологическом кроветворении, связанном с дефицитом витамина В12, фолиевой кислоты. При этих же состояниях наблюдаются и эритроциты с остатками ядер — кольца Кебота, тельца Жолли. Последние формы постоянно обнаруживают в мазках крови У больных после удаления селезенки.

Шаровидная форма эритроцитов, отличающаяся уменьшенным диаметром и интенсивной, без просветлений окраской, — микросфероцитоз — является патогномоичным морфологическим признаком гемолитической анемии — наследственного микросфероцитоза (см. табл. 24). В небольшом количестве микросфероциты могут встречаться и при других гемолитических анемиях.

Большое диагностическое значение имеет обнаружение в мазках крови *эритроцитов серповидной формы*. Этот симптом характерен для серповидноклеточной анемии, относящейся к группе наследственных гемоглобинопатии (S-гемоглобиноз).

В сомнительных случаях, когда число серповидных эритроцитов в мазках невелико, следует проводить пробы на серповидность эритроцитов, основанные на использовании веществ (метабисульфит натрия, янусовый зеленый, метиленовый синий), понижающих содержание кислорода в препаратах.

На стекле смешивают каплю крови и каплю одного из указанных веществ, накрывают покровным стеклом. Просматривают под микроскопом через 10—15 мин, затем 24—48 ч. В положительных случаях в препаратах количество эритроцитов серповидной формы увеличивается.

Литература. Циркина А. С.— В кн.; Справочник по клиническим лабораторным методам исследования/Под ред. Е. А. Кост. 2-е изд.— М.: Медицина, 1975, с. 17.

3.3.3. Эритроцитометрия (измерение диаметра эритроцитов)

Унифицированный микроскопический метод помощью окуляр-микрометра (1972). Принцип. Измерение диаметра эритроцитов в окрашенном мазке крови с помощью окуляр-микрометра.

Специальное оборудование. 1. Микроскоп. 2. Окуляр-микрометр — окуляр, насаживаемый на тубус микроскопа, с круглой стеклянной пластинкой и нанесенной на ней шкалой, разделенной на 50 делений. 3. Объект-микрометр — предметное стекло со шкалой длиной 2 мм, разделенной на 200 делений (каждое деление 10 мкм).

Ход определения. Перед началом работы определяют цену одного деления шкалы окуляр-микрометра, которая зависит от длины тубуса микроскопа и увеличения объектива. Определение проводят с помощью объект-микрометра, который устанавливают на столик микроскопа таким образом, чтобы шкалы окуляр-микрометра и объект-микрометра сбывались. Затем отсчитывают число делений шкалы окуляр-мик-

рометра, совпадающих с тем или иным количеством делений шкалы объект-микрометра, и определяют цену одного деления. Например: 40 делений шкалы окуляр-микрометра совпали с 6 делениями объект-микрометра, т. е. соот-

ветствуют $60 \frac{60}{40} = 1,5$ мкм. Это определение проводят один раз для определенного микроскопа, с помощью которого в дальнейшем производят эритроцитометрию.

На сухой окрашенный мазок наносят каплю иммерсионного масла, погружают в нее иммерсионный объектив и микроскопировать с максимально освещенным полем зрения.

В тонком месте мазка (где эритроциты расположены изолированно) измеряют диаметр не менее 100 эритроцитов, отмечая, какое количество делений шкалы окуляр-микрометра укладывается в эритроцит. Отмечают результат измерения каждого эритроцита (удобно пользоваться 11-клавишным счетчиком, условно используя разные клавиши для определенного числа делений шкалы).

Зная цену одного деления и количество эритроцитов с одинаковым числом делений, выражают результат в процентах.

Пример: эритроциты с диаметром 4,5 мкм — 5 %, 6 мкм — 10 %, 7,5 мкм — 70 %, 9 мкм — 11 %, 10,5 мкм — 4 %. Результат можно представить и в виде эритроцитометрической кривой (кривая Прайс-Джонса), при этом на оси абсцисс откладывают диаметр в микронах, а на оси ординат — процент эритроцитов. При необходимости результат выражают в виде среднего диаметра эритроцитов (см. 3.3.5).

Определение с помощью счетного аппарата. В счетном аппарате «Целлоскоп» и др. можно подсчитать число частиц определенного размера в 1 мкл жидкости.

Принцип. Подсчет эритроцитов разного диаметра в 1 мкл крови с помощью дискриминатора и при необходимости построение эритроцитометрической кривой.

Ход определения соответствует инструкции, приложенной к прибору.

При сопоставлении эритроцитометрических кривых, построенных после подсчета в аппарате и с помощью окуляр-микрометра у здоровых людей, обнаружено их совпадение. При патологии, особенно при различных анемиях, циррозах печени, гемолитических кризах, выявлены различия в форме и высоте кривых. Это может быть связано прежде всего с тем, что эритроцитометрическая кривая после использования окуляр-микрометра выведена на 100 эритроцитов, а в счетном аппарате — на абсолютные величины эритроцитов в 1 мкл крови; кроме того, не исключено, что при патологии в морфологически измененных эритроцитах изменяются свойства электропроводности, на принципе которой основано исследование эритроцитов во многих счетных приборах.

Нормальные величины. У здоровых нормоциты (эритроциты диаметром 7,5 мкм) составляют $68 \pm 0,4\%$, микроциты (диаметр 6,9 мкм и меньше) — $15,3 \pm 0,42\%$ и макроциты (диаметр 8 мкм и больше) — $16,9 \pm 0,47\%$.

Клиническое значение. Результаты эритроцитометрии являются важными для уточнения характера анемии (см. табл. 24). При железодефицитной анемии, как правило, имеют место микроцитоз эритроцитов до 30–50 % и соответственно сдвиг эритроцитометрической кривой влево. Увеличение процента микроцитов наблюдается также при наследственном микросфероцитозе, талассемии, свинцовом отравлении. Увеличение числа макроцитов является признаком макроцитарной анемии, наблюдающейся при В₁₂-дефицитных и фолиеводефицитных состояниях. Количество макроцитов при этих анемиях может достигать 50 % и более, при этом в небольшом числе (1–3 %) обнаруживают и мегалоциты (эритроциты с диаметром 12 мкм и более). Макроцитоз эритроцитов может наблюдаться независимо от анемии при алкоголизме, диффузных поражениях печени.

Литература. Гольдберг Д. И., Гольдберг Е. Д. Справочник по гематологии. 6-е изд.— Томск, 1980, с. 72.

3.3.4. Общий объем эритроцитов (гематокритная величина)

Гематокритная величина, или показатель гематокрита, дает представление о соотношении между объемами плазмы и форменных элементов крови (главным образом эритроцитов), полученном после центрифугирования крови. Принято гематокритной величиной выражать объем эритроцитов. В качестве унифицированных методов определения гематокритной величины (гематокрита) утверждены два метода: с помощью микроцентрифуги и микрометод в модификации И. Тодорова.

Унифицированный метод с помощью микроцентрифуги (1979). Принцип. Центрифугирование крови определенное время при постоянном числе оборотов центрифуги с последующим определением результата по специальной шкале.

Реактивы. Антикоагулянты: гепарин — 5000 ЕД/мл разводят дистиллированной водой в соотношении 1 : 5 или этилендиаминтетрауксусной кислоты динатриевая соль (ЭДТА Na₂, трлон Б), 40 г/л.

Оборудование. 1. Микроцентрифуга МЦГ-8. 2. Капиллярные трубки (в комплекте с центрифугой). Можно использовать капилляры для определения С-реактивного белка.

Ход определения. Предварительно обработанный антикоагулянт и высушенный капилляр заполняют кровью из пальца (или венозной) на $\frac{1}{8}$ длины. Укупоривают капилляр с одного конца специальной пастой (можно пластилином). Помещают в ротор центрифуги так, чтобы укупоренные концы упирались в резиновую прокладку, и центрифугируют 5 мин при 8000 об/мин. По отсчетной шкале, приложенной к центрифуге МЦГ-8, определяют гематокритную величину.

Унифицированный микрометод (модификация Я. Тодорова) (1979). Принцип. Центрифугирование крови определенное время при постоянном числе оборотов центрифуги с после-

дующим определением результата по градуированным капиллярам.

Реактивы те же.

Оборудование. 1. Центрифуга. 2. Пипетки от аппарата Панченкова (с отрезанным верхним концом и длиной 10–11 см).

Ход определения. В обработанную антикоагулянт и высохшую пипетку набирают кровь из пальца (или венозную) до верхней метки (100 делений). Пипетку укупоривают, обтягивая ее резиновым кольцом, и центрифугируют 30–40 мин при 3000 об/мин. Результат отмечают по градуировке капилляра, вычитая из 100 высоту столбика эритроцитов.

Определение с помощью автомата. Исследование гематокрита входит в программу всех известных гематологических автоматов и многих счетных приборов.

Принцип. В автоматах используется кондуктометрический метод (автомат SMA-7a) либо центрифужный метод (автомат «Гемалог-8»). В некоторых автоматах и счетных приборах гематокрит определяют расчетным путем, исходя из количества эритроцитов в 1 мкл крови и среднего объема одного эритроцита в 1 мкм³.

Ход исследования соответствует инструкции, приложенной к прибору.

Нормальные величины. У здоровых гематокрит венозной и капиллярной крови равен 40–48 % (или 0,40–0,48) для мужчин и 36–42 % (или 0,36–0,42) для женщин.

Клиническое значение. Показатель широко используют для суждения о степени анемии, при которой, как правило, отмечается его снижение, иногда до значительных цифр (20–25%). Выраженное повышение (55–65%) характерно для эритремии, менее резкое увеличение (50–55 %) наблюдается при симптоматических эритроцитозах, сопутствующих врожденным порокам сердца, легочной недостаточности, некоторым гемоглобинопатиям. Показатель гематокрита дает представление о гемоконцентрационных сдвигах, он снижается при гемодилузии. Используют гематокрит для расчетных показателей, отражающих различные характеристики эритроцитов: средний объем, средняя концентрация гемоглобина (см. ниже), а также для ряда биохимических показателей.

Литература. Тодоров Я. Клинические лабораторные исследования в педиатрии. 3-е изд.— София, 1961, с. 263.

3.3.5. Индексы эритроцитов

В клинической практике используют различные расчетные характеристики, отражающие физико-химические свойства эритроцитов. Наиболее широко применяют расчет цветового показателя.

Цветовой показатель. Индекс отражает относительное содержание гемоглобина в эритроцитах. Вычисляют цветовой показатель определением отношения двух частных, полученных от деления количества гемоглобина на количество эритроцитов в норме и в исследуемой крови по следующей формуле:

$$\frac{X_{\text{гем}}}{N_{\text{гем}}} : \frac{X_{\text{эр}}}{N_{\text{эр}}},$$

где $X_{\text{гем}}$ — найденное количество гемоглобина; $N_{\text{гем}}$ — нормальное количество гемоглобина; $X_{\text{эр}}$ — найденное количество эритроцитов; $N_{\text{эр}}$ — нормальное количество эритроцитов.

Если принять, что в норме в 100 мл крови содержится 16,7 % гемоглобина и 5 000 000 эритроцитов в 1 мкл крови, то рассчитывают по формуле:

$$\frac{X_{\text{гем}}}{16,7} : \frac{X_{\text{эр}}}{5\,000\,000}$$

$$\text{Цветовой показатель} = \frac{X_{\text{гем}} \cdot 5\,000\,000}{X_{\text{эр}} \cdot 16,7};$$

$$\text{при сокращении: } \frac{X_{\text{гем}} \cdot 3}{\text{Первые 2 цифры } X_{\text{эр}}}$$

В практической работе удобно пользоваться для подсчета цветового показателя пересчетными таблицами, а также номограммами.

Нормальные величины. У здоровых цветовой показатель находится в пределах 0,86—1,05.

Клиническое значение. По величине цветового показателя принято делить анемии на гипохромные, иормохромные и гиперхромные. Гипохромные анемии (с цветовым показателем менее 0,86) широко распространены и наблюдаются прежде всего при дефиците железа, вызванном различными причинами. Особенно выраженной гипохромией (0,6—0,5 и ниже) характеризуются железodefицитные анемии, обусловленные хроническими кровопотерями.

Менее выраженная гипохромия эритроцитов (0,7—0,8) наблюдается при железodefицитной анемии беременных, при инфекциях, опухолях. Редко встречаются гипохромные анемии, не связанные с дефицитом железа и обусловленные нарушением синтеза гемоглобина в результате свинцового отравления или наследственного повреждения синтеза порфиринов и цепей глобина (б-талассемии, а-талассемии и др.).

Повышение цветового показателя — гиперхромия — является характерным лабораторным признаком различных Виг-дефицитных и фолиеводефицитных анемий. Особенно выражена гиперхромия эритроцитов (1,2—1,3) при рецидиве анемии Аддисона — Бирмера. Нормохромные анемии наблюдаются при некоторых гемолитических формах малокровия, острых кровопотерях, лейкозах, сопутствуют циррозу печени.

Среднее содержание гемоглобина в эритроците. Показатель отражает абсолютное содержание гемоглобина в одном эритроците в пикограммах (пг). Определяют путем деления кон-

центрации гемоглобина в 1 мкл крови на число эритроцитов в том же объеме.

Пример: концентрация гемоглобина в крови равна 12 г/100 мл, количество эритроцитов в 1 мкл крови — 4 000 000 .

$$12 \text{ г } \% = 12000 \text{ мг}/100 \text{ мл} = 12 \text{ мг в } 1 \text{ мкл} = 120\,000\,000 \text{ пг} \left(1 \text{ пг} = \frac{1}{1\,000\,000\,000} \text{ мг} \right).$$

$$\text{Среднее содержание гемоглобина} = \frac{120\,000\,000 \text{ пг}}{4\,000\,000} = 30 \text{ пг, т. е. практически}$$

надо содержание гемоглобина в г/100 мл умножить на 10 и разделить на число миллионов эритроцитов в крови. Расчет показателя можно произвести по номограмме (по Мазону). В современных гематологических автоматах этот показатель (МСН)¹ определяют расчетным путем.

Нормальные величины составляют 24—33 пг. Клиническое значение. Снижение отражает гипохромия и наблюдается при железodefицитных анемиях, повышение имеет место при макроцитарных и особенно мегалоцитарных анемиях.

Литература. Тодоров Я. Клинические лабораторные исследования в педиатрии. 3-е изд., русск.—София, 1961, с. 272.

Средняя концентрация гемоглобина в эритроците. Показатель отражает степень насыщения эритроцита гемоглобином в процентах. Вычисляют путем деления концентрации гемоглобина в г/100 мл на гематокритную величину и умножения на 100.

Пример: концентрация гемоглобина 12 г/100 мл, гематокрит 40 об. %.

$$\text{Средняя концентрация гемоглобина} \\ (\text{МСНС})^2 = \frac{12}{40} \cdot 100 = 30 \text{ \%}.$$

Можно легко рассчитать, используя номограмму по Мазону (рис. 6). Показатель включен в программу современных гематологических автоматов.

Нормальные величины. МСНС колеблется в пределах 30—38 %. Величина наиболее константная, насыщения выше 38 % не бывает.

Клиническое значение. Снижение показателя отражает абсолютную гипохромия и является характерным для железodefицитных анемий. Чувствительность этого индекса эритроцитов при железodefицитных анемиях составляет 85 %. Снижение показателя выявлено также при макроцитарных и особенно мегалоцитарных анемиях, когда объем эритроцитов увеличен непропорционально более значительно по сравнению с увеличением насыщения эритроцитов гемоглобином.

¹ Для выявления гипохромии необходимым условием является правильный подсчет числа эритроцитов в крови.

¹ МСН — Mean Corpuscular Hemoglobin.
² МСНС — Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration.

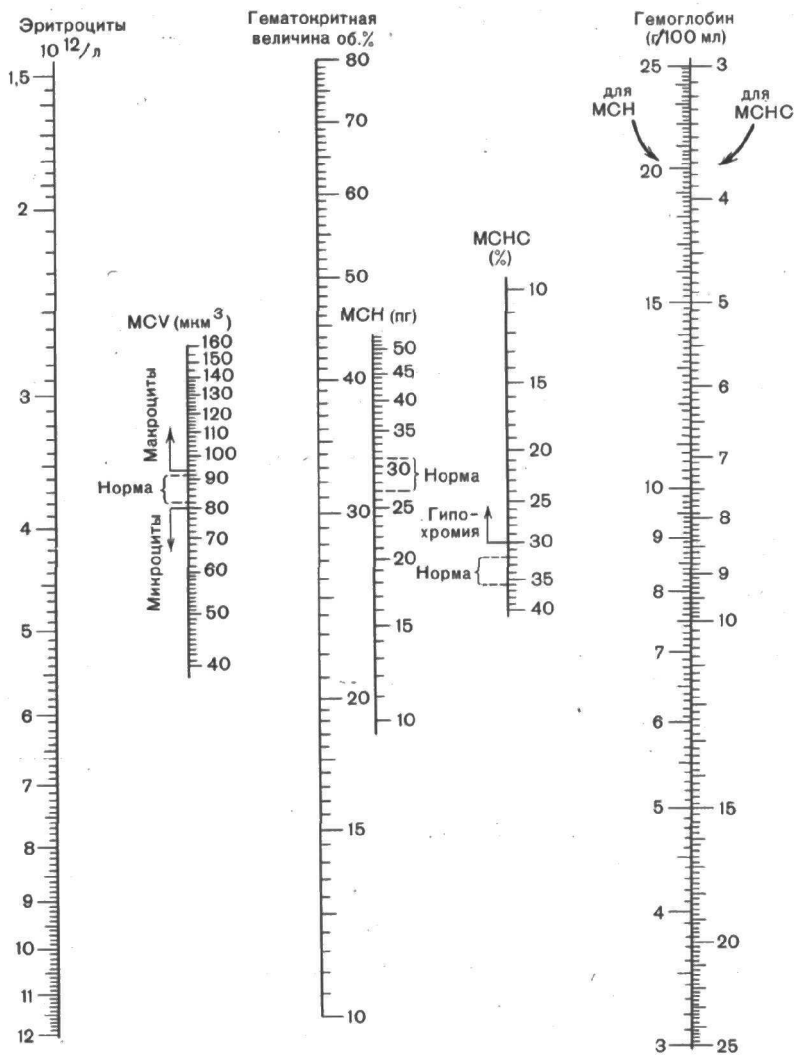


Рис. 6. Номограмма для вычисления индексов эритроцитов по Мазону [из кн.: *М. М. Wintrobe. Clinical Hematology. Ed. 4.—Philadelphia: Lea Fiebiger, 1956*]. Объяснение в тексте.

Литература. *Тодоров И.* Клинические лабораторные исследования в педиатрии.— София, 1966, с. 341.

Средний объем эритроцитов. Показатель является важным при диагностике различных форм малокровия. Вычисляются путем деления гематокритной величины на общее количество эритроцитов в крови. Средний объем эритроцитов (MCV) выражают в кубических микронах или кубических микрометрах.

Пример: гематокрит — 40 об.% (или 0,40 мм³, или 400000000 мкм³); эритроциты 4 500 000 в 1 мкл;

MCV — Mean corpuscular Volume.

$$MCV = \frac{400\,000\,000 \text{ мкм}^3}{4\,500\,000} = \frac{4000}{45} = 88 \text{ мкм}^3.$$

Практически для вычисления показателя надо величину гематокрита разделить на число эритроцитов в миллионах и умножить на 10.

Можно расчет вести по номограмме.

В программе современных гематологических комплексов и автоматов этот параметр определяют либо кондуктометрически (отечественный гематологический комплекс КГ-2), либо расчетным путем.

Нормальные величины составляют 75—95 мкм³.

Клиническое значение. Повышение показателя наблюдается при наследственном микросфероцитозе, макроцитарных и мегалоцитарных анемиях, особенно высокое значение (более 130 мкм³) выявлено при В12-дефицитных анемиях. Объем эритроцитов часто увеличен при диффузных поражениях печени, алкоголизме. Снижение наблюдается при микроцитарных анемиях, талассемии.

Литература. Тодоров И. Клинические лабораторные исследования в педиатрии.— София, 1966, с. 341.

Средний диаметр эритроцитов. Вычисляют из результатов эритроцитометрии путем умножения каждого процента клеток с определенным диаметром на его значение в мкм, суммированием этих произведений и делением на 100.

Пример: при эритроцитометрии 100 эритроцитов выявлено 10 % эритроцитов с диаметром 6 мкм, 70 % — с диаметром 7,5 мкм и 20 % — с диаметром 9 мкм.

Средний диаметр эритроцитов (СДЭ) вычисляют следующим образом:

$$\begin{aligned} \text{СДЭ} &= \frac{(10 \cdot 6) + (70 \cdot 7,5) + (20 \cdot 9)}{100} = \\ &= \frac{60 + 525 + 180}{100} = \frac{765}{100} = 7,65 \text{ мкм.} \end{aligned}$$

Нормальные величины СДЭ 7,55±0,009 мкм.

Клиническое значение. Показатель значительно менее информативен, чем развернутые данные эритроцитометрии. Снижение СДЭ наблюдается при резко выраженных железодефицитных анемиях, повышение — при рецидиве анемии Аддисона — Бирмера и других В12-дефицитных анемиях.

3.3.6. Ретикулоциты

Ретикулоциты — молодые эритроциты, образующиеся после потери нормобластами ядер. Характерной особенностью ретикулоцитов является наличие в цитоплазме зернисто-нитчатой субстанции, представляющей агрегированные рибосомы и митохондрии. Эта субстанция выявляется при специальном методе окраски — суправитальном, т. е. без предварительной фиксации клеток. Зернисто-нитчатая субстанция в различных ретикулоцитах отличается полиморфизмом; чем клетка моложе, тем субстанция более обильная. У самых молодых ретикулоцитов она имеет форму густого клубка, у более зрелых клеток выявляется в виде сеточки, отдельных нитей и затем отдельных зерен. В мазках, окрашенных обычными гематологическими методами, ретикулоциты серовато-розового цвета — полихромотофильны, т. е. окрашены разными красителями.

Определение количества ретикулоцитов производится при микроскопии специально окрашенных мазков.

Унифицированный метод подсчета количества ретикулоцитов после окраски их бриллиантовым кризольным синим, азуром I или азуром II

непосредственно на стекле или в пробирке (1972). Принцип. Суправитальная окраска красителями, выявляющими зернисто-нитчатую субстанцию ретикулоцитов.

Реактивы. Можно использовать один из следующих красителей.

1. Насыщенный раствор бриллиантового кризольного синего в абсолютном спирте (для приготовления абсолютного спирта надо выдержать этанол 96 % в нескольких смесях прокаленного порошка медного купороса). На 100 мл абсолютного спирта берут 1,2 г краски.

2. Раствор азур I, предложенный П. Н. Кориковым: азур I — 1 г, аммония оксалат — 0,4 г, натрия хлорид — 0,8 г, этиловый спирт 96 % — 10 мл, дистиллированная вода — 90 мл. Раствор краски в закрытом флаконе помещают на 2—3 дня в термостат при 37 °С и периодически энергично взбалтывают. Затем охлаждают до комнатной температуры и фильтруют через бумажный фильтр. Раствор сохраняют в посуде из темного стекла. При появлении осадка краску следует снова профильтровать.

3. Раствор азур II следующего состава: азур II — 1 г, натрия цитрат — 5 г, натрия хлорид — 0,4 г, дистиллированная вода — 45 мл. Раствор оставляют в термостате при 37 °С на 2 сут, периодически помешивая. Для ускорения растворения краску можно прогреть на слабом огне в течение 15—20 мин, не доводя до кипения. Охлаждают до комнатной температуры и фильтруют.

Хранят в посуде из темного стекла.

Специальное оборудование. Микроскоп.

Ход определения. *Окраска на стекле.* Хорошо вымытое и обезжиренное предметное стекло подогревают над пламенем горелки. Стеклой палочкой наносят на стекло каплю одного из красителей и готовят мазок из краски шлифованным стеклом. Маркируют сторону стекла, на которую нанесен мазок краски, стеклоглафом. В таком виде стекла можно заготовить впрок и хранить в сухом темном месте. Наносят каплю крови на мазок краски, готовят из нее тонкий мазок и тотчас помещают во влажную камеру на 3—4 мин (можно пользоваться чашкой Петри с уложенными по краям валиками смоченной ваты или фильтровальной бумаги). Затем высушивают мазки на воздухе.

В приготовленных таким образом мазках эритроциты окрашены в желтовато-зеленоватый цвет, зернисто-нитчатая субстанция — в синий цвет.

Окраска в пробирке. Метод 1: перед употреблением готовят в пробирке рабочий раствор бриллиантового кризольного синего из расчета на каплю 1 % раствора оксалата калия 4 капли раствора краски I. В краску добавляют 0,04 мл крови (две пипетки до метки 0,02). Смесь тщательно, но осторожно перемешивают и оставляют на 30 мин. Перемешивают и готовят тонкие мазки.

Метод 2: в пробирку помещают 0,05 мл раствора краски 3 и 0,2 мл крови. Смесь тщательно перемешивают и оставляют на 20—30 мин. Перемешивают и готовят тонкие мазки.

Метод 3: в пробирку помещают 0,3–0,5 мл раствора краски 2 и 5–6 капель крови пипеткой от аппарата Паиченкова. Пробирку закрывают резиновой пробкой, смесь тщательно, но осторожно перемешивают и оставляют на 1–1/2 ч (лучше окрашиваются ретикулоциты при экспозиции 1 1/2–3 ч). Перемешивают и готовят тонкие мазки.

Подсчет ретикулоцитов. В мазках эритроциты окрашены в желтовато-зеленоватый цвет, зернисто-нитчатая субстанция — в синий или синеваато-фиолетовый цвет.

Приготовленные одним из указанных выше способов мазки микроспируют с иммерсионным объективом. Необходимо подсчитать не менее 1000 эритроцитов и отметить среди них количество эритроцитов, содержащих зернисто-нитчатую субстанцию. Практически для большей точности пользуются специальным окуляром, в котором можно уменьшить поле зрения до требуемых размеров. При равномерных тонких мазках, в которых эритроциты расположены в один ряд, подбирают такое поле зрения, в котором имеется, например, 50 эритроцитов, и затем прочитывают 20 таких полей зрения.

При отсутствии готового окуляра его можно легко приготовить, для чего отвинчивают окуляр 7X, вкладывают в него кусок бумаги с вырезанным небольшим квадратиком и завинчивают. Количество подсчитанных ретикулоцитов выражают на 1000 или на 100 эритроцитов.

Подсчет количества ретикулоцитов при помощи люминесцентной микроскопии. Принцип. Использование способности субстанции ретикулоцитов флуоресцировать после обработки крови акридиновым оранжевым.

Реактивы. 1. Раствор акридинового оранжевого на изотоническом растворе хлорида натрия и концентрации 1 : 5000. Для приготовления изотонического раствора рекомендуют использовать дистиллированную воду рН 5,8–6,8. Раствор акридинового оранжевого должен быть свежим; хранят его не более 3–5 дней в темном флаконе с притертой пробкой. 2. Нефлуоресцирующее иммерсионное масло. Можно использовать афлуоль или обычное иммерсионное масло с флуоресценцией, погашенной нитробензолом (0,3 мл нитробензола на 1 мл масла). Ю. Н. Зубжицкий в качестве нефлуоресцирующего масла предлагает использовать перегнанный анизол.

Специальное оборудование. Микроскоп ультрафиолетовый МУФ-3М или люминесцентный.

Ход определения. Кровь смешивают с акридиновым оранжевым в пробирке или смеси-теле в соотношении 1 часть крови и 10 частей краски (смесь можно хранить не более 5 ч). Смесь перемешивают в течение 2 мин, каплю смеси наносят на предметное стекло и накрывают покровным стеклом. Микроспируют с помощью светофильтра ЖС-17. В препарате эритроциты не флуоресцируют, а в ретикулоцитах зернисто-нитчатая субстанция светится ярко-красным цветом. Замечено, что в крови, стабилизированной гепарином или цитратом натрия, флуоресценции ретикулоцитов не наблюдается. Метод отличается простотой и тре-

бует немного времени; благодаря яркому свечению ретикулоциты легко подсчитать.

Нормальные величины. У здоровых число ретикулоцитов составляет 2–12 ‰, или 0,2–1,2 %.

Клиническое значение. Число ретикулоцитов в крови отражает регенеративные свойства костного мозга, и оценка его широко используется при различных анемиях (см. табл. 24). Повышение количества ретикулоцитов наблюдается после кровопотери, при гемолитических анемиях, особенно в период криза (количество ретикулоцитов может быть 20–30 %), а также на фоне лечения анемии Аддисона—Бирмера витамином В12 (ретикулоцитарный криз — подъем числа ретикулоцитов на 4–8-й день лечения). Снижение количества ретикулоцитов характерно для гипопластической анемии, редицива анемии Аддисона—Бирмера.

Определение количества ретикулоцитов может быть использовано для определения продукции эритропоэза и вычисления срока жизни эритроцитов.

Литература. Гомзякова Н. В. Лаб. дело, 1960, № 5, с. 38–39; Зубжицкий Ю. Н. Лаб. дело, 1967, № 2, с. 35; Кориков П. Н. Лаб. дело, 1961, № 4, с. 10.

3.3.7. Резистентность эритроцитов

Для оценки физико-химических свойств эритроцитов исследуют стойкость (резистентность) эритроцитов к различным воздействиям. Наибольшее распространение в клинической практике получило исследование осмотической резистентности эритроцитов.

Унифицированный метод определения осмотической резистентности эритроцитов в модификации Л. И. Идельсона (1974). Принцип. Количественное определение степени гемолиза эритроцитов в забуферных гипотонических растворах хлорида натрия.

Реактивы. Основной раствор (по своей осмотической концентрации соответствует 10 % раствору хлорида натрия) имеет рН 7,4, состав раствора: двузамещенный фосфат натрия (Na_2HPO_4) — 27,31 г (или $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ — 34,23 г), однозамещенный фосфат натрия ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) — 4,86 г, хлорид натрия — 180 г, дистиллированная вода — до 2 л. Раствор можно хранить в закрытой посуде в холодильнике в течение нескольких месяцев.

Основной раствор разводят в 10 раз и получают раствор, соответствующий по своей осмотической концентрации 1 % раствору хлорида натрия. Из этого раствора готовят рабочие растворы хлорида натрия следующих концентраций: 0,85; 0,75; 0,70; 0,65; 0,60; 0,55; 0,50; 0,45; 0,40; 0,35; 0,30; 0,20; 0,10%. Можно приготовить по 100 мл этих рабочих растворов и сохранять их в холодильнике. Годны в течение 2 нед.

Специальное оборудование. 1. Фотоэлектродколориметр. 2. Термостат на 37 °С.

Ход определения. В две стерильные пробирки с предварительно внесенными 2 каплями гепарина берут по 1,5 мл крови, перемешивают и одну используют для исследования, вторую — оставляют на сутки в термостате. В ряд центрифужных пробирок (14 штук) разливают по 5 мл рабочих растворов хлорида натрия концентраций от 1 до 0,10 %. В каждую центрифужную пробирку добавляют по 0,02 мл перемешанной гепаринизированной крови и оставляют при комнатной температуре на 30 мин. Центрифугируют смесь крови с растворами хлорида натрия при 2000 об/мин в течение 5 мин. Из каждой пробирки сливают надосадочную жидкость и измеряют на фотозлектроколориметре при длине волны 500—560 нм (зеленый светофильтр) в кювете с толщиной слоя 10 мм против холостой пробы.

Холостая проба — надосадочная жидкость в пробирке, содержащей 1 % раствор хлорида натрия.

Расчет. За 100% гемолиз принимают гемолиз в пробирке, содержащей 0,1 % раствор хлорида натрия. Вычисляют процент гемолиза в каждой пробирке, сравнивая величины экстинкции надосадочной жидкости с экстинкцией, принятой за 100 %, по формуле:

$$\frac{E_x \cdot 100}{E_1}$$

где E_1 — экстинкция надосадочной жидкости в пробирке с 0,1 % раствором хлорида натрия; E_x — экстинкция исследуемой пробы; 100 — процент гемолиза в пробирке с 0,1 % раствором хлорида натрия.

На следующий день повторяют исследование с кровью, инкубированной 24 ч при 37 °С.

Нормальные величины. У здоровых в свежей крови начало гемолиза отмечают при концентрации хлорида натрия 0,50—0,45 %, а полный гемолиз — при 0,40—0,35 % растворе хлорида натрия.

Клиническое значение. Исследование проводят при подозрении на гемолитическую анемию. Понижение осмотической резистентности, т. е. появление гемолиза эритроцитов при более высокой, чем в норме, концентрации хлорида натрия (0,70—0,75 %), наблюдается при наследственном микросфероцитозе и некоторых наследственных несфероцитарных гемолитических анемиях, а также иногда при аутоиммунной гемолитической анемии. Вряд случаев понижение осмотической резистентности является только при исследовании инкубированной крови. Повышение осмотической резистентности характерно для талассемии, гемоглобинопатии.

Литература, Идельсон Л. И., В кн.: Справочник по функциональной диагностике / Под ред. И. А. Кассирского.— М., Медицина, 1970, с. 401.

3.3.8. Пробы на ферментопатию эритроцитов

При несфероцитарных гемолитических анемиях возникает необходимость исследования ак-

тивности ферментов в эритроцитах. В эритроцитах содержатся ферменты гликолиза, пентозофосфатного цикла, системы глутатиона, адениловой системы и других реакций обмена, блокада которых может быть связана с дефицитом ферментов.

Наиболее распространенной наследственной ферментопатией эритроцитов является дефицит глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г-6-ФД), относящейся к ферменту пентозофосфатного цикла. Для диагностики дефицита Г-6-ФД наиболее достоверным является количественное определение активности ферментов в эритроцитах. В условиях практической работы могут быть выполнены качественные пробы, имеющие ориентировочное значение.

Тест на образование телец Гейнца—Эрлиха по Дейчи. Принцип. Инкубация эритроцитов с метиловым фиолетовым и появлением окрашенных телец в большом количестве в патологических эритроцитах.

Реактивы. 0,5 % раствор метилового фиолетового в изотоническом растворе хлорида натрия.

Специальное оборудование. Микроскоп.

Ход определения. Смешивают в пробирке равные количества крови и раствора метилового фиолетового. Тщательно перемешивают и оставляют на 10 мин. Готовят мазки на предметном стекле, накрывают покровным и микроскопируют иммерсионным объективом.

Нормальные величины. У здоровых наблюдается образование в эритроцитах единичных красного цвета телец.

Клиническое значение. В патологических Г-6-ФД-дефицитных эритроцитах появляется большее количество телец (4—6). Проба не является специфичной для дефицита Г-6-ФД, так как тельца Гейнца появляются при передозировке сульфаниламидов, при отравлении анилиновыми красителями, при дефиците других ферментов (глутатион-редуктазы, 6-фосфоглюконатдегидрогеназы), у носителей нестабильных гемоглобинов.

Качественный метод Мотульского—Кемпбеля. Принцип. В присутствии Г-6-ФД образуется NADPH, который обесцвечивает бриллиантовый кризоловый синий.

Реактивы. 1. Раствор натриевой соли глюкозо-6-фосфата (825 мг в 100 мл дистиллированной воды). 2. Раствор NADP (50 мг в 100 мл дистиллированной воды). 3. Раствор бриллиантового кризолового синего (32 мг в 100 мл дистиллированной воды). 4. Трис-буферная смесь рН 8,5 (8,96 г в 97 мл дистиллированной воды + 3 мл концентрированной HCl). 5. Парафин.

Специальное оборудование. Не требуется.

Ход определения. В пробирке смешивают: 0,1 мл реактива 1; 0,1 мл реактива 2; 0,25 мл реактива 3; 0,2 мл реактива 4. В другую пробирку, куда заранее внесен 1 мл дистиллированной воды, добавляют 0,02 мл крови из пальца. Смешивают содержимое обеих пробирок, смесь покрывают 1—2 мл жидкого парафина и

ставят на водяную баню при 37 °С. Отмечают время обесцвечивания смеси.

Нормальные величины. У здоровых раствор обесцвечивается черта 40—55 мин.

Клиническое значение. Замедление обесцвечивания более 90 мин свидетельствует о дефиците Г-6-ФД. При гемолитической энзимодифицитной анемии обесцвечивание наступает через 3—24 ч.

Качественный метод по Бернштейну. Принцип тот же, что и в методе Мотульского—Кемпбеля, но окраска бриллиантовым крезиловым синим заменена дихлорфенилиндифенолом.

Реактивы. 1. Раствор 2,6-дихлорфенилиндифенола (14,5 мг на 100 мл буферного раствора трис HCl, pH 8,0). Буферный раствор состоит из следующих компонентов: 1,48 М раствор трисоксиметиламинометана (43,27 г на 250 мл воды) и 1,48 М раствор HCl (2 ампулы фиксанала, содержащего 0,1 г-экв, доводят водой до 135 мл). К 230 мл раствора трис добавляют 110 мл раствора HCl и доводят водой до 460 мл. 2. Раствор феназинметасульфата (2 мг на 100 мл воды). 3. Раствор NADP (2,3 мг в 1 мл воды). 4. Раствор глюкозо-6-фосфата (15,2 мг натриевой соли Г-6-Ф в 1 мл воды). Из этих растворов готовят реактивную смесь следующего состава: реактив 1—8 частей, реактив 2—1 часть, реактив 3—0,5 части и реактив 4—0,5 части.

Специальное оборудование. Не требуется.

Ход определения. В пробирку с 1 мл дистиллированной воды вносят 0,02 мл крови из пальца. После наступления гемолиза добавляют 0,5 мл реактивной смеси. Оставляют на 15—20 мин при комнатной температуре. Через 15—20 мин оценивают изменение цвета смеси.

Нормальные величины. Обесцвечивание смеси происходит через 15—20 мин.

Клиническое значение. Более позднее обесцвечивание смеси свидетельствует о дефиците Г-6-ФД в эритроцитах. Неполное обесцвечивание через 30 мин соответствует уменьшению активности Г-6-ФД, а отсутствие обесцвечивания к этому времени свидетельствует о резком снижении активности фермента.

Литература. *Тодоров И.* Клинические лабораторные исследования в педиатрии. 5-е изд. (русск.) — София, 1966, с. 313, 389; *Идельсон Д. И., Катоян Э. Р.* Лабор. дело, 1970, № 7, с. 428.

3.3.9. Цитохимические исследования эритроцитов

Цитохимические исследования отличаются простотой, не требуют специального оборудования и дают ориентировочное представление о количестве исследуемого вещества. Исследования эритроцитов проводят с целью выявления различных внутриклеточных включений, наличия разных форм гемоглобина, ферментных нарушений.

Сидероциты и сидеробласты — это эритроциты и эритробласты (нормобласты), содержащие в цитоплазме негемоглобиновое железо в виде гемосидерина и ферритина.

Принцип. Окраска с помощью реакции на берлинскую лазурь и образование внутриклеточных гранул синего цвета.

Реактивы. 1. 2% раствор железисто-синеродистого калия. 2. 0,1 н. раствор HCl (8,2 мл концентрированной HCl и дистиллированной воды до 1 л). 3. 0,1% раствор сафранина. 4. Метиловый спирт.

Специальное оборудование. Микроскоп.

Ход определения. Фиксируют мазки в метиловом спирте 10—20 мин и высушивают на воздухе. Помещают в смесь равных частей растворов 1 и 2 при температуре 50—56 °С на 15—20 мин. Промывают в проточной воде 10—15 мин и ополаскивают дистиллированной водой. Докрашивают раствором сафранина 3—5 с.

Нормальные величины. В периферической крови число сидероцитов не превышает 1,1% и составляет в среднем 0,6+0,04%, в костном мозге их несколько больше—0,9+0,09% (в среднем 0,2—2,1%), количество сидеробластов (ядерных эритроцитов с железосодержащими гранулами) в костном мозге 23,7+2,4%.

Клиническое значение. Снижение сидероцитов и сидеробластов характерно для железодефицитных анемий. Повышение железосодержащих клеток наблюдается при гемолитических анемиях, гипопластических анемиях, после операции спленэктомии.

Литература. *Цитологические аспекты заболеваний системы крови/Под ред. Э. И. Терентьевой, Г. И. Козинца.*— М.: Медицина, 1978, с. 162.

Фетальный гемоглобин. Метод Ветке.

Принцип. Элюция гемоглобина кислотой с докраской мазков дает возможность отличить эритроциты, содержащие фетальный гемоглобин, по сохраненной окраске в отличие от обесцвеченных эритроцитов, содержащих гемоглобин А.

Реактивы. 1. Цитратно-фосфатный буфер (pH 3,2): 24,7 мл 0,2 М раствора Na₂HPO₄ (35,6 г Na₂HPO₄ · 2H₂O и до 1 л дистиллированной воды) и 75,3 мл 0,1 М раствора лимонной кислоты (21,01 г лимонной кислоты и до 1 л дистиллированной воды). 2. 1% раствор метилового фиолетового или 1% раствор эозина. Лучшие результаты дает докраска метиловым фиолетовым. 3. Этиловый спирт 80%.

Специальное оборудование. 1. Микроскоп. 2. Термостат на 37 °С.

Ход определения. Фиксируют мазки крови в 80% этиловом спирте 5 мин. Промывают дистиллированной водой и высушивают. Погружают мазки на 5 мин в прогретый при 37 °С в течение 30 мин цитратно-фосфатный буфер (для элюции гемоглобина), периодически помешивая раствор стеклянной палочкой для удаления пузырьков воздуха. Ополаскивают

мазки дистиллированной водой, высушивают фильтровальной бумагой. Докрашивают реактивом 2 в течение 2—3 мин. Промывают дистиллированной водой и высушивают.

Нормальные величины. У взрослых встречаются единичные окрашенные эритроциты (содержащие гемоглобин F); увеличение числа окрашенных эритроцитов наблюдается у новорожденных и детей до 5-месячного возраста.

Клиническое значение. Увеличение числа эритроцитов с гемоглобином F наблюдается у больных талассемией, особенно при гемозиготной форме.

Литература. *Исаева Е. Г., Королева А. М.* Лаб. дело, 1965, № 4, с. 201; *Beitke R., Kleinhauer E.* Blut, 1958, Bd 5, S. 241.

Активность Г-6-ФД (К.Ф.1.1.49). Принцип. Окисление глюкозо-6-фосфата в присутствии Г-6-ФД при участии NADP, который восстанавливается в NADP-H; под влиянием последнего тетразолий выявляется в виде гранул формазана.

Реактивы. 1. 10% раствор формалина. 2. Инкубационная среда: глюкозо-6-фосфат — 3 мг в 1 мл, NADP — 1 мг в 1 мл, магния хлорид — 0,1 М в 0,2 мл, нитросиний тетразолий — 1 мг в 1 мл, трис-буфер 0,25 М (рН 7,6) — 2,3 мл, феназин-метасульфат — 0,5 мл.

Специальное оборудование. 1. Термостат на 37 °С. 2. Микроскоп.

Ход исследования. На нефиксированные мазки крови наносят 0,1—0,2 мл инкубационной среды и помещают мазки в горизонтальном положении в термостат на 1 ч 15 мин. Фиксируют в 10 % растворе формалина 10 мин при комнатной температуре. Высушивают на воздухе и микроскопируют.

Нормальные величины. В эритроцитах обнаруживают 10—20 гранул формазана.

Клиническое значение. Снижение числа гранул формазана в эритроцитах или их отсутствие указывает на дефицит Г-6-ФД.

3.3.10. Скорость оседания эритроцитов (СОЭ).

Исследование СОЭ является одним из самых распространенных в лабораторной практике и входит в состав общего клинического анализа крови. Кроме того, нередко проводится одновременно с определением концентрации гемоглобина и количества лейкоцитов в крови при профилактических осмотрах.

Унифицированный микрометод Панченкова (1972). Принцип. Смесь крови с цитратом при стоянии разделяется на два слоя (ниж-

ний — эритроциты, верхний — плазма). При этом СОЭ, т. е. величина столбика плазмы, бывает различной в зависимости от изменений физико-химических свойств крови.

Реактивы. 5 % раствор трехзамещенного цитрата натрия ($C_6H_5O_7Na_3 \cdot 5H_2O$). Раствор фильтруют (рН должен быть нейтральным или слабощелочным). При помутнении реактив негоден.

Специальное оборудование. Аппарат Панченкова, состоящий из штатива и капилляров. Пробирки и капилляры должны быть химически чистыми, т. е. необходимо их промыть хромовой смесью, многократно после этого вымыть водопроводной водой и 2—3 раза — дистиллированной.

Ход определения. Перед использованием химически чистый капилляр промывают цитратом натрия и заполняют им пробирку на 1/4 (до метки 0,75).

Кровь из мякоти пальца (или венозную) набирают полный капилляр (до метки 0) и переносят в пробирку с цитратом (усиленно выдувая всю кровь). При этом получают соотношение крови и цитрата 4:1. Можно брать вдвое большее количество цитрата и крови, т. е. половину капилляра цитрата (до метки 0,5) и два полных капилляра крови. Перемешивают содержимое пробирки и набирают до метки 0 смесь крови с цитратом. Закрыв пальцем верхний конец капилляра, осторожно, чтобы кровь из капилляра не вылилась, устанавливают капилляр в штатив строго вертикально, упирая нижний его конец в резиновую прокладку и прижимая верхний конец прокладкой или пробкой. Через час отмечают скорость оседания эритроцитов по высоте отстоявшегося слоя плазмы в миллиметрах.

Нормальные величины. У мужчин 1—10 мм/ч, у женщин 2—15 мм/ч.

При снижении температуры (<20 °С) помещения, в котором проводится исследование, СОЭ замедляется, при повышении — увеличивается.

Клиническое значение. Увеличение СОЭ наблюдается при различных воспалительных процессах, интоксикациях, острых и хронических инфекциях, при инфаркте миокарда, опухолях, после кровопотери, оперативных вмешательствах. Особенно выраженное ускорение СОЭ (60—80 мм/ч) характерно для парапротеинемических гемобластозов (миеломная болезнь, болезнь Вальденстрема и др.) и симптоматических парапротеинемий, сопутствующих злокачественным новообразованиям, хроническому активному гепатиту, циррозу печени, туберкулезу, амилоидозу, коллагенозам. Замедление СОЭ наблюдается при эритремии и симптоматических эритроцитозах.

3.4. ЛЕЙКОЦИТЫ

Лейкоциты — клетки крови, отличающиеся характерной структурой и сложным внутриклеточным метаболизмом. Различные формы зрелых лейкоцитов являются объектом лабораторных исследований. Они различаются по форме

и структуре ядра, характеру цитоплазмы, ее грануляции, ядерно-цитоплазматического соотношения, тинкториальным свойствам; эти признаки являются основными критериями при исследовании лейкоцитов в окрашенных мазках крови.

Лейкоциты — высокоспециализированные клетки, обладающие различными защитными функциями. Благодаря фагоцитарной активности, участию в клеточном и гуморальном иммунитете, обмену гистамина, гепарина, реализуются антимикробные, антитоксические, антителообразующие и другие важнейшие компоненты иммунологических реакций.

Количество лейкоцитов в крови изменяется под влиянием различных внешних факторов: сезонных, климатических, метеорологических, периодов солнечной активности, а также при разных физиологических состояниях организма (возрастные изменения, беременность, фазы менструального цикла и пр.) и разнообразной патологии.

Поэтому исследование числа лейкоцитов в крови — одно из самых распространенных в лабораторной практике. Они проводятся не только заболевшим (обязательно всем больным в стационаре и амбулаторным по показаниям), но и здоровым при профилактических осмотрах детского населения, рабочих, и служащих некоторых производств, диспансеризации и других оздоровительных мероприятиях.

3.4.1. Подсчет количества

Подсчет количества лейкоцитов входит в состав общего клинического анализа крови, а также «укороченного» анализа (содержание гемоглобина, число лейкоцитов, СОЭ), иногда в экстренных случаях исследуют только количество лейкоцитов (при подозрении на острый воспалительный процесс и др.).

Унифицированный метод подсчета в автоматическом счетчике (1972). Принцип. Большинство счетчиков основано на кондуктометрическом методе. Клетки, находящиеся в растворе электролита, пропускаемые через электрическое поле, изменяют сопротивление электрической цепи. Возникший импульс регистрируется счетным устройством с цифровой индикацией.

Специальное оборудование. Автоматический счетчик.

Реактивы и ход определения соответствуют инструкции, приложенной к прибору.

Унифицированный метод подсчета в счетной камере (1972). Принцип. Подсчет лейкоцитов под микроскопом в определенном количестве квадратов счетной сетки и пересчет на 1 мкл крови (или 1 л по системе СИ), исходя из объема квадратов и разведенной крови.

Реактивы. 3—5 % раствор уксусной кислоты, подкрашенный несколькими каплями раствора метиленового синего (для окраски ядер лейкоцитов). Раствор голубого цвета, длительно годен к употреблению.

Специальное оборудование. 1. Микроскоп. 2. Счетная камера Горяева.

Ход определения. Разводят исследуемую кровь в 20 раз, для этого в сухую пробирку наливают 0,4 мл уксусной кислоты. Набирают из пальца 0,02 мл крови (можно использовать стабилизированную антикоагулянтom венозную

кровь). Кончик пипетки вытирают фильтровальной бумагой или марлей, следя за тем, чтобы из пипетки кровь не вылилась. Выдувают кровь из пипетки на дно пробирки, тщательно перемешивают (повторно набирая) и выдувают смесь крови с уксусной кислотой). Маркируют пробирку и оставляют до момента счета (допускается счет лейкоцитов не более чем через 2—4 ч после взятия крови).

Подготавливают счетную камеру: протирают насухо камеру с сеткой и покровное стекло, затем притирают стекло к камере, слегка надавливая его таким образом, чтобы по краям стекла появились радужные кольца или полосы (это свидетельствует о высоте камеры — 0,1 мм). Заполняют счетную камеру разведенной кровью: предварительно встряхивают несколько раз содержимое пробирки, затем пастеровской пипеткой или стеклянной палочкой отбирают каплю разведенной крови и подносят ее к краю покровного стекла, следя за тем, чтобы кровь без пузырьков воздуха равномерно заполнила всю поверхность сетки, не затекая в бороздки. Заполненную камеру оставляют в горизонтальном положении на 1 мин (для оседания лейкоцитов). Не меняя горизонтального положения камеры, помещают ее на столик микроскопа и подсчитывают лейкоциты в 100 больших квадратах с малым увеличением (окуляр 10 X, объектив 8X). Для большей точности счет лейкоцитов проводят по всей сетке в больших квадратах (неразделенных на малые квадраты и полосы), начиная с левого верхнего угла сетки. Для лучшего контрастирования затемняют поле зрения, опуская конденсор и закрывая диафрагму. Считают клетки, расположенные внутри квадрата и лежащие на любых двух линиях (чтобы дважды не подсчитать одну клетку).

Расчет числа лейкоцитов проводят, исходя из разведения крови (20), числа сосчитанных квадратов (100) и объема одного большого квадрата

$$\left(\begin{array}{l} | \\ 250 \text{ мкл, так как сторона квадрата } \frac{1}{10} \text{ мм,} \\ \text{высота } \frac{1}{10} \text{ мм).} \\ X = \frac{a \cdot 250 \cdot 20}{100}, \text{ т. е. } X = a \cdot 50, \end{array} \right.$$

где X — число лейкоцитов в 1 мкл крови; a — число лейкоцитов в 100 больших квадратах.

Практически количество сосчитанных лейкоцитов умножают на 50.

Нормальные величины. Количество лейкоцитов в крови колеблется в пределах 4000—8800 в 1 мкл, или $4 \cdot 10^3$ — $8,8 \cdot 10^3$ в 1 л (по системе СИ). Число лейкоцитов в крови — наиболее переменный лабораторный показатель. Оно может изменяться в течение дня, в связи с приемом пищи, после физической нагрузки, под влиянием различных диагностических процедур, медикаментозных воздействий.

Клиническое значение. Повышение количества лейкоцитов — лейкоцитоз — наблюдается при различных воспалительных процессах, острых бактериальных инфекциях, интоксикациях, шоке, острых кровопотерях, ко-

матозных состояниях, гемолитическом кризе, почечной колике, аллергических реакциях, опухлях. Резкое увеличение количества лейкоцитов в крови ($50 \cdot 10^9/\text{л}$ — $100 \cdot 10^9/\text{л}$ и более) характерно для развернутой стадии хронического миелолейкоза и хронического лимфолейкоза.

Снижение количества лейкоцитов — лейкопения — наблюдается при вирусных инфекциях, некоторых хронических инфекциях, сепсисе, циррозе печени, хроническом активном гепатите, аутоиммунных заболеваниях, после приема цитостатических препаратов, антибиотиков, сульфаниламидов и других медикаментов. Особенно резкая лейкопения ($2 \cdot 10^9/\text{л}$ и менее) наблюдается при апластической анемии, агранулоцитозе, после лучевых воздействий.

Л и т е р а т у р а. Грибова И. А. Гематологическая норма.— В кн.: Руководство по гематологии/Под ред. А. И. Воробьева, Ю. И. Лорие. М.: Медицина, 1979, с. 53.

3.4.2. Лейкоцитарная формула

Лейкоцитарную формулу (процентное соотношение различных видов лейкоцитов) подсчитывают в окрашенных мазках крови. Методы фиксации и окраски мазков крови, а также микроскопического исследования мазков унифицированы.

Унифицированный метод морфологического исследования форменных элементов крови с дифференциальным подсчетом лейкоцитарной формулы (1979). **П р и н ц и п.** Микроскопия сухих фиксированных и окрашенных мазков крови с дифференцированием различных форм лейкоцитов. Этапы исследования, включающие приготовление мазков крови, подготовку предметных стекол, фиксацию мазков и их окраску, изложены в разделе 3.3.2.

Р е а к т и в ы. 1. Иммерсионное масло. 2. Диэтиловый эфир.

С п е ц и а л ь н о е о б о р у д о в а н и е. 1. Микроскоп. 2. 11-Клавишный счетчик для подсчета лейкоцитарной формулы.

Х о д и с с л е д о в а н и я. С помощью объектива 10 X (малою увеличения) находят край мазка крови. Наносят каплю иммерсионного масла и, не меняя положения стекла, переводят иммерсионный объектив (90 X) таким образом, чтобы он погрузился в каплю масла. Подбирают с помощью микровинта соответствующее фокусное расстояние, устанавливая четкую видимость клеток. Приступают к дифференцированию лейкоцитов, отмечают клетки с помощью 11-клавишного счетчика; необходимо просчитать не менее 100 лейкоцитов. Подсчет лейкоцитов проводят, соблюдая следующее правило: отступив 2—3 поля зрения от края мазка, затем 3—5 полей зрения вдоль края мазка, затем 3—5 полей зрения под прямым углом по направлению к середине мазка, снова 3—5 полей зрения параллельно краю, затем под прямым углом по направлению к краю и т. д.; таким образом, стекло двигают по зигзагу (линия «меандра»). Просчитав около половины клеток на од-

ном крае мазка, меняют положение стекла и другую половину клеток считают на противоположном крае.

При исследовании лейкоцитарной формулы необходимо дифференцировать неразрушенные лейкоциты. Если при подсчете 100 лейкоцитов отмечаются какие-либо отклонения от нормы (например, увеличение числа палочкоядерных форм, эозинофилов, лимфоцитов или появление лейкоцитов, не обнаруживаемых у здоровых людей), необходимо подсчитать еще 100 лейкоцитов и вывести средний результат. В табл. 25 представлены основные морфологические особенности различных лейкоцитов.

Исследование лейкоцитарной формулы с помощью автомата. Современные гематологические автоматы для подсчета лейкоцитарной формулы основаны на двух принципах.

П р и н ц и п 1. Дифференцировка лейкоцитов с помощью микроскопа в окрашенных мазках крови путем сравнения морфологических характеристик клеток крови со стандартными, хранящимися в памяти компьютера (автомат «Hematrak» фирмы «Opton», ФРГ, и др.).

П р и н ц и п 2. Дифференцировка лейкоцитов не в мазках, а в цельной крови в зависимости от размера и цитохимических свойств клеток с применением селективных окрасок (автомат «Hemalog D» фирмы «Technicon», США).

С п е ц и а л ь н о е о б о р у д о в а н и е. Автомат для подсчета лейкоцитарной формулы. **Х о д и с с л е д о в а н и я** соответствуют инструкции, приложенной к автомату.

Существующие автоматы для подсчета лейкоцитарной формулы отличаются не только принципом работы, но и количеством дифференцируемых лейкоцитов в 1 пробе, по возможности идентификации патологических форм, наличием контрольного устройства, устройства для приготовления мазков и их окраски и пр.

Н о р м а л ь н ы е в е л и ч и н ы. В табл. 25 представлены процентные и абсолютные значения различных лейкоцитов и их морфологические особенности у здоровых людей.

К л и н и ч е с к о е з н а ч е н и е. Изменения лейкоцитарной формулы сопутствуют многим заболеваниям и нередко являются неспецифическими. Тем не менее диагностическое значение этого исследования велико, оно дает представление о тяжести состояния, эффективности терапии. При гемобластозах исследование лейкоцитарной формулы особенно диагностически значимо. Обнаружение в крови властных клеток (см. 3.6) является опорным пунктом для диагноза острого лейкоза.

Повышение числа нейтрофилов — *нейтрофилез*, как правило, сочетается с увеличением общего числа лейкоцитов в крови и наблюдается при острых воспалительных процессах, интоксикациях, шоковых состояниях, при кровотечениях, инфаркте миокарда, гемолитическом кризе. Нередко этим состояниям сопутствует и повышение числа палочкоядерных нейтрофилов, и появление незрелых гранулоцитов (миелоциты, метамиелоциты) в небольшом количестве (сдвиг формулы влево). Максимальной степени эти изменения достигают при миелопролиферативных

таб. 25. Характеристика различных видов лейкоцитов здоровых людей

Вид	Нейтрофилы		Эозинофилы	Базофилы	Лимфоциты	Моноциты
	палочкоядерные	сегментоядерные				
Количество в %	1—6	47—72	0,5—5	0—1	19—37	3—11
в 1 мкл	40—300	2000—5500	20—300	0—65	1200—3000	90—600
Размер клетки, мкм	10—15	10—15	12—15	8—12	8—10	15—20
Ядро: форма	Узкое, вытянутое в виде палочки	Узкое, состоит из 3—5 сегментов	Несколько шире, чем у нейтрофила, состоит из 2—3 сегментов	Неопределенное, иногда в виде листа растения	Округлое или бобовидное	Полиморфное: округлое, бобовидное, с вдавленными
структура	Неравномерная крупноглыбчатая	Неравномерная крупноглыбчатая	Неравномерная крупноглыбчатая	Неравномерная крупноглыбчатая	Неравномерная крупноглыбчатая	Равномерная сетчатая
окраска	Темно-фиолетовая	Темно-фиолетовая	Фиолетовая	Фиолетовая	Темно-фиолетовая	Светло-фиолетовая
Цитоплазма	Розоватая	Розоватая	Бледно-розовая	Бледно-розовая нередко с размытыми участками (растворенные гранулы)	В виде узкого ободка иногда широкая зона голубая	Обильная бледно-голубая или сероватая
Зернистость, ее окраска, характер	Обильная, мелкая, бледно-фиолетовая	Обильная, мелкая, бледно-фиолетовая	Обильная, занимает всю цитоплазму, крупная, розовая	Необильная, неравномерная, фиолетовая	Изредка единичные фиолетовые гранулы	Непостоянно, иногда мелкая бледно-фиолетовая

заболеваниях, особенно хроническом миелодисплазии. При этом резко увеличивается общее количество лейкоцитов ($50 \cdot 10^9/\text{л}$ — $100 \cdot 10^9/\text{л}$ и более) и в значительном проценте в лейкоцитарной формуле обнаруживают промиелоциты (3—5%), миелоциты (до 10%), метамиелоциты (до 10—15%) и единичные властные клетки, при этом число зрелых нейтрофилов существенно уменьшается. Такого типа изменения могут быть и реактивными (лейкемоидные реакции), и сопутствовать сепсису, туберкулезу, метастазам злокачественных опухолей в костный мозг.

Снижение числа нейтрофилов — *нейтропения* — обычно сочетается с лейкопенией и наблюдается при вирусных инфекциях, некоторых хронических инфекциях, после приема различных медикаментов (особенно цитостатических), после лучевой терапии. Максимальная степень нейтропении наблюдается при апластической анемии, агранулоцитозе.

Увеличение числа эозинофилов — *эозинофилия* — сопутствует аллергическим реакциям, глистной инвазии, некоторым детским инфекциям, особенно скарлатине, иногда опухолям, лимфогранулематозу и др. Увеличение числа базофилов — *базофилия* — встречается редко и

вместе с эозинофилией может быть признаком миелодисплазии.

Увеличение числа лимфоцитов — *лимфоцитоз* — наблюдается при инфекционном лимфоцитозе, коклюше, туберкулезе, после удаления селезенки. Наибольшей степени лимфоцитоз достигает при хроническом лимфолейкозе (70—90%) и сочетается с высоким лейкоцитозом ($50 \cdot 10^9/\text{л}$ и выше). Относительный лимфоцитоз — явление нередкое и наблюдается во всех случаях лейкопении с нейтропенией. Увеличение числа моноцитов — *моноцитоз* — обнаруживается при хронических инфекциях, опухолях и особенно резкое — при хронических моноцитарных лейкозах.

Л и т е р а т у р а . Золотницкая Р. П. Лаб. дело., 1983, № 5, с. 36—38.

3.4.3. Лейкоконцентрат

Приготовление и исследование лейкоконцентрата проводят в случаях выраженных лейкопений, когда исследование лейкоцитарной формулы затруднено, а также для обнаружения патологических элементов, не выявляемых в мазках крови (например, при алейкемической

стадии острых лейкозов, при лимфогранулематозе, миеломной болезни и др.). Лейкоконцентрацию можно проводить при неотчетливых результатах стерильной пункции. Все существующие методы лейкоконцентрации основаны на следующем: 1) гемолиз, 2) центрифугирование и 3) седиментация.

Наиболее физиологичны методы, основанные на седиментации форменных элементов крови, они наиболее распространены.

Метод с трилоном Б. Принцип. В связи с различным удельным весом эритроцитов и лейкоцитов и добавлением трилона Б, ускоряющего осаждение эритроцитов, получают плазму, содержащую большое количество лейкоцитов.

Реактивы. 1. 3% раствор трилона Б. 2. Краска Романовского — Гимзы или азур-эозина. 3. Метанол для фиксации мазков.

Специальное оборудование. 1. Микроскоп. 2. Термостат на 37 °С. 3. Центрифуга.

Ход определения. В пробирку с 1 мл 3% раствора трилона Б вносят 4 мл венозной крови и осторожно перемешивают. Ставят смесь крови с трилоном в термостат (можно отстаивать и при комнатной температуре) на 30—45 мин (за это время над эритроцитами образуется 2—3 мл прозрачной плазмы). С помощью пастеровской пипетки отсасывают в центрифужную пробирку слой плазмы, стараясь не захватывать эритроциты. Центрифугируют при 1000 об/мин в течение 10 мин. Надосадочную жидкость удаляют, а из осадка готовят мазки (помещают каплю осадка пастеровской пипеткой на предметное стекло и готовят мазок). Мазки высушивают на воздухе, фиксируют и окрашивают гематологическими красителями (см. 3.3.2).

Метод с гепарином может быть использован при необходимости удаления тромбоцитов.

Принцип. При центрифугировании плазмы, разведенной холодным изотоническим раствором хлорида натрия, тромбоциты оседают в осадок, а лейкоциты остаются во взвешенном состоянии.

Реактивы. 1. Гепарин (500 ЕД/мл). 2. 0,85% раствор хлорида натрия.

Оборудование то же, что и в методе с трилоном Б.

Ход определения. В пробирку с 1 мл гепарина добавляют 4 мл крови. Отстаивают 40—45 мин. С помощью пастеровской пипетки отбирают плазму в центрифужную пробирку, стараясь не захватить эритроциты. Центрифугируют при 1500 об/мин в течение 10 мин. Надосадочную жидкость удаляют, а к осадку добавляют 5 мл холодного 0,85% раствора хлорида натрия. Центрифугируют при 500—800 об/мин в течение 10—15 мин (если в осадке имеется примесь эритроцитов, то повторно центрифугируют с холодным раствором хлорида натрия). Из осадка готовят мазки и окрашивают их гематологическими красителями.

Нормальные величины. При исследовании лейкоконцентрата у 50 здоровых людей Р. А. Поспелова получила следующую лейкограмму: нейтрофилы палочкоядерные 1,2±

±0,1%, сегментоядерные 58,8±0,7%, эозинофилы 1,8±0,05%, базофилы 0,7±0,08%, лимфоциты 31,2±1%, моноциты 7,1±0,3%, плазматические клетки 0,2±0,03%. У одного человека обнаружено 0,2% миелоцитов, у 2—0,2 и 0,4% метамиелоцитов, у 2—единичные фрагменты ядер мегакариобластов.

Клиническое значение. Исследование мазков лейкоконцентрата имеет существенные преимущества перед исследованием мазков периферической крови при острых лейкозах, особенно при лейкопенических формах. Это исследование дает возможность выявить властные клетки, оценить полноту ремиссии при остром лейкозе, а также провести цитохимические исследования, имеющие важное диагностическое значение при острых лейкозах (см. 3.6).

Выявление в мазках лейкоконцентрата ядер мегакариоцитов наблюдается при миелопролиферативных заболеваниях, особенно доброкачественном сублейкемическом миелозе, а также при опухолях различной локализации. Увеличение плазматических клеток может быть при лимфогранулематозе, миеломной болезни и других опухолях. При лимфогранулематозе могут быть найдены предстadiumы клеток Березовского — Штернберга.

Литература. Поспелова Р. А. Лейкоконцентрация в клинической практике. — М., 1973, с. 22.

3.4.4. Исследование волчаночных клеток (LE-клетки)

Волчаночные клетки служат морфологическим проявлением иммунологического феномена, характерного для системной красной волчанки. Они образуются в результате фагоцитоза нейтрофильными лейкоцитами (реже моноцитами) ядер клеток, содержащих деполимеризованную ДНК. Предполагают, что фагоцитируемая субстанция представляет собой иммунный комплекс, состоящий из волчаночного фактора (антиядерного фактора), остатков ядра лейкоцитов и комплемента. Морфологически LE-клетки характеризуются наличием в цитоплазме нейтрофильных лейкоцитов округлого бесструктурного образования, напоминающего лизированное ядро светло-фиолетового цвета, занимающего центральную часть клетки с оттесненным к периферии ядром.

Реже такое же образование выявляют в моноцитах, иногда оно расположено внеклеточно, может образовывать фигуры «розеток» (образование, окруженное нейтрофилами). В отличие от LE-клеток обнаруживают нейтрофилы с фагоцитированной субстанцией не гомогенного характера, а с сохраненной структурой хроматина. Такие клетки относят к клеткам Тарта и рассматривают их как предстadiumы LE-клеток. Специфичными для системной красной волчанки считают типичные LE-клетки.

Для исследования LE-феномена предложены многочисленные методы, в основе которых лежит инкубация клеток больного в собственной плазме (метод, предложенный Hargaves, Zimmer, 1948). Рекомендуется дополнительное механи-

ческое встряхивание для усиления травматизации клеток и увеличения количества ЛЕ-клеток.

Метод Харгревеса — Циммера. Принцип. Механическое повреждение лейкоцитов для усиления ЛЕ-феномена.

Реактивы. 1. Метиловый спирт. 2. Краска Романовского — Гимзы или другой гематологической краситель.

Специальное оборудование. 1. Микроскоп. 2. Металлическое сито. 3. Фарфоровый пестик. 4. Центрифуга.

Ход определения. В пробирку набирают 10 мл венозной крови и оставляют для свертывания на 2 ч. Свернувшуюся кровь выливают на металлическое сито, поставленное на чашку Петри, и пестиком протирают сгусток в чашку. Содержимое чашки Петри выливают в центрифужную пробирку и центрифугируют при 2000 об/мин в течение 5 мин. Надосадочную жидкость отсасывают и удаляют, а из осадка (верхнего слоя) готовят мазки. Высохшие мазки фиксируют и окрашивают гематологическим красителем.

Метод Цинкхама — Конли в модификации Е. Н. Новоселовой. Принцип. Механическое воздействие на кровь, облегчающее образование ЛЕ-феномена.

Реактивы. 1. Оксалат натрия. 2. Метиловый спирт. 3. Краска Романовского — Гимзы или азур-эозин.

Специальное оборудование. 1. Микроскоп. 2. Центрифуга. 3. Стекланные бусинки диаметром 3—4 мм.

Ход исследования. В пробирку помещают 10 мг оксалата натрия и 10 мл венозной крови. Тщательно перемешивают и оставляют стоять на 1—1½ ч. Вносят в пробирку 6—8 бусинок, закрывают пробирку плотно пробкой и перемешивают в течение 30 мин (опрокидывая пробирку пробкой вниз и вверх). Затем отстаивают в течение 1 ч при комнатной температуре до разделения слоев. Плазму отсасывают пастеровской пипеткой и переносят в центрифужную пробирку. Центрифугируют при 1000 об/мин в течение 5 мин. Надосадочную жидкость сливают, из осадка готовят мазки. Фиксируют высохшие мазки в метилом спирте и окрашивают гематологическим красителем.

Нормальные величины. У здоровых людей волчаночные клетки в крови отсутствуют.

Клиническое значение. Обнаружение ЛЕ-клеток — специфичный симптом системной красной волчанки. Исследование необходимо производить до начала кортикостероидной терапии. Отрицательный результат исследования не исключает возможность данного заболевания, он бывает в раннем периоде болезни, а также при выраженном нефротическом синдроме и потере с мочой большого количества белка. Большую диагностическую ценность имеет иммунологическое исследование антинуклеарного фактора (см. раздел «Иммунология»).

Литература. Коллагеновые болезни и ревматизм/Под ред. Е. М. Тареева.— М.: Медгиз, 1961; Пospelova P. A. Лейкоконцентрация в клинической практике.— М.: Медицина, 1973, г. 771.

3.4.5. Цитохимические исследования лейкоцитов

Цитохимические исследования проводят в мазках крови, лейкоконцентрата; они основаны на использовании специфических химических реакций для определения в клетках различных веществ. Эти исследования позволяют изучать локализацию и ориентировочно оценивать количество определяемых веществ в различных клеточных элементах. Цитохимические исследования относительно несложны, дают возможность исследовать различные виды лейкоцитов, но уступают в точности количественному анализу, проводимому с помощью биохимических методов.

При цитохимическом исследовании чаще пользуются полуколичественной оценкой результатов, используя принцип Астальди, основанный на выявлении различной степени интенсивности специфической окраски. В зависимости от нее исследуемые элементы делят на 4 группы: с отрицательной реакцией (—), слабоположительной (+), положительной (++) и резко положительной (+++). Для количественного выражения результатов подсчитывают 100 клеток определенного вида, дифференцируя их по указанному принципу, затем число клеток с одинаковой интенсивностью окраски умножают на соответствующее данной группе число плюсов, сумма этих произведений составляет условные единицы. Например, при исследовании активности щелочной фосфатазы в нейтрофилах из 100 просмотренных клеток в 60 клетках активность фермента не выявлена (—), в 35—специфическая окраска была слабой (+) и в 5—более интенсивной (++). Результат определения активности щелочной фосфатазы в нейтрофилах в таком случае составит $(60 \text{ XO}) + (35 \text{ X } 1) + (5 \text{ X } 2) = 0 + 35 + 10 = 45$ ед. Можно выразить результат в виде среднего цитохимического показателя по L. Karłow (1955) или среднего цитохимического коэффициента (СЦК). С этой целью также дифференцируют 100 исследуемых клеток по указанной выше системе. Полученный процент клеток в каждой группе умножают на соответствующее данной группе число плюсов. Сумма этих величин, деленная на 100, представляет собой СЦК для одной клетки. В указанном примере СЦК щелочной фосфатазы нейтрофилов равен 0,45. В тех случаях, когда изучаемые вещества локализуются в клетках в виде единичных гранул (например, активность неспецифической эстеразы в лимфоцитах и др.), результат цитохимической реакции целесообразно выражать в процентах клеток, дающих положительную реакцию.

Метод полуколичественной оценки является ориентировочным, но позволяет сравнивать распределение исследуемых веществ в разных клеточных элементах или в одних и тех же клетках при различных патологических состояниях организма, а также в зависимости от течения заболевания, степени его тяжести и в связи с проводимой терапией.

Наиболее распространены цитоэнзиматические исследования, дающие возможность выя-

вить в клетках активность различных ферментов. Для этого чаще используют методы азосочетания, в которых специфический субстрат, взаимодействуя с ферментом, образует продукт реакции, который окрашивается солями диазония; по окраске судят о локализации фермента и его активности.

В настоящей главе приведены наиболее распространенные в клинической практике цитохимические методы исследования.

Л и т е р а т у р а. *Astaldi G., Verga L. Acta haematol.*, 1957, vol. 17, p. 129—136; *Kaplow L. Blood*, 1955, vol. 10, № 10, p. 1023—1029.

ЩЕЛОЧНАЯ ФОСФАТАЗА (К. Ф. 3.1.3.1.) содержится преимущественно в зрелых нейтрофильных лейкоцитах; активность фермента связывают со вторичными (специфическими) гранулами цитоплазмы. Относится к группе гидролитических ферментов с оптимумом действия при pH 9,6, осуществляет гидролиз однозамещенных эфиров ортофосфата. Наиболее распространено определение активности фермента методами азосочетания.

Метод азосочетания по Кеплоу. П р и н ц и п. Расщепление щелочной фосфатазой а-нафтилфосфата с освобождением а-нафтола, образующего с солями диазония нерастворимый окрашенный в коричневый цвет осадок в местах локализации фермента.

Р е а к т и в ы. 1. 10% раствор формалина в абсолютном метаноле. 2. 0,05 М раствор пропандиолового буфера (pH 9,75); готовят основной 0,2 М раствор (10,5 г 2-амино-2-метил-1,3-пропандиола растворяют в 500 мл дистиллированной воды), хранят его в холодильнике. Из основного раствора готовят 0,05 М раствор (25 мл основного раствора буфера смешивают с 5 мл 0,1 н. раствора HCl и доводят дистиллированной водой до 100 мл), хранят в холодильнике. 3. а-Нафтилфосфат. Можно использовать нафтол-AS-Фосфат, нафтол-AS-TR-фосфат или нафтол-AS-VI-фосфат. 4. Прочный синий RR; можно использовать отечественные красители диазоль синий 2С и диазоль синий 0. 5. 2% раствор метилового зеленого. 6. Инкубационная среда (готовят перед употреблением): 35 мг а-нафтилфосфата, 35 мг прочного синего RR, 35 мл буферного раствора.

С п е ц и а л ь н о е о б о р у д о в а н и е. Холодильник.

Х о д и с с л е д о в а н и я. Высохшие на воздухе мазки фиксируют в 10% растворе формалина в абсолютном метаноле при температуре 0—5 °С в течение 30 с. На высохшие мазки наносят инкубационную среду после фильтрования и оставляют мазки при комнатной температуре на 8—10 мин. Ополаскивают в проточной воде в течение 10 с. Докрашивают метиловым зеленым в течение 15 мин или гематоксилином Майера 3—4 мин.

Метод азосочетания (модификация М. Г. Шубича). П р и н ц и п с м. метод азосочетания по Кеплоу.

Р е а к т и в ы. 1. 0,5% раствор целлоидина в смеси равных количеств абсолютного спирта и эфира. Целлоидин можно готовить из кино-

и фотопленок по методике Меркулова: удалить слой эмульсии после вымачивания в горячей воде или щелочи, выдержать 5—10 дней в трех сменах хлороформа, промыть спиртом, высушить, мелко нарезать и растворить в смеси абсолютного спирта с эфиром. 2. 0,5 М раствор тетрабората pH 9,18 [19,1 г тетрабората натрия (бура) растворить и довести дистиллированной водой до 1 л]. Раствор стойкий. 3. 0,1% раствор а-нафтилфосфата в растворе тетрабората (готовят перед употреблением). 4. 0,2% раствор диазоля синего 0 в растворе тетрабората (готовят перед употреблением и фильтруют в защищенном от света месте). 5. Гематаль 8 Бейкера: один объем 0,1% гематеина, приготовленного на 50% водном растворе этиленгликоля, смешивают с одним объемом 1,6% водного раствора сульфата алюминия. Вместо гематала можно использовать гематоксилин: 1 г краски растворяют в 50 мл дистиллированной воды, доводят до кипения, доливают 50 мл дистиллированной воды, добавляют 0,02 г йодата натрия и 5 г алюмокалиевых квасцов, встряхивают до растворения и охлаждают. 6. Инкубационная среда (готовят перед употреблением); равные количества реактивов 3 и 4.

С п е ц и а л ь н о е о б о р у д о в а н и е. Холодильник.

Х о д о п р е д е л е н и я. Мазки фиксируют в 0,5% растворе целлоидина в течение 3—5 с. После фиксации целлоидин с обратной стороны предметного стекла удаляют салфеткой, стекла ставят в вертикальном положении на фильтровальную бумагу и дают им высохнуть. Инкубируют в инкубационной среде при комнатной температуре в защищенном от света месте в течение 30 мин. Промывают в проточной воде в течение 5—10 мин и ополаскивают в дистиллированной воде. Докрашивают ядра красителем (реактив 5). При использовании гематала 8 мазки окрашивают 18—24 ч, затем ополаскивают в дистиллированной и проточной воде и высушивают. При использовании гематоксилина мазки окрашивают 30—60 мин, ополаскивают в тетраборатном буфере, разведенном водопроводной водой, промывают водой и высушивают.

Н о р м а л ь н ы е в е л и ч и н ы. У здоровых людей большинство сегментоядерных нейтрофилов являются фосфатазоотрицательными и только в 20—30% клеток выявлена слабая активность фермента (+). По данным М. Г. Шубича и Б. С. Нагоева, активность фосфатазы для здоровых обоего пола составляет $26 \pm 0,6$ ед., или СПК $0,26 \pm 0,006$. Выявлено достоверное различие между показателями энзиматической активности у мужчин и женщин (соответственно $21 \pm 0,7$ и $31 \pm 0,8$ ед.).

К л и н и ч е с к о е з н а ч е н и е. Наибольшее диагностическое значение имеет определение активности фермента при гемобластозах; снижение активности характерно для хронического миелолейкоза, повышение — рассматривают как один из признаков эритремии. Повышение активности наблюдается также при воспалительных процессах, интоксикациях, опухолях, коллагенозах, циррозах печени. Показатель может быть использован как дифференциально-

диагностический признак при лейкомоидных реакциях (активность фермента повышена) и хроническом миелолейкозе. Снижение активности фермента часто сопутствует вирусному гепатиту, инфекционному мононуклеозу и другим вирусным инфекциям, лучевой болезни.

Л и т е р а т у р а. Буйкис И. М., Руденс Ю. Ф. Гистохимическое определение активности щелочной фосфатазы методом одновременного азосочетания.— Вопросы лейкологии (Рига), 1969, № 1, с. 369—376; Шубин М. Г.— Лаб. дело, 1965, № 1, с. 10—14; Шубин М. Г., Нагоев Б. С. Щелочная фосфатаза лейкоцитов в норме и патологии.— М.: Медицина, 1980, с. 41; Kaplow L. Blood, 1955, vol. 10, № 10, p. 1023—1029.

КИСЛАЯ ФОСФАТАЗА (К. Ф. 3.1.3.2). Обнаруживают преимущественно в нейтрофилах и лимфоцитах крови; локализацию связывают с лизосомами цитоплазмы клеток. Кислая фосфатаза является гидролитическим ферментом с оптимумом действия рН 5,2. Для цитохимического исследования чаще используют методы азосочетания.

Метод азосочетания Берстона (модификация Ю. Ф. Руденса, И. М. Буйкиса). **П р и н ц и п м.** *Метод азосочетания по Келлоу.*

Реактивы. 1. 0,1 М раствор цитратного буфера (рН 5,2). 2. 0,05 М раствор хлорида магния. 3. Нафтол-AS-Фосфат (можно использовать нафтол-AS-TR-фосфат или нафтол-AS-B1-фосфат. 4. Диметилформамид. 5. Диазол синий 2С или прочный синий ВВ. 6. Краситель Романовского — Гимзы. 7. Изотонический раствор хлорида натрия. 8. Инкубационная среда: 10 мг нафтол-AS-Фосфата, растворенного в 5 мл диметилформамида; 15 мл 0,1 М цитратного буфера рН 5,2, 45 мл дистиллированной воды, 5 мл раствора хлорида магния, 50 мг диазола синего. Готовят перед употреблением и используют после фильтрования.

Специальное оборудование. Термостат.

Ход исследования. Нефиксированные мазки инкубируют в инкубационной среде при 37 °С в течение 2 ч. Промывают изотоническим раствором хлорида натрия. Докрашивают красителем Романовского — Гимзы. Промывают в проточной воде. Активность фермента выявляется в виде синей окраски.

Нормальные величины. В сегментоядерных нейтрофилах активность фермента равна $38,6 \pm 2,82$ ед., или СЦК $0,386 \pm 0,028$, в лимфоцитах — $26,9 \pm 1,94$ ед., или СЦК $0,268 \pm 0,019$. У детей активность кислой фосфатазы в нейтрофилах выше, чем у взрослых.

Клиническое значение. Повышенные активности наблюдаются в нейтрофилах при воспалительных процессах, при туберкулезе, инфаркте миокарда, острых хирургических заболеваниях, злокачественных опухолях. При этом следует учитывать, что высокие цифры активности фермента могут быть результатом повышения активности щелочной фосфатазы в нейтрофилах, так как активность последней может выявляться и в кислой среде. Поскольку при

всех указанных выше заболеваниях наблюдается повышение активности и щелочной фосфатазы, а при цитохимическом методе исследования обоих ферментов используют единый субстрат, при получении высокой активности кислой фосфатазы М. Г. Шубич и И. В. Нестерова предлагают проводить повторное исследование после ингибирования щелочной фосфатазы с помощью ЭДТА.

Повышение активности кислой фосфатазы в лимфоцитах отмечается при иммунизации, различных аллергических заболеваниях.

В властных клетках при острых лейкозах характер распределения продукта реакции различен в зависимости от формы лейкоза. При острых лимфобластных формах активность выявляется в гранулярной форме, при миелобластных — в диффузной форме.

Л и т е р а т у р а. Берстон М. Гистохимия ферментов.— М.: Мир, 1965, с. 215; Руденс Ю. Ф., Буйкис И. М. Вопросы лейкологии (Рига), 1969, № 1, с. 377—383; Шубин М. Г., Нестерова И. В. Лаб. дело, 1980, № 3, с. 150—154.

ПЕРОКСИДАЗА (МИЕЛОПЕРОКСИДАЗА) (К. Ф. 1.11.1.7). Фермент, локализующийся преимущественно в специфической зернистости цитоплазмы гранулоцитов и являющийся маркером клеток миелоидной природы. Миелопероксидаза разрушает токсическую перекись водорода, образующуюся внутриклеточно в процессе жизнедеятельности клеток.

Метод Грэхема — Кнолля. **П р и н ц и п.** В присутствии пероксидазы бензидин окисляется перекисью водорода в коричневый оксибензидин.

Реактивы. 1. 4% формалиново-спиртовой раствор (10 частей 40 % формалина и 90 частей 96 % спирта). 2. Реактив на пероксидазу: бензидин (на кончике ножа) растворяют в 6 мл 96 % спирта, прибавляют 4 мл воды и 0,02 мл 3 % перекиси водорода. Реактив годен к употреблению в течение 5—6 дней. 3. Краситель Романовского — Гимзы.

Специальное оборудование. Не требуется.

Ход определения. Свежие мазки (1—2-дневной давности) фиксируют 4 % формалиново-спиртовым раствором в течение 30 с. Обмывают в проточной воде и высушивают. Заливают реактивом на пероксидазу на 5 мин. Тщательно промывают в проточной воде и высушивают. Докрашивают красителем Романовского — Гимзы. Пероксидаза выявляется в цитоплазме клеток в виде коричневых гранул.

Модифицированный метод Нарциссова. **П р и н ц и п** метод Грэхема — Кнолля. Для уменьшения инактивации фермента использованы соответствующий фиксатор и небольшое количество перекиси водорода.

Реактивы. 1. 60 % водный раствор ацетона. 2. 0,1 М раствор бората натрия (можно использовать фосфатный или миналовый буферный раствор рН 7,6). 3. 5 % водный раствор трилона Б. 4. Насыщенный водный раствор бензидина. 5. 0,003 % раствор перекиси водорода (разводят перед употреблением из 3 % раствора в два этапа). 6. Инкубационная среда:

мл 5 % водного раствора трилона Б, 10 мл раствора бората натрия, 35 мл насыщенного раствора бензидина и 2 мл раствора перекиси водорода. 7. 0,5 % раствор метилового зеленого на буферном растворе (рН 5,0) или 0,1 % водный раствор метиленового синего.

Специальное оборудование. Термостат.

Ход определения. Свежеприготовленные мазки фиксируют в 60 % водном растворе ацетона в течение 30 с. Промывают дистиллированной водой. Инкубируют в инкубационной среде в течение 1 ч в термостате при 37 °С. Промывают дистиллированной водой. Докрашивают мазки метиловым зеленым или метиленовым синим в течение 10 мин. Можно исследовать недокрашенные мазки.

Модифицированный метод [Шафран М. Г. и соавт., 1979]. Принцип см. *Метод Грэхема — Кнолля*. Бензидин заменен О-дианизидином.

Реактивы. 1. 10% спиртовой раствор формалина (1 мл 10 % формалина и 9 мл этилового спирта). 2. Спиртовой раствор О-дианизидина (можно использовать препарат Шосткинского завода химреактивов; белые или желтоватые кристаллы препарата быстро окисляются на воздухе, при изменении окраски он становится непригодным). 24 мг О-дианизидина растворяют в 5 мл метанола и доводят дистиллированной водой до 9,9 мл. 3. 3 % раствор перекиси водорода. 4. Реакционная смесь: к спиртовому раствору О-дианизидина прибавляют перед употреблением 0,1 мл перекиси водорода. 5. 0,25 % водный раствор азура А или другой ядерный краситель.

Специальное оборудование. Не требуется.

Ход определения. Мазки фиксируют спиртовым раствором формалина в течение 10—15 с. Споласкивают проточной водой. На мазки наносят реакционную смесь на 2—3 мин при комнатной температуре. Споласкивают проточной водой. Докрашивают раствором азура в течение 10—15 с. Споласкивают проточной водой и высушивают.

Нормальные величины. В крови здоровых людей активность пероксидазы выявляется преимущественно в цитоплазме гранулоцитов и в меньшей степени — моноцитов. Фермент появляется в кровяных клетках на стадии промиелоцитов и у ряда миелобластов (более зрелых). Не содержат фермента недифференцированные бласты, часть миелобластов и лимфобласты; 3—16 % нейтрофилов окрашены резко положительно (+++), 60—90 % — положительно (++) и остальные — слабopоложительно (+). СЦК нейтрофилов здоровых людей равен $2,56 \pm 0,033$. Эозинофилы характеризуются резко положительной реакцией на пероксидазу.

Клиническое значение. Активность фермента в нейтрофилах снижена при инфаркте миокарда, ревматизме, туберкулезе, опухолях. У больных хроническим миелолейкозом, особенно в терминальной стадии, СЦК снижается до $1,63 \pm 0,19$ ед. В бластных клетках

активность фермента высокая при остром миелобластном лейкозе, *слабая* — при остром монобластном и отсутствует — при остром лимфобластном лейкозе.

Литература. *Нарциссов Р. П.* Лаб. дело, 1964, № 3, с. 150—151; *Шафран М. Г., Пигаревский В. Е., Блинова Э. И.* Цитология, 1979, т. 21, № 10, с. 1206—1208; *Тодоров И.* Клинические лабораторные исследования в педиатрии.— София, 1963, с. 468.

НЕСПЕЦИФИЧЕСКИЕ ЭСТЕРАЗЫ. Труппа ферментов, гидролизующих эфиры карбоновых кислот; отличаются небольшой специфичностью. Локализуются в цитоплазме клеток, главным образом в лизосомах. Наибольшая активность обнаружена в моноцитах крови. Для определения активности ферментов используют различные субстраты (а-нафтилацетат, нафтол-AS-ацетат, нафтол-AS-D-хлорацетат, б-нафтилацетат и др.).

а-Нафтилацетат-эстераза (метод Леффлера). Принцип. Соединение а-нафтилацетата при определенных рН и температуре под влиянием неспецифических эстераз гидролизуетсся с образованием свободного нафтола, который с солями диазония дает цветное окрашивание.

Реактивы. 1. Формалин промышленного производства (40%). 2. а-Нафтилацетат. 3. Ацетон х. ч. 4. 0,1 М раствор фосфатного буфера (рН 7,8—8,0). 5. Прочный синий ВВ (или прочный красный ТР). 6. Ядерный краситель (гемалаун кислый, метиловый зеленый и пр.). 7. Инкубационная среда: 10 мг а-нафтилацетата, растворенного в 0,2 мл ацетона; 40 мл буферного раствора (реактив № 4), встряхивают до растворения; 50 мг соли диазония (реактив № 5), встряхивают до растворения и фильтруют.

Специальное оборудование. 1. Весы. 2. Эксикатор.

Ход определения. Свежеприготовленные и высушенные на воздухе мазки фиксируют в парах формалина 4 мин (фиксированные препараты можно сохранять в холодильнике несколько недель или 2 сут при комнатной температуре). Инкубируют в инкубационной среде при комнатной температуре 30 мин. Промывают в проточной воде (2—3 мин). Докрашивают кислым гемалауном 8 мин. Промывают дистиллированной водой 15 мин. Активность фермента выявляется в виде коричнево-черных (при употреблении прочного синего) или красно-коричневых (при употреблении прочного красного) гранул в цитоплазме клеток.

Нормальные величины. В моноцитах периферической крови активность фермента содержится в виде мелкой обильной зернистости. СЦК в моноцитах составляет $0,95 \pm 0,01$. Небольшое количество лимфоцитов ($18,0 \pm 0,4$ %) содержит активность фермента в виде единичных гранул в цитоплазме; в тромбоцитах периферической крови фермент выявляется в виде мелких гранул, в сегментоядерных нейтрофилах его активность ничтожна.

Среди костномозговых элементов наибольшую активность имеют промиелоциты, миелоциты, мегакариоциты, моноциты, ретикулярные

клетки. В моноцитах периферической крови и костного мозга с помощью двойной инкубации и добавления фторида натрия (NaF) в количестве 1,5 мг/мл показан NaF — чувствительный фермент.

Клиническое значение. Снижение активности фермента в моноцитах и увеличение в лимфоцитах обнаружено при диффузных поражениях печени. Значительная активность фермента выявлена в миеломных клетках при плазмочитоме, в бластных клетках при остром монобластном (гистиомонобластном) лейкозе и при промиелоцитарном лейкозе, в то время как при остальных формах острых лейкозов активность фермента в бластных клетках ничтожна. При хроническом лимфолейкозе активность фермента в лимфоцитах резко снижена. Ферментативная активность нейтрофилов при острых лейкозах, особенно при остром миелобластном, снижена.

Литература. *Lofler H.* Klin. Wschr., 1961, Bd 29, N. 23, S. 1220—1227.

КИСЛАЯ а-НАФТИЛАЦЕТАТ-ЭСТЕРАЗА. Фермент локализуется главным образом в лизосомах цитоплазмы клеток и участвует в гидролизе алифатических эфиров.

Метод Кулленкампа и соавт. Принцип. Из соединения а-нафтилацетата при кислотном pH под влиянием фермента образуется свободный нафтол, дающий цветное окрашивание с фуксином.

Реактивы. 1. 2,5% раствор глутаральдегида (pH 7,2). 2. 4% раствор солянокислого фуксина. 3. 4% раствор нитрата натрия. 4. 0,7 М фосфатный буфер (pH 5,0). 5. сx-Нафтилацетат. 6. 2% раствор метилового зеленого. 7. Инкубационная среда: 2 мл реактива № 2, 2 мл реактива № 3, 40 мл реактива № 4. 10 мг а-нафтилацетата, растворенного в 0,4 мл ацетона. Инкубационная среда должна иметь pH 5,8 и готовиться перед употреблением.

Специальное оборудование. 1. Холодильник. 2. Весы. 3. Эксикатор.

Ход определения. Высушенные на воздухе мазки фиксируют в глутаральдегиде (реактив № 1) при температуре 4 °С в течение 10 мин (нефиксированные мазки можно хранить в холодильнике 1—2 мес). Промывают дистиллированной водой. Инкубируют в инкубационной среде в течение 1 $\frac{1}{2}$ —6 ч. Промывают дистиллированной водой. Докрашивают метиловым зеленым.

Нормальные величины. В цитоплазме лимфоцитов активность фермента выявляется в виде темно-красных гранул, в нейтрофилах и моноцитах — в виде диффузной окраски. СЧК лимфоцитов равен 0,57 ± 0,04. Активность фермента увеличивается при увеличении времени инкубации. Так, при инкубации в течение 1 $\frac{1}{2}$ ч активность фермента выявлена в 49,83 ± 2,75% лимфоцитов, при удлинении срока инкубации до 6 ч эстеразоположительными становятся 79,7 ± 1,52% лимфоцитов. Использование в качестве фиксатора формалина дает более стабильные результаты.

Клиническое значение. Снижение активности фермента в лимфоцитах характерно для хронического лимфолейкоза (В-клеточного варианта); при Т-клеточных пролиферациях активность неспецифической кислой эстеразы в лимфоцитах повышена.

Литература. *Потанова С. Г., Шахбазян Г. П., Демидова Н. В., Козинец Г. И.* Лаб. дело, 1981, № 2, с/74—76; *Kullenkam.pl I., Janassi G., Greaves H.* Brit. J. Haemat., 1977, vol. 36, p. 231—240.

НАФТОЛ-АС АЦЕТАТ-ЭСТЕРАЗА. Метод Леффлера. Принцип и оборудование такие же, как для определения а-нафтилацетат-эстеразы.

Реактивы. 1. Формалин промышленного производства (40%). 2. 0,1 М фосфатный буфер (pH 6,8—7,0). 3. Ацетон х. ч. 4. Нафтол-АС-ацетат (можно использовать нафтол-АС-D-ацетат). 5. Прочный синий ВВ. 6. Ядерный краситель. 7. Инкубационная среда: 4 мг нафтол-АС-ацетата, растворенного в 0,4 мл ацетона, 40 мл буферного раствора (реактив № 2); встряхивают и добавляют 80 мг прочного синего ВВ, встряхивают и фильтруют.

Ход определения. Высушенные на воздухе (в течение 1—3 ч) мазки фиксируют в парах формалина несколько минут. Помещают в инкубационную среду на 60 мин при комнатной температуре. Промывают в проточной воде. Докрашивают ядерным красителем.

Нормальные величины. Так же, как и а-нафтил-эстераза, фермент локализуется главным образом в моноцитах крови. По сравнению с активностью а-нафтилацетат-эстеразы активность нафтол-АС-ацетат-эстеразы в сегментоядерных нейтрофилах несколько выше, а в лимфоцитах — слабее. В клетках костного мозга фермент обнаружен в мегакариоцитах, ретикулярных и плазматических клетках, а также незрелых гранулоцитах.

Клиническое значение. Значительная активность фермента характерна для бластных клеток при остром монобластном (гистиомонобластном) лейкозе; при остром промиелоцитарном лейкозе; при других формах острых лейкозов активность фермента в бластных клетках не выявляется.

Литература. *Loffler H.* Klin. Wschr., 1961, Bd 39, N. 23, S. 1220—1227.

НАФТОЛ-АС D-ХЛОРАЦЕТАТ-ЭСТЕРАЗА. Метод Молони с соавт. Принцип и оборудование такие же, как для определения а-нафтилацетат-эстеразы.

Реактивы. 1. 10% раствор формалина в метаноле (сохраняют в холодильнике). 2. Буферный раствор Михаэлиса (pH 7,4). 3. Нафтол-АС-D-хлорацетат. 4. Ацетон х. ч. 5. Гранатовый прочный ГВС или синий прочный ВВ. 6. Ядерный краситель. 7. Инкубационная среда: 10 мг нафтол-АС-D-хлорацетата, растворенного в 0,5 мл ацетона, 10 мл буферного раствора (реактив № 2), разведенного пополам дистиллированной водой (добавляют по каплям), 10 мг

реактива № 5; быстро встряхивают во избежание образования осадка, смесь фильтруют.

Специальное оборудование. Не требуется.

Ход определения. Свежеприготовленные и высушенные на воздухе мазки фиксируют в холодном 10 % растворе формалина в метаноле в течение 30 с и затем высушивают. Фиксированные препараты можно сохранять несколько месяцев. Помещают в инкубационную смесь при комнатной температуре на 30 мин. Промывают в проточной воде. Докрашивают ядерным красителем.

Нормальные величины. Фермент выявляется в виде синих или фиолетовых гранул в цитоплазме сегментоядерных нейтрофилов, лимфоциты и моноциты фермента не содержат. В мазках пунктата костного мозга здоровых людей наибольшую активность фермента обнаруживают в промиелоцитах. По мере созревания гранулоцитов активность нафтол-AS-D-хлор-ацетат-эстеразы несколько снижается, но остается довольно высокой. Наиболее высокая интенсивность реакции наблюдается при фиксации в парах формалина при комнатной температуре. Время фиксации до 10 мин не оказывает влияния на уровень активности фермента, лишь при фиксации в течение 30 мин и дольше активность фермента снижается.

Клиническое значение. Высокая активность фермента обнаружена в властных клетках при промиелоцитарном остром лейкозе, ничтожная — при остром монобластном; при других формах острых лейкозов в властных клетках активность не выявлена.

Литература. Руденс Ю. Ф., Буйкис И. М. Лаб. дело., 1971, № 10, с. 592; Moloney W. C. et al. J. Histochem. Cytochem., 1960, vol. 8, p. 200—207; Schmalzl F., Braunsteiner H. Klin. Wschr., 1968, Bd 46, H. 12, S. 642—650.

ДЕГИДРОГЕНАЗЫ — группа окислительно-восстановительных ферментов, локализующихся в митохондриях цитоплазмы клеток. Для исследования различных дегидрогеназ используют метод Нахласа с соавт. в модификациях, основанный на реакции восстановления солей тетразолия и выпадения осадка диформазана в местах активности ферментов.

СУКЦИНАТДЕГИДРОГЕНАЗА (СДГ; КФ. 1.3.9.9.1). Метод Нахласа с соавт. (модификация Кваглино, Хейхо). Принцип. Активность фермента оценивается по реакции восстановления солей тетразолия в виде осадка диформазана синего цвета.

Реактивы. 1. 60 % водный раствор ацетона. 2. 0,2 М фосфатный буфер (рН 7,4). 3. 0,2 М раствор сукцината натрия. 4. 0,6 М раствор бикарбоната натрия. 5. 0,03 М раствор хлорида алюминия. 6. 0,03 М раствор хлорида кальция. 7. Тетразолий нитро ВТ. 8. 0,1 % раствор прочного красного. 9. Инкубационная среда: 10 мл реактива № 3, 2 мл реактива № 4, 0,2 мл реактива № 5, 0,2 мл реактива № 6, 10 мг тетразолия в 10 мл дистиллированной воды, дистиллированной воды до 40 мл.

Специальное оборудование. Термостат.

Ход определения. Свежеприготовленные и высушенные на воздухе мазки фиксируют в ацетоне при комнатной температуре 30—60 с. Промывают в дистиллированной воде и высушивают на воздухе. Инкубируют в инкубационной среде в течение 1 ч при 37 °С. Промывают дистиллированной водой. Докрашивают 0,1 % раствором прочного красного 10 мин.

Метод Нахласа с соавт. (модификация Р. П. Нарциссова). Принцип тот же.

Реактивы. 1. 60 % раствор ацетона, насыщенный трилоном Б. 2. 1/15 М фосфатный буфер (рН, 7,2). 3. Сукцинат натрия. 4. Паранитротетразолий фиолетовый. 5. Трилон Б. 6. 0,5 % раствор метилового зеленого на ацетатном буфере (рН 5,0). 7. Инкубационная среда: 540 мг сукцината натрия растворяют в 10 мл дистиллированной воды, добавляют 10 мл буферного раствора (реактив № 2) и 10 мл раствора пара-нитротетразолия в дистиллированной воде (1 мг/мл), 13 мг трилона Б (рН довести до 7,2) и дистиллированной воды до 40 мл. Среда может быть пригодна 1—2 нед при хранении в холодильнике.

Специальное оборудование. 1. Термостат или водяная баня. 2. Холодильник.

Ход определения. Фиксируют мазки ацетоном (реактив № 1) при комнатной температуре в течение 30 с. Ополаскивают дистиллированной водой 3—5 с и высушивают. Инкубируют в инкубационной среде в течение 1 ч при 37 °С. Промывают проточной водой в течение 1 мин. Ополаскивают дистиллированной водой 3—5 с. Докрашивают метиловым зеленым 5—10 мин. Промывают в проточной воде. Дополнительно фиксируют мазки парами формалина в течение 30 мин (для предотвращения растворения формазана нитротетразолия фиолетового в иммерсионном масле).

а-ГЛИЦЕРОФОСФАТДЕГИДРОГЕНАЗА (а-ГФДГ). Метод Нахласа с соавт. (модификация Р. П. Нарциссова). Принцип см. *Сукцинатдегидрогеназа*.

Реактивы. 1. 60 % раствор ацетона, насыщенный трилоном Б. 2. 1/15 М фосфатный буфер (рН 7,2). 3. а-Глицерофосфат натрия. 4. Пара-нитротетразолий фиолетовый. 5. Трилон Б. 6. 0,5 % раствор метилового зеленого на ацетатном буфере (рН 5,0). 7. Инкубационная среда: 630 мг а-глицерофосфата натрия растворяют в 10 мл дистиллированной воды, добавляют 10 мл буферного раствора (реактив № 2), 10 мл раствора пара-нитротетразолия в дистиллированной воде (1 мг/1 мл), 13 мг трилона Б (рН доводят до 7,2) и дистиллированной воды до 40 мл. Среда пригодна в течение 1—2 нед при хранении в холодильнике.

Оборудование и ход определения см. Сукцинатдегидрогеназа (модификация Р. П. Нарциссова).

Нормальные величины. У здоровых СДГ и а-ГФДГ выявляются в виде гранул в нейтрофилах, лимфоцитах, тромбоцитах перифери-

ческой крови и миелобластах, гранулоцитах, мегакариоцитах, эритро- и нормобластах костного мозга.

СЦК СДГ лимфоцитов составляет $1,1 \pm 0,05$; а-ГФДГ— $0,8 \pm 0,08$. У детей активность фермента СДГ обнаружена в 46 % лимфоцитов. У здоровых взрослых в пунктате костного мозга около 88 % недифференцированных клеток имеют активность фермента (+), все ядерные элементы эритроидного ряда и гранулоциты проявляют активность на (+) и (++).

Клиническое значение. Снижение активности ферментов в лимфоцитах отмечено в период приступа бронхиальной астмы, при хроническом лимфолейкозе. Повышение активности ферментов обнаружено у больных злокачественными опухолями в гранулоцитах, снижение активности — при хроническом миелолейкозе.

Литература. *Нарциссов П. П.* Арх. анат., 1969, № 5, с. 85—91; *Nachlas M. M. et al.* j. Histochem., Cytochem., 1957, vol. 5, p. 420—436; *Quaglino D., Hayhoe F.* Nature, 1960, vol. 187, № 4731, p. 85—86.

ГЛИКОГЕН локализуется в цитоплазме клеток и играет важную роль в энергетическом метаболизме клеток. При цитохимическом исследовании гликогена используют главным образом PAS- или ШИК-реакцию (по названию реактивов— шифф-йодная кислота).

Метод Шабаша. Принцип. Под влиянием периодата калия гликоген окисляется с образованием альдегидных соединений, легко реагирующих с реактивом Шиффа (фуксин-сернистая кислота). В местах локализации гликогена выявляется вишнево-фиолетовое окрашивание.

Реактивы. 1. 0,03 М раствор периодата калия или натрия: 230 мг периодата растворяют в 100 мл дистиллированной воды. Готовят перед употреблением. 2. 1 н. HCl: 82,5 мл концентрированной HCl отн. плотности 1,19 доливают дистиллированной водой до 1 л. 3. Основной фуксин (для фуксин-сернистой кислоты). 4. Метабисульфит калия. 5. Реактив Шиффа; 1 г основного фуксина растворяют в 200 мл кипящей дистиллированной воды. По мере охлаждения в раствор добавляют 1 г метабисульфита калия и 20 мл 1 н. HCl. Оставляют на сутки. Для полного обесцвечивания добавляют растолченную таблетку карболона, оставляют на сутки, затем фильтруют. Реактив сохраняют в темноте (лучше на холоде) в плотно закрытой посуде. Годен к употреблению в течение нескольких месяцев (легкая степень покраснения свидетельствует о непригодности реактива). 6. Сернистая вода: к 10 мл 10 % раствора метабисульфита калия добавляют 200 мл дистиллированной воды и 10 мл 1 н. HCl. Готовят перед употреблением. 7. 0,1 % спиртовой раствор светло-зеленой краски (лихтгрюн).

Специальное оборудование. 1. Горелки. 2. Термостат. 3. Весы.

Ход определения. Препараты фиксируют (тогдаш после приготовления) в абсолютном спирте в течение 30 мин. Промывают в двух сменах дистиллированной воды. Погружают в

раствор периодата на 20 мин (в темноте). Промывают в трех сменах дистиллированной воды. Ополаскивают в сернистой воде (в течение 1—2 мин). Окрашивают реактивом Шиффа в течение 30—40 мин (в темноте). Промывают в трех сменах сернистой воды по 3 мин. Промывают в трех сменах дистиллированной воды по 3 мин. Окрашивают светло-зеленой краской в течение 10—20 с. Промывают в дистиллированной воде. Гликоген окрашивается в вишнево-фиолетовый цвет на зеленом фоне препарата. Кроме гликогена, положительную реакцию могут давать такие ШИК-положительные вещества, как крахмалы и нейтральные мукополисахариды, мукопротеины, гликопротеины и др. Гликоген легко отдифференцировать от других веществ пробой со слюной или диастазой.

Проба со слюной. Препарат помещают в свежесобранную слюну и оставляют на 30 мин в термостате. Затем производят окраску на гликоген приведенным выше методом. Инкубация препаратов со слюной способствует расщеплению гликогена, и при реакции с реактивом Шиффа не получается розовой окраски.

Идентифицировать гликоген можно также путем предварительной инкубации мазков с *диастазой* (а-амилаза; К. Ф. 3.2.1.1) (1 мл профильтрованной диастазы растворить в 40 мл изотонического раствора хлорида натрия) в течение 30 мин в термостате.

Нормальные величины. В мазках периферической крови гликоген содержится в цитоплазме нейтрофилов (в виде обильной мелкой зернистости), цитоплазме лимфоцитов (в виде небольшого количества крупных зерен). В пунктате костного мозга гликоген выявляется в нейтрофилах разной степени зрелости, лимфоцитах и мегакариоцитах. У здоровых людей количество интенсивно окрашенных нейтрофилов крови (+++) колеблется в пределах 2—12 %, средней интенсивности окраски (++) — в пределах 72—90 %, слабо окрашенных (+) — от 4 до 18%. СЦК равен 1,71—2,04.

В лимфоцитах крови здоровых людей гликоген содержится в виде небольшого числа гранул в $10,4 \pm 2,3$ % клеток. В мегакариоцитах костного мозга гликоген обнаруживается в виде гранул (от единичных до 30—50), напоминающая скопления кровяных пластинок. У здоровых людей число гликогенположительных мегакариоцитов составляет $62,0 \pm 3,55$ %.

Клиническое значение. Увеличение содержания гликогена в нейтрофилах наблюдается при различных воспалительных процессах, эритремии, сахарном диабете, уменьшение — при агранулоцитозах, лучевой болезни, при хроническом миелолейкозе, особенно при прогрессировании процесса. Повышение числа гликогенположительных лимфоцитов (до 70—80 %) характерно для лимфопролиферативных заболеваний, особенно хронического лимфолейкоза. При тромбоцитопенической пурпуре и симптоматических тромбоцитопениях число гликогенположительных форм мегакариоцитов значительно снижено, после спленэктомии оно повышается до нормальных величин.

При острых лейкозах гликоген можно обнаружить в властных клетках: при остром миелобластном лейкозе — в виде мелкой зернистости в цитоплазме или в виде диффузного ее окрашивания, при остром лимфобластном лейкозе — в виде крупных гранул, расположенных в цитоплазме вокруг ядра, при остром монобластном варианте бластные клетки содержат гликогена немного в виде диффузной окраски, при эритромиелозе гликоген в виде гранул обнаруживается в эритробластах.

Л и т е р а т у р а. *Шабаташ А. Л.* Изв. АН СССР, серия биол., 1947, № 6, с. 745—760; *Шабаташ А. Л.* Докл. АН СССР, 1949, т. 68, № 2, с. 389—392.

КАТИОННЫЙ БЕЛОК. Неферментный катионный белок локализуется в лизосомах гранулоцитов и играет важную роль в реализации фагоцитарной функции клеток. При цитохимическом исследовании катионных белков используют методы, основанные на применении диахромных анионных красителей.

Метод Пигаревского (модифицированный). Принцип. Избирательная окраска катионного белка гранулоцитов прочным зеленым при рН 8,1—8,2.

Р е а к т и в ы. 1. Спиртовой раствор формалина (1 мл формалина и 19 мл абсолютного этилового спирта). 2. 0,2 М раствор триса (оксиметил) аминокетана растворяют в 1 л дистиллированной воды. 3. 0,1 н. НСl. 4. Метаноловый трис-буфер (25 мл реактива № 2 смешивают с 22,5 мл реактива № 3 и 52,5 мл метанола). 5. Забуференный спиртовой раствор прочного зеленого (рН 8,1—8,2): 100 мг прочного зеленого растворяют в 100 мл реактива № 4. Определяют рН через сутки после приготовления реактива и выравнивают его добавлением в раствор порошка сухого триса (при рН ниже 8,1) или слабого раствора НСl (рН выше 8,2). Установленная величина рН стабильна при работе в течение 4 мес. Раствор хранить в стеклянной посуде с притертой пробкой (можно при комнатной температуре). 6. 0,25 % водный раствор азура А: 250 мг азура А растворяют в 100 мл дистиллированной воды. Краситель стойкий.

С п е ц и а л ь н о е о б о р у д о в а н и е. 1. рН-Метр. 2. Весы.

Х о д о п р е д е л е н и я. Высушенные на воздухе мазки фиксируют в спиртовом растворе формалина 10—15 с. Во избежание фоновой окраски можно использовать свежеприготовленные нефиксированные мазки (не позже чем через 48 ч после приготовления, препараты более длительного срока необходимо фиксировать). Мазки окрашивают забуференным спиртовым раствором прочного зеленого (реактива № 5) в течение 20 мин. Быстро ополаскивают дистиллированной водой. Окрашивают водным раствором азура А в течение 15—20 с. Смывают мазки дистиллированной водой и высушивают. При микроскопии с желтым или оранжевым светочувствительным катионный белок в цитоплазме клеток имеет вид ярко-зеленых гранул.

В о с п р о и з в о д и м о с т ь м е т о д а: коэффициент вариации $V=2,9\%$ для нормальных

величин и $5,2\%$ для патологических (не превышает допустимой величины).

Н о р м а л ь н ы е в е л и ч и н ы. У взрослых в возрасте 20—30 лет СЦК равен для мужчин $1,58 \pm 0,01$ и для женщин $1,58 \pm 0,03$. Более высокие значения получены у детей в возрасте 1—12 мес ($1,89 \pm 0,03$) и 1—3 лет ($1,96 \pm 0,03$).

Метод с бромфеноловым синим (по М. Г. Шубину). Принцип. Избирательная окраска катионного белка бромфеноловым синим.

Р е а к т и в ы. 1. 5 % раствор сульфосалициловой кислоты (5 г сульфосалициловой кислоты растворяют в 95 мл дистиллированной воды). 2. 0,05 М раствор буры рН 9,55 (19,1 г буры растворяют в 1 л дистиллированной воды). 3. 0,1 М раствор однозамещенного фосфата калия ($13,6 \text{ г } \text{KH}_2\text{PO}_4$ растворяют в 1 л дистиллированной воды). 4. 0,05 М боратный буфер рН 8,2 (6,13 мл реактива № 2 добавляют 3,87 мл реактива № 3, а затем доводят реактивом 3 до рН 8,2). 5. 0,1 % раствор бромфенолового синего в 0,05 М боратном буфере (100 мг сухого бромфенолового синего растворяют в 100 мл реактива № 4). 6. 1 % водный раствор сафранина или 0,05 % раствор основного фуксина. Последний готовят перед употреблением: растворяют 50 мг основного фуксина в 100 мл кипящей дистиллированной воды.

С п е ц и а л ь н о е о б о р у д о в а н и е. 1. рН-Метр. 2. Весы. 3. Газовая или электрическая плита.

Х о д о п р е д е л е н и я. Фиксируют мазки в 5 % растворе сульфосалициловой кислоты в течение 60—90 с. Тщательно промывают дистиллированной водой и высушивают. Окрашивают 0,1 % раствором бромфенолового синего в боратном буфере (реактив № 5) в течение 1—2 мин. Промывают в трех смехах 0,05 М боратного буфера (реактив № 4) по 1—3 мин. Высушивают и докрашивают 1 % раствором сафранина в течение 30—60 с или 0,05 % раствором основного фуксина в течение 1—2 с. Промывают проточной водопроводной водой и высушивают. Катионный белок выявляется в цитоплазме клеток в виде синих гранул.

В о с п р о и з в о д и м о с т ь м е т о д а. Относительная стандартная ошибка для группы здоровых составила $5,2\%$.

Н о р м а л ь н ы е в е л и ч и н ы. У здоровых в нейтрофилах обнаружено $123 \pm 1,5$ ед. или СЦК $1,23 \pm 0,015$, при этом не отмечено различий у здоровых обоего пола. Протеинположительные нейтрофилы составляют у мужчин $83 \pm 1,4\%$, у женщин $86 \pm 0,6\%$.

К л и н и ч е с к о е з н а ч е н и е. Снижение катионного белка в нейтрофилах характерно для острого воспалительного процесса; наблюдается в разгаре различных инфекционных заболеваний бактериальной и вирусной этиологии. Период выздоровления сопровождается нормализацией показателя. Изменения содержания лизосомального катионного белка коррелируют со степенью тяжести заболевания.

Л и т е р а т у р а. *Мазинг Ю. А., Старосельская И. Я.* Лаб. дело, 1981, № 10, стр. 582—584; *Нагоев Б. С.* Катионный белок лейкоцитов

и его значение: Методические указания.— Нальчик, 1982.— 67 с.; *Пигаревский В. Е., Мазинг Ю. А.* Лаб. дело, 1981, № 10, с. 579—582; *Шубин М. Г.* Цитология, 1974, № 10, с. 1321—1322.

ЛИПИДЫ локализуются в цитоплазме клеток главным образом в мембранах органелл и обнаруживаются преимущественно в нейтрофильных гранулоцитах. Играют важную роль в проницаемости мембран. Цитохимическое исследование основано на применении красящих веществ, растворяющихся в жирах (судан III, судан IV, черный судан и др.). Для выявления нейтрального жира пользуются судаком III, окрашивающим жир в оранжевый цвет. Липиды выявляются лучше Суданом черным (черное окрашивание).

Окраска судаком 111 (метод Гольдмана). Принцип. Растворение жиров и окраска судаком III в оранжевый цвет.

Реактивы. 1. Формалиновый спирт (1 часть формалина и 4 части 96% спирта). 2. 70% этиловый спирт (к 100 мл 96% спирта прибавить 39,18 мл дистиллированной воды). 3. сх-Нафтол. 4. Раствор Судана (к 100 мл 70% спирта добавляют 20 мл дистиллированной воды, 1,2 г а-нафтола и в избытке судан III. Раствор кипятят в течение 10 мин и фильтруют). 5. Краситель Романовского — Гимзы.

Специальное оборудование не требуется.

Ход определения. Мазки крови фиксируют в формалиновом спирте в течение 1—3 мин. Красят в растворе Судана III в течение 10 мин. Помещают в 70% этиловый спирт на 1 мин. Докрашивают красителем Романовского — Гимзы или гематоксилином в течение 5—10 мин. Промывают дистиллированной водой. Липиды выявляются в виде оранжевых зерен.

Нормальные величины. В мазках периферической крови липиды содержатся в цитоплазме нейтрофилов в виде обильной зернистости. Большинство нейтрофилов (69—80%) у здоровых людей красятся интенсивно (+++). 18—36% дают окраску средней интенсивности (++) и 10% слабо окрашены (+). СЦК липидов в нейтрофилах $2,65 \pm 0,033$. В мазках костного мозга в миелоцитах обнаружено небольшое содержание липидов, в промиелоцитах их больше и по мере созревания нейтрофилов содержание липидов увеличивается.

Клиническое значение. Повышение содержания липидов в нейтрофилах наблюдается при острых лейкозах и обострении хронических лейкозов. При острых лейкозах липиды в властных клетках обнаружены у больных при миелобластном и монобластном вариантах и не выявлены при лимфобластном остром лейкозе. При недифференцированном остром лейкозе властные клетки лишь в небольшом количестве ($2,2 \pm 0,82$ %) содержат липиды. Уменьшение липидов в нейтрофилах выявлено при ревматизме, воспалительных процессах.

Литература. *Роскин Г. И., Левинсон Л. Б.* Микроскопическая техника.— М., 1957, с. 257.

ТЕСТ ВОССТАНОВЛЕНИЯ НИТРОСИНЕГО ТЕТРАЗОЛИЯ (НСТ-тест) дает возможность судить о фагоцитарной и метаболической функции гранулоцитов по образованию в цитоплазме гранул формазана.

Метод Парка с соавт. в модификации Ю. И. Бажоры И соавт. Принцип. Поглощение гранулоцитами нитросинего тетразолия и восстановление его в формазан, выявляемый в виде гранул синего цвета.

Реактивы. 1. Гепарин (20—25 ЕД/мл). 2. 0,15 М фосфатный буфер рН 7,2. 3. 0,2% раствор нитросинего тетразолия. 4. Изотонический раствор хлорида натрия. 5. Метанол. 6. 2% раствор метилового зеленого.

Специальное оборудование. 1. Термостат. 2. Полистироловые пластинки (применяемые для РТГА).

Ход определения. В лунку пластинки вносят 0,025 мл раствора гепарина и 0,1 мл крови, 0,05 мл фосфатного буфера и 0,05 мл раствора тетразолия. Содержимое лунки перемешивают с помощью пипетки. Пластинку накрывают фильтровальной бумагой, смоченной изотоническим раствором хлорида натрия и стеклянной пластинкой соответствующих размеров. Для создания влажной камеры стеклянную пластинку прижимают с помощью пружинных зажимов. Инкубируют в термостате при 37°C в течение 15 мин, затем при комнатной температуре в течение 15 мин. После каждого этапа инкубации смесь перемешивают пастеровской пипеткой (продувая воздух). Готовят мазки, высушивают, фиксируют метанолом и докрашивают метиловым зеленым.

Воспроизводимость метода. Коэффициент вариации у здоровых 9,2%, у больных — 6,6% (не превышает допустимый).

Нормальные величины. У здоровых гранулы формазана обнаруживают в $7,2 \pm 1,2\%$ нейтрофилов.

Метод Стюарта и соавт. в модификации Б. С. Нагоева. Принцип см. *Метод Парка.*

Реактивы. 1. Гепарин — 10 ЕД в 1 мл 0,9% раствора хлорида натрия. 2. 0,1% водный раствор нитросинего тетразолия. 3. 50% раствор формалина в 0,9% растворе хлорида натрия. 4. 3,4% раствор хлорида натрия. 5. 4% формалиново-спиртовой раствор. 6. 0,5% раствор сафранина в 0,9% растворе хлорида натрия.

Специальное оборудование. 1. Центрифуга. 2. Термостат или водяная баня на 37°C.

Ход определения. Смешивают 0,1 мл крови из пальца с 0,1 мл раствора гепарина. Добавляют 0,1 мл раствора нитросинего тетразолия. Инкубируют смесь на водяной бане (или в термостате) при 37°C в течение 10 мин. Фиксируют смесь в растворе формалина 3 мин. Добавляют 3 мл дистиллированной воды на 20 с (для лизиса эритроцитов). Добавляют 1 мл 3,4% раствора хлорида натрия (для восстановления изотонии) и оставляют при комнатной температуре на 10 мин. Центрифугируют 5 мин при 1000 об/мин. Удаляют пастеровской пипеткой надосадочную жидкость, из осадка готовят

мазки. Фиксируют мазки в формалиново-спиртовом растворе 30 с и докрашивают сафранином.

Нормальные величины. У здоровых людей положительный НСТ-тест выявлен в $9,34 \pm 0,4$ % нейтрофилов. У здоровых СЦК составляет $13,3 \pm 0,6$.

Клиническое значение. НСТ-тест повышен при инфекционных заболеваниях бактериальной этиологии, при гнойно-воспалитель-

ных процессах, злокачественных новообразованиях.

Литература. *Бажора Ю. И., Тимошевский В. Н., Протченко П. З., Головченко А. Н.* Лаб. дело, 1981, № 4, с. 198—200; *Нагоев Б. С.*, Лаб. дело, 1983, № 8, 7—11; *Park B. H., Flr-kig S. M., Smitwick E. M.* Lancet, 1968, vol. 2, p. 532—534; *Stuart J., Gordon K, Lee T. J.* Histochem. Cytochem., 1975, vol. 7, p. 477.

3.5. ТРОМБОЦИТЫ

Кровяные пластинки — тромбоциты — относятся к третьей группе клеточных элементов крови. Обладают антигенными свойствами, основная роль их — участие в гемостазе (см. раздел 4).

3.5.1. Подсчет количества

В практике при подсчете тромбоцитов используют методы, основанные на двух принципах: 1) непосредственный подсчет в крови (с помощью счетной камеры или счетчика) и 2) подсчет в мазках крови на определенное количество эритроцитов с пересчетом на 1 мкл или 1 л с учетом общего количества эритроцитов в крови. Каждая группа методов имеет преимущества и недостатки. Существенным преимуществом первой группы методов является их большая точность. Непосредственный подсчет тромбоцитов в крови удобен еще и потому, что не требует для расчета сведений о количестве эритроцитов, но подсчет в камере более трудоемкий, поскольку тромбоциты в нативном виде представлены мелкими и плохо контрастированными элементами. Недостатком этих методов является необходимость подсчета тромбоцитов в ближайшие часы после взятия крови. Подсчет тромбоцитов в мазках крови значительно уступает по своей точности методам непосредственного подсчета в камере или с помощью счетчиков и автоматов. Ошибки при подсчете в мазках крови могут быть обусловлены несколькими причинами: плохое качество мазка и связанное с этим неравномерное распределение тромбоцитов, неточный подсчет эритроцитов в крови. Существенное неудобство метода — необходимость одновременного подсчета тромбоцитов и эритроцитов в крови. Преимущество его — возможность подсчета тромбоцитов в любое время независимо от момента взятия крови. В качестве унифицированных утверждены два метода, основанных на обоих принципах.

Унифицированный метод подсчета в камере (1972). **П р и н ц и п.** Подсчет тромбоцитов в 1 мкл (или 1 л) с учетом разведения крови и объема квадрата счетной сетки с применением фазово-контрастного устройства для контрастирования тромбоцитов.

Р е а к т и в ы. Применяют реактив 1 или 2. 1. Кокаина гидрохлорид — 3 г, натрия хлорид — 0,25 г, фурацилин — 0,025 г, дистилли-

рованная вода — 100 мл. 2. 1 % раствор оксалата аммония. Раствор кипятят и фильтруют. Хранят в холодильнике. Сравнительный анализ разных разводящих жидкостей позволил считать лучшим 1 % раствор оксалата аммония, так как он дает быстрый и полный лизис эритроцитов.

Специальное оборудование. 1. Микроскоп. 2. Фазово-контрастное устройство. 3. Счетная камера Горяева. 4. Осветитель к микроскопу (ОИ-7, ОИ-18).

Х о д о п р е д е л е н и я. Разводят исследуемую кровь в 200 раз; для этого в сухую пробирку набирают 4 мл реактива 1 или 2 и 0,02 мл крови. Перемешивают и оставляют на 25—30 мин для гемолиза эритроцитов. Подготавливают счетную камеру (см. подсчет лейкоцитов). Перемешивают разведенную кровь и заполняют камеру; подносят каплю ее с помощью стеклянной палочки или пастеровской пипетки к краю покровного стекла, следя за тем, чтобы кровь равномерно без пузырьков воздуха заполняла всю поверхность сетки, не затекая в бороздки. Помещают счетную камеру во влажную камеру на 5 мин для оседания тромбоцитов (чашка Петри с уложенной по краям смоченной водой фильтровальной бумагой). Подготавливают фазово-контрастное устройство в соответствии с инструкцией, приложенной к нему. Производят подсчет тромбоцитов в 25 больших квадратах.

Тромбоциты выглядят в счетной камере в виде мелких, хорошо преломляющих свет образований.

Расчет числа тромбоцитов проводят, исходя из разведения крови (200), числа сосчитанных квадратов (25) и объема одного большого ква-

драта ($\frac{1}{250}$ мкл, так как сторона квадрата $\frac{1}{5}$ мм, высота $\frac{1}{10}$ мм).

$$X = \frac{a \cdot 250 \cdot 200}{25} = a \cdot 2000,$$

X — число тромбоцитов в 1 мкл крови; a — число тромбоцитов, сосчитанных в 25 больших квадратах.

Практически число сосчитанных тромбоцитов умножают на 2000.

Воспроизводимость. По данным Т. А. Одесской и соавт., ошибка метода составляет 6,5 %.

Унифицированный метод подсчета в мазках крови (по Фонио). Принцип. Метод основан на подсчете числа тромбоцитов в окрашенных мазках крови на 1000 эритроцитов с расчетом на 1 мкл (или 1 л) крови, исходя из содержания в этом объеме количества эритроцитов.

Реактивы. Применяют реактив 1 или 2. 14 % раствор сульфата магния. 2. 6 % раствор этилендиаминтетраацетата натрия (ЭДТА).

Специальное оборудование. Не требуется.

Ход определения. Смешивают кровь с реактивом 1 или 2, для этого взятый капилляром Панченкова реактив до метки «75» вносят в пробирку, затем добавляют кровь, взятую тем же капилляром, до метки «0». Содержимое пробирки перемешивают и готовят тонкие мазки. Фиксируют и окрашивают по Романовскому — Гимзе (см. 3.3.2) в течение 2—3 ч (при использовании реактива 1) и в течение 30—45 мин (при использовании реактива 2).

Высохшие мазки микроскопируют с иммерсионным объективом, подсчитывая количество тромбоцитов в тонких местах препарата (эритроциты должны быть расположены изолированно). Тромбоциты в мазках выкладывают в виде фиолетовых округлых образований размером 2—4 мкм с отчетливо видимой центрально расположенной зернистой частью — грануломером и более светлой периферической незернистой зоной — гиаломером.

Подсчет производят следующим образом: в каждом поле зрения микроскопа считают число эритроцитов и тромбоцитов, передвигая мазок до тех пор, пока не будут просчитаны 1000 эритроцитов. Для удобства счета и большей точности следует пользоваться специальным окуляром с уменьшенным полем зрения; при отсутствии окуляра можно уменьшить поле зрения простым приемом (см. 3.3.6.).

Расчет: количество тромбоцитов на 1000 эритроцитов составляет А°/оо. Зная число эритроцитов в 1 мкл (в 1 л) крови, легко подсчитать количество тромбоцитов в 1 мкл крови (в 1 л).

Например. А = 60‰; число эритроцитов 5000000 в 1 мкл ($5 \cdot 10^6$ /мкл или $5 \cdot 10^{12}$ /л). Составляют пропорцию:

$$\begin{aligned} 60 & - 1000; \\ X & - 5\,000\,000, \text{ откуда} \end{aligned}$$

$$X = \frac{60 \cdot 5 \cdot 1\,000\,000}{1000} =$$

$$= 300 \cdot 1000 \text{ мкл } (300 \cdot 10^3/\text{мкл} \text{ или } 300 \cdot 10^9/\text{л}).$$

Подсчет в автоматическом счетчике. Использование счетчиков и автоматов существенно облегчает подсчет тромбоцитов в крови, повышает точность и ускоряет процедуру подсчета. Для автоматического подсчета количества тромбоцитов приспособлены отечественный гематологический комплекс КГ-2 и различные зарубежные счетчики: «Пикоскель» PS-4 фирмы «Medicor» (ВНР), «Coulter» 431А фирмы «LJC — Instrument» (Швеция), «Trombo-counter С» фирмы «Coultronics France SA» (Франция), автомат «Hemalog-8» фирмы «Technicon» (США) и др.

Принцип работы большинства счетчиков основан на кондуктометрическом методе (см. 3.3.1.).

Специальное оборудование. Счетчик для тромбоцитов.

Ход исследования в соответствии с инструкцией, приложенной к прибору.

Нормальные величины. По данным В. В. Соколова и И. А. Грибовой, количество тромбоцитов у здоровых людей составляет. $180 \cdot 10^6 - 320 \cdot 10^6$ /мкл (или $180 - 320 \cdot 10^9$ /л).

Клиническое значение. Снижение количества тромбоцитов в крови — тромбоцитопения — является важным симптомом при некоторых формах геморрагического диатеза. Наиболее выраженная тромбоцитопения (50×10^3 /мкл и ниже) наблюдается при обострении тромбоцитопенической пурпуры. Тромбоцитопения обычно сопутствует острым лейкозам в развернутой стадии и особенно терминальной стадии хронических лейкозов. Умеренная тромбоцитопения ($100 \cdot 10^3$ /мкл и более) наблюдается при коллагенозах, циррозах печени. Повышение количества тромбоцитов в крови — тромбоцитоз — характерно для миелопролиферативных заболеваний, наблюдается при злокачественных новообразованиях. Высокий тромбоцитоз ($1000 \cdot 10^3$ /мкл и более) может быть у больных после спленэктомии.

Литература. Одесская Г. А., Шитикова А. С., Папаян Л. П. Лаб. дело, 1970, № 2, с. 78—79; Соколов В. В., Грибовой И. А. Гематологические показатели здорового человека. — М.: Медицина, 1972. — 104 с.; Feissly R., Ludin H. Rev. Hemat., 1949, vol. 4, p. 481; Fonio A. Dtsch. Ztschr. Chir., 1912, Bd. 117, S. 176.

3.5.2. Исследование функций тромбоцитов

В клинической практике наиболее распространены исследования агрегационных, адгезивных и других свойств тромбоцитов (см. раздел 4).

3.6. ИЗМЕНЕНИЯ КРОВИ ПРИ ЛЕЙКОЗАХ

Исследование крови имеет особенно важное диагностическое значение при гемобластозах. Поэтому во всех случаях, когда клинически возникает подозрение на лейкоз (слабость, лихорадка неясного генеза, геморрагический синдром, увеличение печени, селезенки, лимфатических узлов, кожные поражения и др.), необходим общий клинический анализ крови.

Показатели красной крови. Появление анемии — ранний лабораторный симптом острых лейкозов. При этом анемия чаще нормохромного типа. При наличии кровопотерь развивается гипохромная микроцитарная анемия. При хронических лейкозах анемия обычно развивается уже в стадии развернутых клинико-гематологических проявлений, а в начале заболевания показатели красной крови обычно не изменены. Исключение составляют лейкозы миелопролиферативной природы, особенно эритремия, при которой ранними и основными лабораторными симптомами являются эритроцитоз, повышение содержания гемоглобина и гематокрита в крови. Умеренный эритроцитоз может быть в начале доброкачественного сублейкемического миелоза (миелофиброза), который затем снижается до нормальных цифр, а в дальнейшем, к терминальной стадии, сменяется анемизацией.

При лимфолиферативных заболеваниях в начальной стадии показатели красной крови нормальны, по мере прогрессирования процесса развивается анемия. Малоокровие обычно бывает нормохромного, нормоцитарного или макроцитарного типа, с небольшим повышением числа ретикулоцитов, иногда умеренным нормобластозом. Следует иметь в виду возможность развития при хронических лейкозах, особенно при хроническом лимфолейкозе, аутоиммунной гемолитической анемии. В этих случаях выявляется анемия нормохромного типа с высоким содержанием ретикулоцитов в крови, нередко появлением нормобластов в мазках периферической крови.

Лейкоциты и лейкоцитарная формула. Общее количество лейкоцитов в крови резко изменяется при лейкозах. Особенно выраженные изменения в виде гиперлейкоцитоза ($100 \cdot 10^9/\text{мкл}$, или $100 \cdot 10^9/\text{л}$ и выше) наблюдаются при хроническом миелолейкозе, хроническом лимфолейкозе. Умеренный лейкоцитоз (до $15 \cdot 10^9 - 20 \cdot 10^9/\text{л}$) может быть при эритремии, хроническом моноцитарном лейкозе, сублейкемическом миелозе. В последнем случае может наблюдаться и лейкопения. При парапротеинемических гемобластозах чаще развивается лейкопения, но может быть и нормальное число лейкоцитов в крови. Изменения числа лейкоцитов при острых лейкозах непостоянны; наряду с нормальным количеством может наблюдаться лейкопения и умеренный лейкоцитоз. Наибольшее значение в лабораторной диагностике лейкозов имеет исследование лейкоцитарной формулы (табл. 26). Важнейший признак острых лейкозов появление в мазках крови властных клеток — бластемия. Количество властных

клеток может варьировать от единичных (5—10%) до значительного числа (70—80%). Соответственно резко сокращается число зрелых гранулоцитов. Количество незрелых гранулоцитов чаще небольшое или они вовсе отсутствуют. К последним случаям применим термин «hiatus leukemicus».

Значительно реже встречаются так называемые алейкемические формы (стадии) острых лейкозов, когда в периферической крови властные клетки отсутствуют. Диагноз в этих случаях может быть установлен после исследования пунктата костного мозга (см. 3.7).

Помимо количественных сдвигов лейкоцитарной формулы, важное диагностическое значение имеет изменение морфологических особенностей клеток. Так, при острых лейкозах властные клетки могут иметь неправильную форму. Отличаются полиморфным ядром, с укрупненными нуклеолами, включениями в цитоплазме.

При разных формах острых лейкозов морфология властных клеток различна. При остром миелобластном и миеломонобластном лейкозе ядра клеток круглые, иногда неправильной формы, в цитоплазме содержат азурофильную зернистость и нередко тельца Ауэра. При остром промиелоцитарном лейкозе отмечается выраженный полиморфизм властных клеток, характерна крупная фиолетовая зернистость, обильно заполняющая цитоплазму клеток, часто встречаются тельца Ауэра.

При остром монобластном лейкозе властные клетки крупные с бобовидным ядром и скудной мелкой зернистостью в цитоплазме. При остром лимфобластном лейкозе бласты меньших размеров, ядро округлое с 1—2 нуклеолами, цитоплазма обычно не содержит зернистости. Морфологические черты властных клеток не всегда надежны для дифференциации различных форм острых лейкозов. С этой целью обычно проводят цитохимические исследования. Для практических целей может быть достаточным небольшой набор цитохимических реакций (PAS — реакция, исследование активности пероксидазы, неспецифических эстераз). В табл. 27 приведены результаты исследования властных клеток при наиболее часто встречающихся формах острых лейкозов.

Для хронических лейкозов миелолиферативной природы характерно наличие большого числа гранулоцитов (до 80—90 %) в мазках крови при уменьшении лимфоцитарных и моноцитарных элементов. При хроническом миелолейкозе в лейкоцитарной формуле находят все переходные формы от властных клеток до зрелых нейтрофилов. Часто отмечают увеличение числа эозинофилов и базофилов. В развернутой клинико-гематологической стадии хронического миелолейкоза обнаруживают следующую лейкоцитарную формулу: миелобласты 1—3 %, промиелоциты 3—8 %, нейтрофильные миелоциты 5—10 %, нейтрофильные метамиелоциты 10—15 %, нейтрофильные палочкоядерные 12—15 %, нейтрофильные сегментоядерные 25—

Т а б л и ц а 26. Изменения лейкоцитарной формулы при некоторых лейкозах

Форма лейкоза	Властные клетки	Незрелые гранулоциты	Зрелые гранулоциты	Лимфоциты	Моноциты
Острые лейкозы	В большом количестве	В небольшом количестве	Значительно снижены	Нормальные или снижены	Снижены
Хронический миелолейкоз	Единичные, при властном кризе — резко повышены	В значительном количестве	Несколько снижены	Снижены	»
Сублейкемический миелоз	Единичные	В небольшом количестве	Иногда снижены	Снижены или нормальные	Снижены или нормальные
Эритремия	Обычно отсутствуют	Отсутствуют или единичные	Увеличены	Нормальные или снижены	Нормальные или снижены
Хронический лимфолейкоз	Единичные	Часто отсутствуют	Резко снижены	Резко увеличены	Снижены
Хронический моноцитарный лейкоз	Единичные или отсутствуют	Единичные или отсутствуют	То же	Нормальные или снижены	Резко увеличены

35 %, эозинофилы незрелые 1—3 %, эозинофилы зрелые 2—6 %, базофилы 1—3 %, лимфоциты 5—10 %, моноциты 2—3 %. Прогностически неблагоприятным признаком является увеличение незрелых форм, базофилов и уменьшение зрелых нейтрофилов.

Т а б л и ц а 27. Цитохимическая характеристика властных клеток при острых лейкозах

Форма лейкоза	ШИК-реакция	Активность		
		пероксидазы	α-нафтилацетат-эстеразы	хлорацетат-эстеразы
Миелобластный	+	+	—	—
Промиелоцитарный	То же	+	±	+
	±	±	+	±
Монобластный	(диффузное расположение)			
Лимфобластный	+	—	±	—
	(гранулярное расположение)			

В терминальной стадии при развитии властного криза резко увеличивается количество властных клеток. При эритремии отмечается нейтрофилез обычно с палочкоядерным сдвигом.

Хронический лимфолейкоз имеет типичные изменения лейкоцитарной формулы в виде выраженного лимфоцитоза, достигающего 80—90 %. При этом лимфобласты не превышают 0,5—2 %, пролимфоциты — 3—5 %. Остальные лимфоидные элементы представлены зрелыми лимфоцитами. Число зрелых нейтрофилов резко уменьшено (8—15%), незрелые гранулоциты, как правило, отсутствуют или единичные (0,5—1 %). Характерным морфологическим признаком лимфопротероза является наличие в мазках крови теней Боткина — Гумпрехта. Лейкемические лимфоциты нередко морфологически не отличаются от нормальных, обычно узкоплазменные, иногда голоядерные формы, реже с bipolarно вытянутой цитоплазмой. Значительный полиморфизм клеток выявляется при волосатоклеточном лейкозе, когда клетки имеют неровные контуры (как бы «фестончатые»), цитоплазма интенсивно и неравномерно окрашена.

При плазмцитоме и макроглобулинемии Вальденстрема изменения лейкоцитарной формулы не столь постоянны, как при хроническом лимфолейкозе. Они могут либо отсутствовать, либо характеризоваться умеренным лимфоцитозом, моноцитозом. При плазмцитоме в мазках крови может быть небольшое количество плазматических клеток, значительное увеличение их наблюдается редко. Хронический моноцитарный лейкоз отличается значительным моноцитозом, в лейкоцитарной формуле могут быть единичные монобласты и промоноциты.

Тромбоциты. Тромбоцитопения наблюдается обычно при острых лейкозах и в развернутой, особенно терминальной стадии хронических лейкозов. При миелопротерозивных заболеваниях в начальной стадии часто встречается тромбоцитоз. М. С. Дульцин отметил этот симптом у 75 % больных в начальной стадии хронического миелолейкоза. Тромбоцитоз,

иногда значительный, является постоянным симптомом эритремии.

Скорость оседания эритроцитов (СОЭ). Небольшое увеличение СОЭ может быть при острых и хронических лейкозах, хотя это далеко не обязательный гематологический признак. При выраженной интоксикации СОЭ увеличена, при гнойно-воспалительных осложнениях резко увеличена. Характерно резкое увеличение СОЭ (50—70 мм/ч) при парапротеинемических гемобластазах. Этим симптомом часто манифестирует заболевание и требует обследования боль-

ных для исключения миеломной болезни, болезни Вальденстрема.

Литература. *Абрамов М. Г.* Гематологический атлас.— М.: Медицина, 1979; *Воробьев А. И. Бриллиант М. Д.* Острые лейкозы.— В кн.: Руководство по гематологии / Под ред. А. И. Воробьева, Ю. И. Лорие, М., 1979, с. 155; *Дульцин М. С.* Хронический миелоидный лейкоз.— В кн.: Лейкозы. М.: Медицина, 1965, с. 215; *Морозова В. Т.* Лабораторная диагностика лейкозов.— Л.: Медицина, 1977.

3.7. КОСТНЫЙ МОЗГ

Исследование костного мозга проводят с диагностической целью для подтверждения или установления диагноза, главным образом различных форм гемобластозов и анемий. Диагностическое значение имеет исследование костного мозга при поражении его лимфогранулематозом, туберкулезом, болезнью Гоше, Ниманна — Пика, метастазами рака. Широко проводят исследование костного мозга при острых лейкозах с прогностической целью, для контроля за терапией.

Для исследования костного мозга производят пункцию грудины или подвздошной кости с последующим цитологическим анализом мазков пунктата, а также трепанобиопсию подвздошной кости с последующим гистологическим исследованием срезов костного мозга.

3.7.1. Пункция костного мозга

Пункцию грудины или подвздошной кости проводят в процедурном кабинете с соблюдением правил асептики. Техника пункции подробно описана. Для проведения качественного исследования необходимо обратить внимание на тщательное обезживание иглы Кассирского и шприца, так как примесь воды повреждает клеточные элементы.

Учитывая быструю свертываемость содержимого пунктата, необходимо его по получении тотчас развести (для подсчета кариоцитов) и быстро приготовить мазки. Дальнейшую обработку мазков пунктата производят так же, как и мазков крови. При необходимости клетки костномозгового пунктата могут быть окрашены цитохимическими методами (см. 3.4.5).

3.7.2. Подсчет миелокариоцитов

Принцип. Разведение пунктата, подсчет клеток в счетной камере в определенном количестве квадратов с последующим пересчетом на 1 мкл пунктата.

Реактивы. 3—5 % раствор уксусной кислоты.

Специальное оборудование. Счетная камера Горяева. 2. Микроскоп.

Ход определения. Пунктат костного мозга разводят в 200 раз, для чего в пробирку с 4 мл слабого раствора уксусной кислоты вносят пипеткой 0,02 мл пунктата (в таком виде пробирка должна быть для дальнейшего исследования доставлена в лабораторию). Содержимое пробирки тщательно перемешивают и заполняют счетную камеру (заполнение камеры и ее подготовку к работе см. 3.2.1). После оседания форменных элементов (через 1—2 мин) подсчитывают миелокариоциты, т. е. все ядерные элементы в 100 больших квадратах (аналогично подсчету числа лейкоцитов в крови).

Рассчитывают количество миелокариоцитов на 1 мкл пунктата по следующей формуле:

$$X = \frac{n \cdot 200 \cdot 250}{100} = n \cdot 500,$$

где X — число миелокариоцитов в 1 мкл пунктата; n — количество миелокариоцитов в 100 больших квадратах; 200 — разведение; 250 — множитель для приведения к 1 мкл, так как

объем одного большого квадрата равен $\frac{1}{250}$ мкл.

Практически число подсчитанных в 100 больших квадратах миелокариоцитов умножают на 500.

Нормальные величины. Количество миелокариоцитов колеблется в широких пределах (41600—195000; отклонения 1,5 S) и в большой степени зависит от разведения пунктата кровью.

Клиническое значение. Количество миелокариоцитов дает ориентировочное представление о клеточности костного мозга. Увеличение количества миелокариоцитов характерно главным образом для лейкозов миело-пролиферативной природы, особенно выражено оно при хроническом миелолейкозе. Умеренное увеличение наблюдается после кровопотери, при гемолитических анемиях. Уменьшение количества ядерных клеток свидетельствует об аплазии кроветворения, может быть при агранулоцитозе, после лучевой и цитостатической терапии.

Литература. *Грибова И. А.* Гематологическая норма.— В кн.: Руководство по гематологии / Под ред. А. И. Воробьева, Ю. И. Лорие. М.: Медицина, 1979, с. 54.

3.7.3. Подсчет мегакарицитов

Количество мегакарицитов можно оценить ориентировочно, просматривая под малым увеличением микроскопа мазки пунктата костного мозга или срезы трепаната костного мозга, или подсчитывать число клеток в счетной камере.

Подсчет в счетной камере. Принцип. Разведение пунктата и подсчет гигантских клеток костного мозга в счетной камере в определенном количестве квадратов с последующим пересчетом на 1 мкл пунктата.

Реактивы. 3–5 % раствор уксусной кислоты.

Специальное оборудование. Счетная камера Фукса — Розенталя. 2. Микроскоп.

Ход определения. Разводят пунктат костного мозга в 20 раз, для этого предварительно вносят в пробирку 0,4 мл раствора уксусной кислоты и затем 0,02 мл пунктата (в таком виде пробирку доставляют в лабораторию). Подсчет мегакарицитов (гигантских клеток) производят во всей сетке; при окончательном расчете на 1 мкл пунктата умножают на разведение пунктата (20) и делят на объем камеры (3,2).

Нормальные величины. У здоровых взрослых людей количество мегакарицитов составляет 63 ± 10 или $83 \pm 13,86$ в 1 мкл пунктата. У детей в возрасте 5 мес — 3½ года количество мегакарицитов выше, чем у взрослых ($116 \pm 10,8$ в 1 мкл пунктата).

Клиническое значение. Увеличение количества мегакарицитов является ран-

ним симптомом хронических лейкозов миелопролиферативной природы, особенно эритремии. Мегакарицитоз костного мозга характерен также для геморрагической тромбоцитемии, может наблюдаться после кровопотери, при раке, циррозах печени с гиперспленизмом, тромбоцитопенической пурпуре. Уменьшение числа мегакарицитов характерно для острых лейкозов, лимфопролиферативных заболеваний и особенно в резкой степени — при апластических анемиях.

Литература. *Крылов А. А., Дмитриев В. И.* Воен.-мед. журн., 1970, № 1, с. 80–81; *Малаховский Ю. Е.* Лаб. дело, 1964, № 12, с. 729–733; *Ярустовская Л. Э.* Прobl. гематол. и перелив, крови, 1966, № 11, с. 41–46.

3.7.4. Морфологическое исследование форменных элементов с подсчетом миелограммы

Проведению морфологического исследования пунктата костного мозга должны предшествовать подготовка предметных стекол, приготовление и окраска препаратов аналогично приготовлению и окраске препаратов периферической крови (унифицированы — см. 3.3.2).

В табл. 28–31 приведены характеристики и основные морфологические признаки эритрокарицитов, незрелых миелоноцитарных элементов и их предшественников, незрелых лимфоидных элементов и их предшественников и мегакариоцитарных элементов. Зрелые гранулоциты, лимфоциты, моноциты в мазках пунктата костного мозга не отличаются от таковых периферической крови (см. табл. 25).

Метод Аринкина. Принцип. Дифференцировка форменных элементов в окрашенных

Таблица 28. Характеристика эритрокарицитов костного мозга

Признаки	Эритробласт	Пронормобласт	Нормобласт		
			базофильный	полихроматофильный	оксифильный
Размер, мкм	12–20	10–20	9–18	8–12	8–11
Ядро: структура хроматина	Сетчатая или зернистая с нуклеолами	Комковатая без нуклеол	Крупные нити с тенденцией к колесовидной	Колесовидная	Пикнотичная
окраска	Светло-фиолетовая	Светло-фиолетовая	Фиолетовая	Темно-фиолетовая	Темно-фиолетовая
расположение	Центральное	Центральное	Центральное, иногда эксцентричное	Центральное или эксцентричное	Эксцентричное
Цитоплазма: размер	Узкая	Узкая	Относительно широкая	Широкая	Широкая
окраска	Интенсивно синяя со светлой перинуклеарной зоной	Синяя с более светлой перинуклеарной зоной	Светло-синяя	Серовато-голубая или серовато-розовая	Бледно-розовая, розовая

Т а б л и ц а 29. Характеристика незрелых миеломоноцитарных элементов и их предшественников

Признаки	Миелобласт	Промиелоцит	Миелоцит	Метамиелоцит	Монобласт	Промоноцит
Размер, мкм	15—20	18—25	10—18	10—16	15—20	16—25
Ядро: форма	Круглое крупное	Круглое или овальное	Круглое, овальное или с вдавлением	Бобовидное, подковообразное	Круглое, бобовидное с волнистыми контурами	Круглое с волнистыми контурами, иногда полиморфное
структура	Нежная, мелкосетчатая	Мелкосетчатая, иногда с утолщенными нитями	Глыбчатая	Неравномерная, глыбчатая	Мелко сетчатая	Крупно-зернистая
нуклеолы	2—5, отчетливые	1—3, отчетливые	Не видны	Не видны	2—3, отчетливая	Не видны
окраска	Светло-фиолетовая	Светло-фиолетовая	Фиолетовая	Фиолетовая	Светло-фиолетовая	Светло-фиолетовая
Цитоплазма: зона	Узкая	Узкая, иногда широкая	Относительно широкая	Относительно широкая	Узкая	Умеренно широкая
окраска	Голубая, светло-синяя	Голубая, сероватая	Светло-розовая, светло-фиолетовая	Светло-розовая	Синяя, светло-синяя	Светло-синяя, сероватая
зернистость	Непостоянно, одиночные мелкие гранулы	Нейтрофильные — обильная, крупная, фиолетовая; эозинофильные — обильная, крупная, фиолетовая, с эозинофильными гранулами; базофильные с темно-фиолетовыми гранулами	Нейтрофильные — бледно-фиолетовая, мелкая с более крупными гранулами; эозинофильные — крупная розовая, желтоватая с отдельными базофильными гранулами; базофильные — неравномерная, крупная, необильная, фиолетовая	Нейтрофильные — мелкая бледно-фиолетовая; эозинофильные — крупная, розовая, обильная; базофильные — крупная, неравномерная, необильная, фиолетовая	Непостоянно, иногда одиночные, мелкие гранулы	Непостоянно, иногда мелкая пылевидная, светло-фиолетовая

мазках пунктата с выведением миелограммы, т. е. процентного содержания различных миелокариоцитов.

Реактивы. 1. Иммерсионное масло. 2. Дитиловый эфир.

Специальное оборудование. 1. Микроскоп. 2. 11-Клавишный счетчик для подсчета лейкоцитарной формулы.

Ход определения. Просматривают препараты под малым увеличением для ориентировочного представления о клеточности костного мозга, наличии и числе мегакариоцитов, для исключения патологических элементов (комплексы атипических клеток или одиночные атипич-

ческие клетки, клетки Березовского — Штернберга, клетки Гоше и др.). В случае выявления таких (или других) патологических элементов необходимо нанести каплю масла на препарат, перевести на иммерсионный объектив и рассмотреть морфологию этих элементов.

После просмотра мазков под малым увеличением наносят каплю иммерсионного масла на мазок, погружают в него иммерсионный объектив и приступают к дифференцированию форменных элементов. Для подсчета миелограммы необходимо дифференцировать не менее 500 миелокариоцитов в разных участках препарата. Подсчитывают все встречающиеся в поле зрения

Таблица 30. Характеристика незрелых лимфоидных элементов и их предшественников

Признаки	Лимфобласт	Пролимфоцит	Плазмобласт	Проплазмоцит
Размер, мкм	12—20	10—15	16—25	10—20
Ядро: форма	Круглое, овальное	Круглое, овальное	Круглое	Круглое, эксцентрично расположено
структура	Нежная, мелкокомковатая	Крупноглыбчатая	Мелкосетчатая	Крупноглыбчатая, иногда колесовидная
нуклеолы	1—2, отчетливы	Непостоянны	1—2, отчетливы	Непостоянны
окраска	Светло-фиолетовая	Светло-фиолетовая, фиолетовая	Светло-фиолетовая	Фиолетовая
Цитоплазма: зона:	Узкая	Относительно широкая	Узкая	Широкая
окраска	Синяя, светло-синяя с более светлой перинуклеарной зоной	Светло-синяя	Интенсивно синяя с перинуклеарным просветлением	Интенсивно синяя, сероватая, иногда с перинуклеарным просветлением

Таблица 31. Характеристика мегакариоцитарных элементов

Признак	Мегакариобласт	Промегакариоцит	Мегакариоцит		
			базофильный	полихроматофильный	оксифильный
Размер, мкм	18—20	20—25	30—40	40—50	60—70
Ядро: форма	Округлое	С бухтообразными вдавлениями	Лопастное, с бухтообразными вдавлениями	Многолопастное, гиперсегментированное	Многолопастное, гиперсегментированное
структура	Мелкосетчатая, в виде клубка с видимыми нуклеолами	В виде клубка	В виде клубка	В виде клубка или шаров	Плотная, пикнотипичная
окраска	Бледно-фиолетовая	Фиолетовая	Фиолетовая	Темно-фиолетовая	Темно-фиолетовая
Цитоплазма: зона	Узкая, иногда с отростками	Узкая, иногда с отростками	Неширокая	Широкая	Широкая
окраска	Синяя, светло-синяя	Синяя	Голубая, светло-синяя	Светло-голубая	Розоватая
зернистость	Обычно отсутствует	Обычно отсутствует	Азурофильная, небогатая	Обильная, неравномерная, местами скопления напоминают тромбоциты, иногда последние располагаются вне клеток	Мелкая, обильная, светло-фиолетовая

элементы, откладывая их количество с помощью 11-клавишного счетчика, недостающие обозначения (например, все формы эритрокариоцитов, плазмоцитов и др.) отмечают отдельно на бумаге. При большом содержании миелокариоцитов в мазках в поле зрения обнаруживают

много элементов и для облегчения подсчета можно использовать окуляр с уменьшенным полем зрения (см. 3.3.6). После подсчета 500 клеток делят число клеток каждого вида на 5 (при подсчете 1000 клеток делят на 10) и выдают ответ в процентах.

Нормальные величины. В соответствии с обобщенными данными пределы нор-

мальных значений ($X \pm 1,5S$ %) миелограммы следующие.

Недифференцированные бласты		0,1—1,1
Миелобласты		0,2—1,7
Нейтрофильные промиелоциты	1,0—4,1	
» миелоциты	7,0—12,2	
» метамиелоциты	8,0—15,0	52,7—68,9
» палочкоядерные	12,8—23,7	
» сегментоядерные	13,1—24,1	
Эозинофилы (всех генераций)		0,5—5,8
Базофилы		0—0,5
Эритробласты	0,2—1,1	
Пронормобласты	0,1—1,2	
Нормобласты базофильные	1,4—4,6	14,5—26,5
» полихроматофильные	8,9—16,9	
» оксифильные	0,8—5,6	
Лимфоциты		4,3—13,7
Моноциты		0,7—3,1
Плазматические клетки		0,1—1,8
Ретикулярные клетки		0,1—1,6
Лейкоэритробластическое отношение		2,1—4,5

Клиническое значение. Увеличение властных клеток с появлением полиморфных, уродливых форм с атипией ядер, укрупненными нуклеолами наблюдается при острых лейкозах. В миелограмме при этом снижено число зрелых нейтрофилов и эритрокариоцитов. Увеличение миелоидных элементов главным образом за счет незрелых форм, сочетающееся с небольшим увеличением миелобластов, промиелоцитов, повышением лейкоэритробластического соотношения и уменьшением эритрокариоцитов, является признаком миелопротрофиоза, особенно выражено при хроническом миелолейкозе.

Увеличение миелоидных элементов и их незрелых форм нередко сопутствует интоксикациям, острым воспалительным процессам, гнойным инфекциям, может быть при шоке, острой кровопотере, гематосаркомах, туберкулезе, раке. Увеличение лимфоидных элементов в основном за счет зрелых, появление голоядерных форм при значительной редукции эритрокариоцитов являются признаком лимфопролиферативных заболеваний (хронический лимфолейкоз, макроглобулинемия Вальденстрема). Увеличение плазматических клеток с изменением их морфологических черт (полиморфизм, двухядерные формы, изменение окраски цитоплазмы и пр.) характерно для плазмоцитомы.

Изменение эритрокариоцитов с резким увеличением их числа и уменьшение лейкоэритробластического соотношения наблюдаются при анемиях (постгеморрагические, гемолитические). Изменение морфологических черт эритроидных элементов, появление мегалобластов разных генераций (табл. 32), крупных форм нейтрофильных миелоцитов, метамиелоцитов, гиперсегментированных нейтрофилов свидетельствуют о В12- или фолиево-дефицитных анемиях.

Уменьшение эритроидных форм на фоне снижения общего числа миелокариоцитов с небольшим увеличением бластных клеток, лимфоцитов,

плазматических клеток часто может быть проявлением гипопластической анемии. Эти формы малокровия могут протекать и с увеличением эритроидных клеток, появлением атипичных эритробластов (мегалобластоидных форм).

Обнаружение в миелограмме повышенного количества эозинофилов свидетельствует об аллергии, может быть при глистной инвазии, эозинофильных инфильтратах, злокачественных новообразованиях, эозинофильной грануломе и др. Увеличение моноцитoidных клеток наблюдается при хроническом моноцитарном лейкозе, инфекционном мононуклеозе, при хронических инфекциях. Тучные клетки могут обнаруживаться в миелограмме при пигментной крапивнице и в редких случаях тучно-клеточного лейкоза (мастоцитомы).

Для оценки реакций костного мозга предложено пользоваться парциальными миелограммами, т. е. соотношением незрелых и зрелых элементов одного ряда (эритрограмма, мегакариоцитограмма и пр.), однако в клинической практике эти исследования проводят редко.

Л и т е р а т у р а . *Аркин М. И.* Методика исследования при жизни костного мозга.— В кн.: Клиника болезней крови и кроветворных органов. Л., 1928, с. 34; *Соколов В. В., Грибова И. А.* Гематологические показатели здорового человека.— М., 1972.

3.7.5. Трепанобиопсия костного мозга

Трепанобиопсию костного мозга проводят для диагностики алейкемических форм лейкозов, эритремии, миелофиброза и других миелолиферативных и лимфопролиферативных заболеваний, при подозрении на гипопластические анемии, метастазы рака в костный мозг и при неясных изменениях пунктата костного мозга.

Т а б л и ц а 32. Характеристика мегалобластических элементов

Признаки	Промегалобласт	Мегалобласт		
		базофильный	полихроматофильный	оксифильный
Размер, мкм	18—25	18—24	16—22	15—20
Ядро: форма	Круглое, иногда с неровными контурами Нежная, мелкозернистая	Круглое	Круглое	Круглое, эксцентрично расположено
структура		Крупнозернистая	Крупнозернистая	Крупнозернистая, иногда крупнокомковатая
окраска	Бледно-фиолетовая	Бледно-фиолетовая	Бледно-фиолетовая	Фиолетовая
Цитоплазма	Сине-сиреневая с перинуклеарным розоватым просветлением	Светло-синяя, сероватая с перинуклеарным просветлением	Широкая, серовато-розового цвета	Широкая, розового цвета

Трепанобиопсию костного мозга проводят по методу Мачульского. Приготовление срезов костного мозга, их окраску осуществляют в гистологической лаборатории по правилам гистологической обработки костных тканей.

Метод гистологической обработки трепаната (Ленинградский институт гематологии и переливания крови). Трепанат фиксируют в ценкерформоле (9 частей жидкости Ценкера и 1 часть 40 % формалина) в течение 10—16 ч. Промывают водопроводной водой. Помещают в смесь, состоящую из равных частей 85 % муравьиной кислоты и 20 % цитрата натрия на 18—20 ч. Помещают в 5 % раствор алюмокалиевых квасцов на 3—4 ч. Проводят через спирты: 70 % — 24 ч, 96 % — 1—2 сут. Погружают в жидкий целлоидин с гвоздичным маслом на 2—3 сут. Помещают в хлороформ на 2—3 ч,

а затем в хлороформ с парафином при 37 °С, на 18 ч. Парафин I, парафин II — по 1—2 ч, парафин III — 1/2 — 1 ч, заливают в парафин. Готовят среды и окрашивают их азур П-эозином. Для выявления ретикулиновых волокон проводят импрегнацию серебром по Гомори.

Гистологическое исследование срезов костного мозга дает возможность изучить архитектонику органа, соотношение кроветворной и жировой ткани и выявить атипичные клетки.

Л и т е р а т у р а. Мачульский Л. М. Метод трепанобиопсии в гематологии (методическое пособие).— Киров, 1965; Теодорович В. П., Абдулкадыров К.- М. Трепанобиопсия костного мозга при некоторых гематологических заболеваниях.—Л., 1977, с. 11.

3.8. ЛИМФАТИЧЕСКИЕ УЗЛЫ

Исследование лимфатических узлов широко применяется для диагностики гемобластозов, особенно гематосарком (лимфогранулематоз, лимфомы), метастазов рака, туберкулеза, саркоидоза. Информативным является исследование лимфатических узлов при инфекционном мононуклеозе, неспецифических лимфаденитах.

Для морфологического исследования производят пункцию узла с последующим цитологическим анализом мазков пунктата, а также биопсию лимфатического узла с гистологическим исследованием срезов.

Хотя пункция лимфатического узла является чрезвычайно простой процедурой и может проводиться повторно с одновременной пункцией узлов различной локализации, более информа-

тивным, однако, является сочетанное исследование — биопсия лимфатического узла, приготовление отпечатков из поверхности разреза с цитологическим исследованием отпечатков и дальнейшее приготовление срезов с гистологическим их анализом. Такое сочетанное исследование позволяет изучить морфологию отдельных клеточных элементов и гистологическую структуру узла, что особенно важно при лимфогранулематозе, различных лимфомах и других злокачественных опухолях.

3.8.1. Цитологическое исследование

Для цитологического исследования лимфатических узлов готовят мазки из пунктата или

отпечатки узлов, полученных при биопсии. Пункция лимфатического узла проводится с соблюдением правил асептики. Техника пункции не сложная; для этого необходимы высушенные обезвоженные шприц и игла. Подготовку предметных стекол, их обработку, окраску препаратов проводят аналогично обработке препаратов периферической крови (см. 3.3.2).

Исследование лимфаденограммы. Принцип. Подсчет клеток в мазках пунктата и выведение их процентного соотношения.

Реактивы. 1. Иммерсионное масло. 2. Дистиллированный эфир.

Специальное оборудование. 1. Микроскоп. 2. 11-Клавишный счетчик для подсчета лейкоцитарной формулы.

Ход определения. Просматривают препараты под малым увеличением для выявления патологических элементов (комплексы атипических клеток, одиночные крупные атипические клетки, клетки Березовского — Штернберга, Пирогова — Лангханса и др.). В случае нахождения таких (или других) патологических элементов наносят каплю иммерсионного масла на данное место препарата, переводят на иммерсионный объектив и рассматривают морфологию патологических элементов (см. ниже).

После просмотра мазков под малым увеличением приступают к микроскопии с помощью иммерсионного объектива. Наносят каплю иммерсионного масла на край препарата, погружают в него иммерсионный объектив и дифференцируют форменные элементы. Для выведения лимфаденограммы дифференцируют не менее 500 клеток, отмечая их с помощью 11-клавишного счетчика, и выдают ответ в процентах.

Нормальные величины. Данные о нормальных величинах весьма ориентировочны, так как они получены у людей с увеличенными лимфатическими узлами (в норме увеличения лимфатических узлов не наблюдается).

По данным М. Г. Абрамова, преобладающими элементами (до 98 %) нормального лимфатического узла являются лимфоциты и пролимфоциты. Морфология лимфоцитов не отличается от таковой периферической крови (см. 3.4.2). Пролимфоциты отличаются от лимфоцитов несколько большими размерами, более светлоокрашенным и менее компактным ядром. Единичные клетки (не более 1 %) относят к лимфобластам — крупные клетки с округлым большим ядром, имеющим нежную структуру хроматина и отчетливо видимые 1—2 нуклеолы; цитоплазма базофильная в виде узкой зоны с перинуклеарным просветлением. В нормальной лимфаденограмме встречаются единичные тканевые тучные клетки, макрофаги, плазматические клетки.

Клиническое значение. Исследование лимфаденограммы имеет определенное диагностическое значение при неспецифических лимфаденитах. По данным Е. Н. Бычковой, при реактивных лимфаденитах отмечено увеличение ретикулярных клеток, появление иммунобластов, макрофагов (табл. 33).

Т а б л и ц а 33. Лимфаденограмма при неспецифических лимфаденитах

Клеточные элементы	Содержание, %	
	$\bar{X} \pm m$	нормальные значения
Лимфобласты	$3,0 \pm 0,2$	2,0
Пролимфоциты	$15,2 \pm 0,5$	3,4
Лимфоциты	$75,1 \pm 0,7$	91,0
Недифференцированные бласты	$1,6 \pm 0,3$	—
Ретикулярные клетки	$1,6 \pm 0,2$	0,2
Макрофаги	$0,5 \pm 0,1$	—
Иммунобласты	$1,3 \pm 0,3$	—
Плазматические клетки	$0,7 \pm 0,1$	0,1
Нейтрофилы	$0,3 \pm 0,05$	0,3
Эозинофилы	$0,4 \pm 0,1$	0,1
Тканевые базофилы	$0,1 \pm 0,07$	0,2
Моноциты	$0,1 \pm 0,02$	—

При острых лимфаденитах в лимфаденограмме увеличивается, а иногда и преобладает количество нейтрофилов, появляются макрофаги. Обнаружение в пунктате лимфатического узла иммунобластов — крупных клеток с резко базофильной цитоплазмой, большим округлым ядром гомогенной структуры с отчетливыми нуклеолами — является морфологическим выражением антигенной стимуляции и наблюдается при различных воспалительных процессах, инфекциях (в частности, при инфекционном монукулезе), аллергических реакциях, после вакцинации.

Л и т е р а т у р а . Бычкова Е. Н., Демидова Н. В. Цитологические критерии дифференциальной диагностики злокачественных лимфом и реактивных лимфаденопатий (методические рекомендации).— М., 1979, с. 9; Яновский Д. Н., Чепелева М. А. Атлас цитологии пунктатов лимфатических узлов.— Киев, 1969, с. 3.

Исследование патологических элементов. В клинической практике при цитологическом исследовании препаратов чаще прибегают к поиску патологических элементов, имеющих диагностическое значение.

Принцип. Тщательный и целенаправленный поиск патологических элементов под малым увеличением и затем с иммерсионным объективом микроскопа.

Реактивы и оборудование. См. *Исследование лимфаденограммы.*

Ход определения. Просматривают мазки (по возможности все мазки, полученные при пункции) под малым увеличением микроскопа. При обнаружении крупных одиночных клеток или комплексов клеток детально исследуют их с иммерсионным объективом. При отсутствии видимых под малым увеличением

ских клеток тщательно просматривают препараты с иммерсионным объективом.

Элементы лимфогранулемы. Диагностическими клетками при лимфогранулематозе являются клетки Березовского — Штернберга — крупные (в среднем 40—50 мкм) элементы с несколькими ядрами (иногда одноядерные), отличающиеся полиморфизмом, гиперхромией, крупными или множественными мелкими нуклеолами. Цитоплазма широкая, окрашена в светлые или интенсивно-базофильные тона. В клетках отчетливо выявляются указанные признаки злокачественной анаплазии — полиморфизм клеток и ядер, анизохромия, укрупненные нуклеолы, изменение ядерно-цитоплазменного соотношения. При этом заболевании в мазках пунктата наряду с клетками Березовского — Штернберга обнаруживают плазматические клетки, эозинофилы, ретикулярные клетки, клетки Ходжкина — предшественники клеток Березовского — Штернберга, отличающиеся от последних меньшими размерами, наличием одного ядра, нежной структуры. Клетки эти также характеризуются атипией, наличием крупных нуклеол. По цитологической картине пунктата можно предполагать вариант лимфогранулематоза, но более достоверные данные получают при гистологическом исследовании биопсированных лимфатических узлов.

Элементы злокачественных лимфом — замещение нормальных элементов лимфатического узла опухолевыми, морфология которых зависит от варианта лимфомы (лимфосаркомы).

Лимфобластная лимфосаркома. Пунктат состоит из однотипных клеток, морфологически напоминающих лимфоциты с явлениями анаплазии и имеющих округлую форму с крупными круглыми или полиморфными ядрами, нежную структуру с единичными крупными нуклеолами; цитоплазма обычно неширокая, базофильная или более светлая: в препарате много голяядерных форм.

Пролимфобластная лимфосаркома. Преобладают опухолевые элементы с чертами пролимфоцитов — клетки меньших размеров, чем в предыдущем варианте, ядра округлые, полиморфизм выражен нерезко, структура ядер гомогенная, видны 1—2 нуклеолы. Цитоплазма голубая, неширокая; много голяядерных форм.

Лимфоцитарная лимфосаркома (лимфоцитомы). Преобладают опухолевые клетки с морфологическими чертами, свойственными зрелым лимфоцитам, — мелкие клетки с плотным темно-окрашенным ядром без видимых нуклеол и с базофильной цитоплазмой. Морфологическая анаплазия выражена умеренно. Много голяядерных форм. При этом варианте цитологическое исследование дает мало опорных пунктов для диагностики.

Гистиоцитарная лимфома (ретикулосаркома). Преобладают крупные клетки с выраженной анаплазией гистиоцитарного или ретикулярного типа. Клетки отличаются резким полиморфизмом ядра с нежнотчатой структурой и крупными нуклеолами, чаще неширокой цитоплазмой. Иногда явления злокачественной ана-

плазии резко выражены и возникают трудности в дифференциации гистиоцитарной лимфомы и метастатического поражения лимфатического узла недифференцированной формой рака.

Элементы туберкулезной гранулемы. Гигантская клетка Пирогова — Лангханса (размер 30—50 мкм) характеризуется многочисленными эксцентрично расположенными ядрами вытянутой формы с нежной структурой хроматина и светлой цитоплазмой, окрашенной в голубоватый или серовато-голубой цвет.

В препарате, кроме того, встречаются эпителиоидные клетки, отличающиеся вытянутой (овальной, бобовидной) формой ядер с нежной структурой хроматина, иногда с видимыми нуклеолами и светло-синей цитоплазмой. Диагноз туберкулезного лимфаденита можно безошибочно ставить, если при пункции получен творожистый пунктат, а в препарате скудное количество клеток на фоне бесструктурного детрита. В отличие от туберкулеза при саркоидозе, сифилисе отсутствует в пунктате детрит, но можно обнаружить, как и при туберкулезе, эпителиоидные клетки и гигантские клетки Пирогова — Лангханса.

Элементы метастатического поражения раком. При метастазах рака в лимфатический узел обнаруживают комплексы атипических клеток с выраженным полиморфизмом, стертой границей, анизотизмом клеток и ядер, анизохромией их. Наряду с гигантскими клетками и интенсивно окрашенным ядром имеются более мелкие элементы с ядром нежной структуры и крупными нуклеолами. По морфологическим особенностям атипических клеток можно предполагать метастаз плоскоклеточного, железистого или недифференцированного рака. На основании цитологической картины пунктата можно высказать предположение и о локализации первичного очага опухоли. Однако с уверенностью определить локализацию первичной опухоли удается в тех случаях, когда опухоль имеет морфологические черты, свойственные тому органу, где образовалась опухоль. Это в первую очередь относится к гипернефроидному раку, раку шитовидной железы, яичка. В отношении метастазов рака молочной железы, желудочно-кишечного тракта, легких, не имеющих характерных морфологических особенностей, можно высказать лишь предположение на основании определенных типов цитологической картины. При метастазе меланомы опухолевые клетки в пунктате отличаются наличием гранул пигмента меланина сероватого и серовато-черного цвета. Меланин может располагаться и внеклеточно, а в редких случаях беспигментной меланомы и вовсе отсутствовать.

Элементы лейкемической инфильтрации. При *острых лейкозах* в мазках пунктата лимфатического узла обнаруживают тотальную властную инфильтрацию. Властные клетки отличаются полиморфизмом, по некоторым морфологическим, а особенно цитохимическим показателям возможна идентификация варианта острого лейкоза (см. 3.6). При

хроническом миелолейкозе и других миелопролиферативных заболеваниях в пунктате лимфатического узла обнаруживают наряду с небольшим количеством властных клеток миелоидные элементы разной стадии зрелости (см. 3.6). При *лимфолиферативных* заболеваниях имеет место пролиферация в лимфатических узлах опухолевых лимфоидных клеток, однако цитологическое исследование их при этой патологии малоинформативно. В неясных случаях, при атипичном течении прибегают к биопсии лимфатического узла с последующим гистологическим анализом.

Элементы гистиоцитоза. При гистиоцитозе Х обнаруживают в мазках лимфатических узлов пролиферацию гистиоцитов. Для болезни *Леттерера — Зиве* характерно наличие крупных клеток (20—25 мкм) с нежным ядром и 1—3 нуклеолами. Цитоплазма широкая, голубого цвета с выраженной вакуолизацией. В препарате, кроме атипичных гистиоцитов, имеются эозинофилы, плазматические клетки, лимфобласты, лимфоциты. При *болезни Хенда — Шюллера — Кричена* в препаратах выявляют патологические гистиоциты, содержащие в цитоплазме крупные капли липидов, когда цитоплазма клеток имеет пенный вид. При *эозинофильной гранулеме* в редких случаях поражения лимфатических узлов выявляют большое количество эозинофилов на фоне некроза ткани.

3.8.2. Гистологическое исследование

Биопсию лимфатических узлов проводят хирурги с соблюдением правил операционной техники.

Для большей информативности удаленный узел разрезают, из поверхности разреза готовят отпечатки, которые направляют на цитологическое исследование (3.8.1). Всю ткань удаленного лимфатического узла направляют в гистологическую лабораторию, где производят обработку ее с приготовлением и окраской срезов лимфатических узлов. Трактовка данных гистологического исследования лимфатических узлов представлена в специальной литературе.

Л и т е р а т у р а . Бычкова Е. Н., Демидова Н. В. Цитологические критерии дифференциальной диагностики злокачественных лимфом и реактивных лимфаденопатий (методические рекомендации). М., 1979, с. 32; Вылков И. Патология лимфатических узлов.— София, 1980, с. 156; Лукина Т. А. Метастазы злокачественных опухолей в лимфатических узлах.— В кн.: Руководство по цитологической диагностике опухолей человека / Под ред. А. С. Петровой, М. П. Птохова. М., 1976, с. 266.

Раздел 4

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ СИСТЕМЫ ГЕМОСТАЗА

В настоящем разделе выделены методы исследования тромбоцитарно-сосудистого гемостаза (первичного гемостаза), методы исследо-

вания свертывания крови (коагуляционного гемостаза) и методы исследования системы фибринолиза.

4.1. ВЗЯТИЕ И ОБРАБОТКА КРОВИ

Реактивы. 1. 3,8% раствор цитрата натрия; растворяют 3,8 г цитрата натрия ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 5,5 \text{H}_2\text{O}$) в 100 мл дистиллированной воды. Хранят в холодильнике. Легко подвергается бактериальному загрязнению, в связи с чем раствор хранят не более недели. 2. 1,34 % (0,1 моль/л) раствор оксалата натрия. Растворяют 1,34 г оксалата натрия ($\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$) в 100 мл дистиллированной воды. Хранят в холодильнике. 3. Этиловый спирт (для обработки кожи).

Оборудование. 1. Иглы стерильные для венепункции. 2. Пластиковые или стеклянные силиконированные пробирки (мерные центрифужные, а также немерные и нецентрифужные). Для взятия крови удобнее всего использовать пластиковые или стеклянные силиконированные центрифужные пробирки вместимостью 5—10 мл, а для хранения плазмы — пластиковые или стеклянные силиконированные пробирки размером 8—10 X 60—100 мм. 3. Стеклянные несиликонированные центрифужные и нецентрифужные пробирки. Используют для хранения разрушенных тромбоцитов и сыворотки крови, а также для исследования различных показателей системы гемостаза (для постановки проб). Для проведения анализов удобнее всего пользоваться пробирками размером 8—10 X 80—100 мм. 4. Стеклянные силиконированные и несиликонированные пипетки вместимостью 0,1—10 мл. Силиконированные пипетки используют для отсасывания или взятия нужного объема крови или плазмы, а несиликонированные — для отсасывания или взятия нужного объема суспензии разрушенных тромбоцитов, сыворотки крови и химических реактивов. В настоящее время в нашей стране налажен выпуск автоматических пипеток со съёмными пластиковыми наконечниками на 5—1000 мкл, которые удобны и пригодны как для обработки крови, так и для проведения анализов. 5. Центрифуги на разное число оборотов (от 1000 до 10000 в 1 мин). В ряде случаев необходима рефрижераторная центрифуга (см. описание методов исследования). 6. Ледяная баня (кружка со льдом и водой). 7. Водяная баня с контактными

термометром, реле и мешалкой. Используется для приготовления некоторых реактивов и (водяная баня на 37 °C) для проведения большинства анализов, описываемых в этом разделе. 8. Современный холодильник с хорошо изолированной морозильной камерой (для хранения реактивов и исследуемых образцов).

Техника взятия. Кровь берут утром натощак путем пункции локтевой вены сухой острой иглой с широким просветом без шприца. Допускается создание кратковременного венозного стаза. В случае получения нативной и стабилизированной крови первые капли венозной крови выпускают на ватный тампон, так как они могут содержать тканевый тромбопластин. За редким исключением (см. описание методов), кровь стабилизируют 3,8 % раствором цитрата натрия, поскольку в цитратной крови (плазме) лучше сохраняются лабильные факторы свертывания крови и тромбоциты.

При нормальном показателе гематокрита кровь и антикоагулянт смешивают в соотношении 9: 1, а при значительных отклонениях, от нормы — в соотношениях, указанных в табл. 34 (составлена по данным Ingram, Hills, 1982).

Таблица 34. Соотношение объемов 3,8 % раствора цитрата натрия и стабилизированной крови в зависимости от показателя гематокрита

Показатель гематокрита, %	Раствор антикоагулянта, мл	Объем крови вместе с антикоагулянтом, мл
20—21	1,4	10,0
22—27	1,3	10,0
28—33	1,2	10,0
34—39	1,1	10,0
40—45	1,0	10,0
46—51	0,9	10,0
52—57	0,8	10,0
58—60	0,7	10,0
Более 65	0,5	10,0
Для новорожденных	0,25	5,0

Приготовление стабилизированной крови. В пластиковую или стеклянную силиконированную мерную центрифужную пробирку набирают антикоагулянт, ориентируясь на данные табл. 34, и необходимый для исследования объем крови. Отмечают стеклографом на пробирке уровень, до которого должна быть набрана кровь. Пунктируют локтевую вену, подставляют пробирку и собирают свободно вытекающую кровь до метки. Немедленно перемешивают кровь с антикоагулянтом, не допуская образования воздушных пузырей. Ставят пробирку до центрифугирования в ледяную баню (кровь для исследования функций тромбоцитов охлаждать нельзя).

Приготовление богатой тромбоцитами (тромбоцитарной) плазмы. Стабилизированную кровь центрифугируют при 1000—1500 об/мин (около 300 г) в течение 5—7 мин и собирают супернатант.

Приготовление бедной тромбоцитами (бестромбоцитарной) плазмы. Стабилизированную кровь или тромбоцитарную плазму центрифугируют при 3000—4000 об/мин (1000—1200 г) в течение 15—20 мин и собирают супернатант. Тромбоцитарную и бестромбоцитарную плазму отсасывают стеклянными силиконированными или пластиковыми пипетками в стеклянные силиконирован-

ные или пластиковые пробирки. До исследования показателей свертывания и фибринолиза их хранят в ледяной бане, причем тесты должны быть проведены в течение 1—3 ч после взятия крови. До исследования функциональной активности тромбоцитов их хранят при комнатной температуре, причем тесты должны быть проведены в течение 1 ч.

Приготовление сыворотки. Венозную кровь набирают в простую стеклянную пробирку без антикоагулянта и помещают ее на 4 ч в водяную баню при 37 °С или оставляют при комнатной температуре на 24 ч. Отсасывают супернатант, центрифугируют его при 1500 об/мин в течение 5—10 мин и собирают надосадочную жидкость.

Сыворотку для определения продуктов деградации фибрина получают из крови, к которой добавляют тромбин и ингибитор фибринолиза с целью обеспечения наиболее полного превращения фибриногена в фибрин и устранения возможности активации системы фибринолиза после взятия крови. В расчете на 10 мл крови добавляют 0,1 мл раствора тромбина активностью 5—10 с и 0,1 мл трасилола. Вместо трасилола можно использовать эпислон-аминокапроновую кислоту в концентрациях 4—10 мг/мл. Свернувшуюся кровь инкубируют при 37 °С в течение 30—60 мин.

4.2. ОБРАБОТКА ЛАБОРАТОРНОЙ ПОСУДЫ

Реактивы. 1. Моющее-дезинфицирующий раствор — 4 % раствор перекиси водорода в 0,5 % растворе синтетического моющего средства («Астра», «Новость» и т. п.) (приказ № 752 МЗ СССР от 8.06.81 г. «Об усилении мероприятий по снижению заболеваемости вирусными гепатитами»). 2. Тoluол. 3. 5 % или 10 % раствор дихлордиметилсилана или трихлорметилсилана в толуоле. 4. Дистиллированная вода.

Оборудование. 1. Вытяжной шкаф. 2. Сушильный шкаф. 3. Эмалированные тазы, кастрюли. 4. Шприцы. 5. Набор резиновых груш. 6. Пинцет (для обработки игл). 7. Штативы для пробирок. 8. Набор ершей для мытья посуды.

Мытье загрязненной посуды. Загрязненную стеклянную или пластиковую посуду отмывают с помощью ершей и груш от исследуемого материала и реактивов водопроводной водой. Замачивают на 15—18 ч в моющее-дезинфицирующем растворе. Хорошо промывают водопроводной водой и 3—4 раза дистиллированной водой. Стеклянную посуду высушивают при температуре 180—200 °С, а пластиковую — при комнатной температуре или в сушильном шкафу при температуре не выше 60 °С.

Силиконирование посуды (проводится в вытяжном шкафу). Сухие чистые

колбы, пробирки, пипетки и иглы заполняют (при необходимости с помощью шприца и груш) 5 % или 10 % раствором дихлордиметилсилана или трихлорметилсилана в толуоле (раствором силикона) на 5—10 мин. Силикон сливают (его можно использовать многократно). Посуду высушивают при температуре 180—200 °С. Однажды покрытую силиконом посуду используют уже всегда как силиконированную, подвергая ее повторной обработке после каждого проведенного исследования.

Литература. *Андреев Г. В., Карабасова М. А., Лютова Л. В.* и др. Методы исследования фибринолитической системы крови.— М.: Изд. Московск. ун-та, 1981, с. 61—68; *Балуда В. П., Баркаган З. С., Гольдберг Е. Д.* и др. Лабораторные методы исследования системы гемостаза.— Томск, 1980, с. 55—61, 302—303; *Ingram G. I. C., Hills M.* Цит.: Архипов Б. Ф., Баркаган Л. З. Показатели аутокоагуляционного теста при эритремии.— Лаб. дело, 1982, № 10, с. 33 (609) — 36 (612); *Ratky S. M., Sykes A., Cooke E. D. et al.* Characterisation of serum fibrinogen degradation products using gel chromatography and radioimmunoassay.— *Thrombos. Haemostas.*, 1977, vol. 37, p. 471—476.

4.3. МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ ТРОМБОЦИТАРНО-СОСУДИСТОГО ГЕМОСТАЗА (ПЕРВИЧНОГО ГЕМОСТАЗА)

В эту группу входят методы исследования взаимодействия тромбоцитов и кровеносных сосудов *in vivo* при стандартизированных повреждениях микрососудов кожи (разрез, прокол, венозный стаз) и разнообразны методы исследования тромбоцитов и сосудов *in vitro*.

Наибольшее клиническое значение имеют методы определения длительности кровотечения и резистентности капилляров, а также методы определения количества тромбоцитов и их функциональных активностей (адгезивно-секреторно-агрегационной, коагуляционной и ретрактильной).

4.3.1. Время кровотечения

Общий принцип широко применяемых методов заключается в измерении длительности кровотечения из ранки на коже мочки уха, мякоти ногтевой фаланги пальца руки или верхней трети ладонной поверхности предплечья, наносимой автоматическим ланцетом, обычным плоским ланцетом или скарификатором. Описаны варианты теста, при проведении которых учитывается не только длительность кровотечения, но и объем теряемой крови. Ориентировочно он может быть оценен по количеству и вилчине пятен крови на фильтровальной бумаге, которой промокают выступающие капли крови.

Метод Дьюка (модифицированный). Принцип. Определяется длительность кровотечения из поверхностных микрососудов мочки уха после нарушения их целостности с помощью плоского ланцета или скарификатора.

Реактивы. 96 % раствор этанола (этиловый спирт) или эфир.

Оборудование. 1. Плоский ланцет или скарификатор с ограничителем глубины разреза. 2. Секундомер.

Ход определения. Мочку уха согревают между пальцами в течение 1 мин. Протирают спиртом (эфиром) и согревают настольной лампой с рефлектором до полного высыхания спирта. Производят прокол мочки уха у ее нижненаружного края (глубиной 3,5 мм и длиной линейного прокола 3 мм) и немедленно включают секундомер. Выступающие капли крови промокают каждые 30 с фильтровальной бумагой, не прикасаясь к ранке и дожидаясь момента, когда в течение очередных 30 с капля крови уже не образуется. По окончании этих 30 с секундомер останавливают и в последующем их вычитают из времени, зафиксированного на секундомере. Для большой точности тест выполняют дважды (на обеих мочках) и выводят среднее значение.

Нормальные величины: 2–5 мин (не более).

Клиническое значение. Время кровотечения удлиняется при выраженных тромбо-

цитопениях, болезни Виллебранда, тяжелых формах некоторых тромбоцитопатий. При нарушениях свертываемости крови (гемофилиях) оно обычно остается нормальным или удлиняется лишь слегка. Может быть удлинено при тяжелых формах тромбгеморрагического синдрома и значительной гепаринемии.

Примечания. 1. Описаны варианты теста без прогревания мочки уха и с глубиной прокола от 3 до 4 мм. 2. За рубежом распространен также метод Айви, при котором определяется длительность кровотечения из разреза кожи ладонной поверхности предплечья в условиях повышенного венозного давления.

Литература. Балуда В. П., Баркаган З. С., Гольдберг Е. Д. и др. Лабораторные методы исследования системы гемостаза.— Томск, 1980, с. 65–66; Caen J., Larrieu M. I., Samama M. L hemostase. Methodes d'exploration et diagnostic pratique.— Paris, 1968, p. 44–47; Markwardt F. Therapie der Blutstillungsstörungen. 2. Auflage.— Leipzig: Johann Ambrosius Barth, 1976, S. 38–39.

4.3.2. Резистентность (ломкость) капилляров

Тест, как правило, выполняется вне лаборатории, но имеет важное значение для диагностики тромбоцитарно-сосудистых нарушений. Обычно применяются различные варианты манжеточной (турникетной) пробы, заключающейся в определении образования точечных кровоизлияний на коже в области кратковременного повышения венозного давления, или варианты баночной пробы, которая основана на подсчете числа петехий на коже в зоне локально создаваемого отрицательного давления.

Манжеточная проба Румпеля — Леде — Кончаловского. Принцип. Подсчитывается количество петехий на ограниченном участке кожи ладонной поверхности предплечья, образующихся при дозированном повышении венозного давления.

Реактивы. Не требуются.

Оборудование. Сфигмоманометр.

Ход определения. На коже верхней части ладонной поверхности предплечья очерчивают круг диаметром 5 см. Накладывают на плечо этой же руки манжету сфигмоманометра и поддерживают в ней в течение 5 мин давление 90 мм рт. ст. Снимают манжету и через 5 мин после восстановления кровообращения в руке подсчитывают число петехий в очерченном круге. Обращают также внимание на размеры кровоизлияний.

Нормальные величины. Число петехий не превышает 10, а их диаметр составляет не более 1 мм.

Клиническое значение. При выраженных тромбоцитопениях, некоторых тромбо-

цитопатиях и ангиопатиях количество петехий на той же площади достигает 20 и более, нередко регистрируются кровоизлияния диаметром более 1 мм.

Л и т е р а т у р а . *Borchgrevink C. F.* In: *Thrombosis and bleeding disorders. Theory and methods.*— Stuttgart: Georg Thieme Verlag, 1971, p. 429.

4.3.3. Количество (подсчет) тромбоцитов

Подсчет тромбоцитов см. в разделе 3.5.

4.3.4. Ретенция (адгезивность) тромбоцитов

Известны прямые и непрямые методы оценки ретенции (адгезивности) тромбоцитов. Прямые заключаются в подсчете тромбоцитов, фиксирующихся на стандартной пластине (обычно стеклянной) при нанесении на нее крови или погружении ее в кровь. Непрямые методы основаны на установлении разницы между количествами тромбоцитов в венозной крови и в крови, вытекающей из ранки на коже пальца руки (или предплечья; адгезивность тромбоцитов *in vivo*), или в венозной крови до и после ее контакта с какой-либо поверхностью (адгезивность тромбоцитов *in vitro*). Наибольшее распространение получили методы определения ретенции (адгезивности) тромбоцитов *in vitro*.

Метод определения ретенции тромбоцитов на стеклянных шариках (модифицированный). Принцип. Определяется количество тромбоцитов, задерживаемых в колонке со стеклянными шариками при пропускании через нее со стандартной скоростью определенного объема крови.

Р е а к т и в ы . 1. 3,8 % раствор цитрата натрия. 2. 1 % раствор оксалата аммония.

О б о р у д о в а н и е . 1. Все, что необходимо для подсчета тромбоцитов в крови фазово-контрастным методом (см. 3.5). 2. Инфузионный насос, позволяющий опорожнять шприц на 5–10 мл со скоростью 2 мл/мин. 3. Полихлорвиниловая трубка с внутренним диаметром 3–3,5 мм. 4. Полиэтиленовые (пластиковые) или стеклянные силиконизированные шприцы вместимостью 5–10 мл. 5. Зажимы для полихлорвиниловой трубки или канюли от инъекционных игл. 6. Стеклянные шарики диаметром 0,2–0,4 мм. Шарики диаметром 0,1–1 мм, выпускаемые Уфимским заводом текстильного стекловолокна, просеивают через сито, задерживающее шарики диаметром более 0,4 мм, а затем оказавшиеся под ситом шарики просеивают через второе сито, которое пропускает шарики диаметром менее 0,2 мм. Оставшиеся на втором сите шарики требуемого диаметра промывают ацетоном и высушивают.

М а т е р и а л для исследования. Свежезятая цитратная кровь. За 7–10 дней до обследования лекарственные препараты от-

меняют, так как многие из них угнетают агрегацию тромбоцитов (см. 4.3.5) и могут исказить результаты.

П о д г о т о в к а колонки. Отрезок полихлорвиниловой трубки длиной 23–25 см закрывают с одного конца зажимом для трубки или канюлей от иглы (с расчетом, чтобы они пропускали кровь, но задерживали шарики), а с другого конца насыпают в трубку через микроворонку 2,5 г шариков.

Х о д определения. Берут пробу крови для подсчета тромбоцитов. Набирают в шприц 2 мл крови, присоединяют к нему колонку со стеклянными шариками (незакрытым концом) и устанавливают шприц в инфузионный насос. Включают насос и пропускают кровь через колонку за 1 мин. Вытекающую из колонки кровь собирают в пластиковую или стеклянную силиконизированную пробирку, перемешивают и снова берут пробу для подсчета тромбоцитов. Индекс ретенции (адгезивности) тромбоцитов вычисляют по формуле:

Индекс ретенции (адгезивности) =

$$= \frac{A - B}{A} \cdot 100 \%,$$

где A — количество тромбоцитов в крови до пропускания; B — количество тромбоцитов в крови после пропускания через колонку.

Н о р м а л ь н ы е величины: 20–55 %.

К л и н и ч е с к о е значение. Уменьшение индекса ретенции (адгезивности) тромбоцитов вплоть до 0 % наблюдается при ряде врожденных тромбоцитопатий и при болезни Виллебранда (табл. 35).

П р и м е ч а н и я . 1. При отсутствии инфузионного насоса можно воспользоваться вакуумным насосом или компрессором. 2. Ретенция тромбоцитов может быть исследована и с применением стеклоткани.

Л и т е р а т у р а . *Одесская Т. А., Шитикова А. С., Папаян Л. П.* К методике определения адгезивной активности тромбоцитов *in vitro*.— Лаб. дело, 1971, № 7, с. 395–398; *Смолянский А. Я., Детинкина Г. Н., Дынкина И. М.* Определение адгезивности (ретенции) тромбоцитов с применением стеклянных шариков.— Лаб. дело, 1985, № 2, с. 90–94.

4.3.5. Агрегация тромбоцитов

Наиболее распространенные способы оценки агрегации тромбоцитов заключаются в исследовании скорости и степени уменьшения оптической плотности (увеличения светопропускающей способности) тромбоцитарной плазмы при перемешивании с индукторами агрегации (при изучении спонтанной агрегации они не добавляются). Образование агрегатов тромбоцитов под действием стимуляторов может быть оценено также визуально или с помощью микроскопа.

Таблица 35. Наиболее частые формы врожденных нарушений функций тромбоцитов

Болезнь (синдром)	Ретенция тромбоцитов	Агрегация под действием				Ретракция сгустка	
		АДФ, адреналина		коллагена	бычьего фибриногена		ристоцетина (ристомидина)
		первая волна	вторая волна				
Тромбастения Гланцманна	Нарушена	Нарушена	Нарушена	Нарушена	Нормальная	Нормальная	Нарушена
Аспириноподобный синдром	Нормальная или нарушена	Нормальная	»	»	»	>	Нормальная
Болезнь (недостаточность) пула хранения	Нарушена	То же	»	»	»	>	»
Болезнь (синдром) Бернара — Сулье	»	Нормальная или нарушена	Нормальная или нарушена	Нормальная	Нарушена	Нарушена	»
Болезнь (синдром) Виллебранда	»	Нормальная	Нормальная	»	Нормальная	»	»

Качественный макроскопический метод. Принцип. Определяется визуально наличие или отсутствие агрегатов тромбоцитов в пробирке, где исследуемая тромбоцитарная плазма перемешивается со стимулятором агрегации.

Реактивы. 1. 3,8 % раствор цитрата натрия. 2. Раствор АДФ в изотоническом растворе натрия хлорида или буфере Михаэлиса рН 7,35 в концентрации 20 мкг/мл. 3. 0,85 % раствор хлорида натрия или буфер Михаэлиса рН 7,35. Веронал-ацетатный буфер Михаэлиса (пропись Оврена — Коллера): раствор А — диэтилбарбитуровокислый натрий — 7,35 г, ацетат натрия — 4,86 г, дистиллированная вода — 250 мл; буфер: раствор А — 250 мл, 4,25% раствор натрия хлорида — 200 мл; 0,1 моль/л раствор HCl — 217 мл, дистиллированная вода — 683 мл.

Оборудование. 1. Водяная баня на 37 °С. 2. Секундомер.

Материал для исследования. Тромбоцитарная плазма, лучше со стандартным содержанием тромбоцитов (250000 в 1 мкл). За 7—10 дней до обследования лекарственные препараты отменяют, так как многие из них (дипиридамол и его производные, ацетилсалициловая кислота и ее производные, индометацин, гироксидорохин, фенилбутазон, сульфипиразон, низкомолекулярные декстраны, трициклические антидепрессанты и др.) угнетают агрегацию тромбоцитов.

Ход определения. Набирают в пробирку 0,2 мл плазмы и ставят ее в водяную баню при 37 °С. Через 1 мин добавляют 0,1 мл раствора АДФ и немедленно включают секундомер. Покачивая или потряхивая пробирку, отмечают время образования в смеси крупных агрегатов тромбоцитов.

Нормальные величины. 10—60 с.

Клиническое значение. При тромбастении Гланцманна агрегация тромбоцитов не наступает.

Примечание. Макроскопическим методом может быть исследована также агрегация под действием коллагена (в конечных концентрациях 20—50 мкг/мл), ристоцетина (ристомидина) и бычьего фибриногена (оба в конечных концентрациях 1—1,5 мг/мл). В случае нарушения реакции высвобождения тромбоцитов агрегация не развивается при перемешивании с коллагеном; для болезни Виллебранда характерен дефект ристоцилин-агрегации; болезнь Бернара — Сулье распознается по отсутствию одновременно ристоцилин- и фибриноген-агрегации (см. табл. 35).

Литература. Caen J., Larrieu M. I., Samama M. Lhemostase. Methodes d'exploration et diagnostic pratique.— Paris, 1968, p. 58—59; Human blood coagulation, haemostasis and thrombosis / Ed. Biggs R. M.— Oxford, 1976, p. 738.

Количественный фотометрический метод.

Принцип. С помощью агрегометра (агрегатометра), представляющего собой фотометр с присоединенным к нему самописцем, непрерывно регистрируются изменения светопропускающей способности тромбоцитарной плазмы при перемешивании с агрегирующими агентами.

Реактивы. 1. Раствор АДФ в конечных концентрациях 10^{-7} — 10^{-2} моль/л. 2. Суспензия коллагена в конечных концентрациях 20—50 мкг/мл. 3. Раствор ристоцетина (ристомидина) в конечных концентрациях 1—1,5 мг/мл. 4. Раствор бычьего фибриногена в конечных концентрациях 1—1,5 мг/мл. 5. Раствор адреналина (неампулированного) в конечных концентрациях 10^{-8} — 10^{-2} моль/л. 6. Раствор тромбина в конечных концентрациях 0,1—0,5 ЕД/мл. 7. Раствор арахидоновой кислоты в конечных концентрациях 0,1—1 ммоль/л.

Оборудование. Агрегометр (агрегатометр).

Материал для исследования. Тромбоцитарная и бестромбоцитарная плазмы. В тромбоцитарной плазме подсчитывают тромбоциты (см. 3.5) и разводят ее бестромбоцитарной плазмой до концентрации 200 000—300 000 в 1 мкл ($200 \cdot 10^9$ — $300 \cdot 10^9$ /л). За 7—10 дней до обследования лекарственные препараты отменяют (см. макроскопический метод).

Ход определения. В соответствии с инструкцией.

Нормальные величины. Зависят от типа агрегометра, приводятся в инструкции.

Клиническое значение. Описывается в инструкции.

В целом при анализе агрегатограмм обращают внимание на общий характер агрегации (одноволновая, двухволновая; полная, неполная; обратимая, необратимая), разницу между светопропускающей способностью плазмы до начала агрегации и после достижения максимальной агрегации (характеризует интенсивность агрегации), а также увеличение светопропускающей способности плазмы за первую минуту агрегации или угол наклона кривой на этапе бурной агрегации (характеризует скорость агрегации). При применении в качестве стимулятора коллагена учитывается также длительность латентного периода в его действии (время от момента добавления раствора коллагена к исследуемому образцу до начала агрегации).

Важно отметить, что появление двухволновой агрегации при стимуляции АДФ и адреналином в концентрациях, вызывающих в норме обратимую агрегацию (обычно $1 \cdot 10^{-5}$ — $5 \cdot 10^{-5}$ моль/л), указывает на повышение чувствительности тромбоцитов к этим индукторам, а развитие одноволновой неполной (а часто и обратной) агрегации при стимуляции ими в концентрациях 10^{-4} моль/л и больше — на нарушение реакции высвобождения (реакции дегрануляции, секреторной реакции) тромбоцитов.

При обследовании больных с врожденной кровоточностью микроциркуляторного и микроциркуляторно-гематомного типов следует иметь в виду дифференциально-диагностическое значение сочетаний нарушений агрегации при применении набора стимуляторов (см. табл. 35).

Литература. Баркаган З. С. Геморрагические заболевания и синдромы.— М., 1980, с. 85; Папаян А. В., Шабалов Н. П. Геморрагические диатезы у детей. Руководство для врачей.— Л., 1982, с. 186—187; Ingram G. I. S., Brozovic M., Slater N. G. P. Bleeding disorders investigation and management.— Blackwell scientific publications, 1982, p. 270—276.

4.3.6. Коагуляционная (коагулянтная, прокоагулянтная) активность тромбоцитов

Чаще всего определяется в тесте генерации тромбопластина (см. 4.4.10), но может быть оценена и более простым методом, например путем сравнительного исследования ускоряющего влияния активированных каолином тромбо-

цитов обследуемого и здорового человека на свертывание бестромбоцитарной нормальной плазмы.

Литература. 1. Human blood coagulation, haemostasis and thrombosis / Ed. Biggs R. M.— Oxford, 1976, p. 745—746.

4.3.7. Ретракция сгустка крови

Описаны прямые и непрямые методы оценки ретракции сгустка крови. Прямые основаны на применении специальных устройств, позволяющих измерить величину ретрактивных сил, развивающихся в сгустке при его самопроизвольном сокращении. Непрямые методы заключаются в измерении объема сыворотки, выделяемой из сгустка крови при его ретракции, или в оценке степени уменьшения объема сгустка разведенной плазмы со стандартным содержанием тромбоцитов в процессе его спонтанного сжатия. В клинике наибольшее распространение получили непрямые методы.

Качественный метод. Принцип. Через стандартное время после инкубации пробирки с цельной нестабилизированной кровью при 37°C оценивают визуально наличие или отсутствие ретракции сгустков крови.

Реактивы. Не требуются.

Оборудование. Водяная баня на 37°C .

Материал для исследования. Цельная нестабилизированная кровь.

Ход определения. В 3 пробирки набирают по 1 мл исследуемой крови и помещают их в водяную баню. Через 2 ч смотрят, наступила ли ретракция сгустков крови.

Нормальные величины. Сгустки крови здоровых людей начинают ретрагировать через 30—60 мин. Результат считается положительным, т. е. учитывается как «1», если ретракция сгустка наблюдается хотя бы в одной пробирке. При отсутствии ретракции во всех пробирках проба считается отрицательной и учитывается как «0».

Клиническое значение. Отсутствие ретракции сгустков крови наблюдается при выраженных тромбоцитопениях и тромбастении.

Количественный метод. Принцип. Определяется объем сыворотки, выделяемой при ретракции сгустка крови, по отношению к объему плазмы в исследуемой крови.

Реактивы. Не требуются.

Оборудование. 1. Водяная баня на 37°C . 2. Центрифуга лабораторная. 3. Центрифуга гематокритная. 4. Градуированная центрифужная пробирка вместимостью 5 мл с делениями по 0,1 мл.

Материал для исследования. Цельная нестабилизированная кровь.

Ход определения. В градуированную центрифужную пробирку набирают 5 мл крови, помещают ее в водяную баню и опускают в кровь деревянную палочку. Одновременно определяют показатель гематокрита в исследуемой крови. Через 1 ч после свертывания крови сгусток, прикрепившийся к палочке, удаляют, дав жидкой части стечь обратно в пробирку.

Измеряют объем жидкости, оставшейся в пробирке, центрифугируют ее при 3000 об/мин в течение 5 мин и измеряют объем осевших эритроцитов. Определяют объем сыворотки (по разнице между объемом оставшейся в пробирке жидкости и объемом эритроцитов). Вычисляют ретракцию сгустка по формуле:

$$\text{Ретракция сгустка} = \frac{OC}{OK \cdot (П/100)} \cdot 100 \%,$$

где OC — объем сыворотки; OK — объем крови, $(П/100)$ — показатель плазмокрита (100 минус

показатель гематокрита), деленный на 100 (знаменатель в формуле представляет собой объем плазмы в исследуемой крови).

Нормальные величины: 40—95 %.

Клиническое значение. Уменьшенные ретракции сгустка крови наблюдаются при выраженных тромбоцитопениях и тромбастении (вплоть до полного отсутствия — 0%).

Литература. *Bowie E. J. W., Thompson J. H., Didisheim P., Owen C. A.* Mayo clinic laboratory manual of hemostasis. — W. B. Saunders company, 1971, p. 29—33.

4.4. МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ СВЕРТЫВАНИЯ КРОВИ (КОАГУЛЯЦИОННЫЙ ГЕМОСТАЗ, КОАГУЛЯЦИОННОЕ ЗВЕНО ИЛИ КОМПОНЕНТ СИСТЕМЫ ГЕМОСТАЗА)

Ориентировочные методы исследования коагуляционного гемостаза. К числу ориентировочных (интегральных) относят методы, характеризующие процесс гемокоагуляции в целом, его отдельные фазы, внешний и внутренний механизмы образования протромбиназы и группы факторов свертывания крови (номенклатура, характеристика и формы недостаточности факторов свертывания крови представлены в табл. 36).

4.4.1. Время свертывания крови

Унифицированный метод определения времени свертывания крови (1974). Принцип. Определяют время свертывания цельной нестабилизированной венозной крови при 37 °С.

Реактивы. Не требуются.

Оборудование. 1. Водяная баня на 37 °С. 2. Секундомеры.

Материал исследования. Цельная нестабилизированная венозная кровь.

Ход определения. Сухой иглой с широким просветом без шприца пунктируют локтевую вену. Выпустив первые капли крови на ватный тампон, набирают по 1 мл в 2 сухие пробирки одинакового размера. Немедленно включают секундомер и ставят пробирки в водяную баню. Через 2 мин, а затем через каждые 30 с пробирки наклоняют на 45—60°, дожидаясь момента, когда кровь свернется. Отмечают время образования сгустка крови в каждой из пробирок и вычисляют средний результат.

Нормальные величины: 5—10 мин.

Клиническое значение. Удлинение времени свертывания крови до 15 мин и более наблюдается при тяжелой недостаточности факторов, участвующих во внутреннем пути образования протромбиназы, дефиците протромбина и фибриногена, а также при наличии в крови ингибиторов свертывания, в частности гепарина.

Примечание. На практике применяют также упрощенные и усложненные варианты теста. При упрощенных вариантах свертывания крови определяют при комнатной тем-

пературе или в одной пробирке (они менее точные). Усложненные заключаются в исследовании свертывания крови в 3—4 пробирках или внесении поправки на ускорение свертывания, вызываемое перемешиванием крови.

Литература. *Балуда В. П., Баркаган З. С., Гольдберг Е. Д.* и др. Лабораторные методы исследования системы гемостаза. — Томск, 1980, с. 124—127.

4.4.2. Время рекальцификации стабилизированной крови (плазмы)

Общесоеночной пробой на свертывание стабилизированной крови (плазмы) является реакция рекальцификации, которая заключается в определении времени свертывания плазмы (исследования крови дают менее воспроизводимые результаты) после добавления к ней раствора хлорида кальция оптимальной концентрации.

Унифицированный метод определения времени рекальцификации плазмы (1974). Принцип. Определяют время свертывания тромбоцитарной плазмы при добавлении оптимального количества хлорида кальция.

Реактивы. 1. 1,34% раствор оксалата натрия или 3,8 % раствор цитрата натрия (см. 4.1). 2. 0,025 моль/л (0,277%) раствор хлорида кальция. Растворяют 277 мг высушенного до постоянной массы хлорида кальция в 100 мл дистиллированной воды или разводят 5 % раствор хлорида кальция в 18 раз дистиллированной водой. Для приготовления 5 % раствора 5,2—5,5 г прокаленного на газовой горелке в фарфоровом тигле хлорида кальция растворяют в 100 мл дистиллированной воды и с помощью чувствительного ареометра определяют отн. плотность раствора при 20 °С. Если она отличается от 1,040, то, добавляя сухой хлорид кальция или дистиллированную воду, доводят ее до этой величины. Отн. плотность 1,040 соответствует 5 % раствору хлорида кальция. 3. 0,85 % раствор хлорида натрия.

Т а б л и ц а 36. Номенклатура, краткая характеристика и формы врожденной недостаточности факторов свертывания крови

Фактор	Краткая характеристика фактора	Состояния и болезни, обусловленные недостаточностью фактора	
		название	тип наследования
Фактор I, фибриноген	Образуется в печени и клетках ретикулоэндотелия, К-витаминнезависим, стабилен при хранении плазмы, в адсорбированной плазме сохраняется, в сыворотке отсутствует. Под действием тромбина превращается в фибрин, составляющий основу сгустка крови (субстрат свертывания)	Афибриногемия, гипофибриногемия, дисфибриногемия	Аутосомно-рецессивный Аутосомный Аутосомно-доминантный
Фактор II, протромбин	Образуется в печени, К-витаминозависим, стабилен при хранении плазмы, в адсорбированной плазме и сыворотке отсутствует. Под действием протромбиназного комплекса превращается в тромбин, вызывающий свертывание фибриногена	Гипопротромбинемия	Аутосомно-рецессивный
Фактор III, тканевые тромбопластины	Высокомолекулярные липопротеиды тканей, обладающие свойствами мембран. При взаимодействии с фактором VII и ионами кальция образуют внешний активатор фактора X — ключевого компонента протромбиназного комплекса	—	—
Фактор IV, ионы кальция	Участвует в активации ряда факторов свертывания крови, включаясь в состав их комплексов (комплекс факторов XII и XI активируется и в декальцинированной плазме)	—	—
Фактор V, Асглобулин, протромбин	Образуется в печени, К-витаминнезависим, при хранении плазмы быстро инактивируется, в адсорбированной плазме сохраняется, в сыворотке отсутствует. Участвует в образовании протромбиназного комплекса (состоит из активированных факторов V и X, ионов кальция и фактора 3 тромбоцитов)	Парагемофилия, гипоакцелеринемия	Аутосомно-рецессивный
Фактор VII, проконвертин	Образуется в печени, К-витаминозависим, стабилен при хранении плазмы, в адсорбированной плазме отсутствует, в сыворотке сохраняется. Участвует во «внешнем» пути формирования протромбиназы, образуя с тканевым тромбопластином и ионами кальция комплекс, активирующий фактор X	Гипопротромбинемия	То же
Фактор VIII, антигемофильный глобулин А в комплексе с фактором Виллебранда	Место синтеза антигемофильного глобулина А точно не установлено, К-витаминнезависим, при хранении плазмы быстро инактивируется, в адсорбированной плазме сохраняется, в сыворотке отсутствует. Участвует во «внутреннем» пути формирования протромбиназы, усиливая активирующее действие фактора IXa на фактор X. Фактор Виллебранда синтезируется в эндотелиальных клетках сосудов и определяет антигенную активность комплекса фактора VIII, является кофактором адгезии и ристоцетин-агрегации тромбоцитов	Дефицит антигемофильного глобулина А (гемофилия А) Дефицит фактора Виллебранда (болезнь Виллебранда)	Рецессивный, сцепленный с X-хромосомой Аутосомно-доминантный
Фактор IX, фактор Кристмаса, антигемофильный глобулин В	Образуется в печени, К-витаминозависим, стабилен при хранении плазмы, в адсорбированной плазме отсутствует, в сыворотке сохраняется. Участвует во «внутреннем» пути формирования протромбиназы, активируя в комплексе с фактором VIII, ионами кальция и фактором 3 тромбоцитов фактор X	Дефицит антигемофильного глобулина В (гемофилия В)	Рецессивный, сцепленный с X-хромосомой
Фактор X, фактор Стюарта — Прауэра	Образуется в печени, К-витаминозависим, стабилен при хранении плазмы, в адсорбиро-	Дефицит фактора X (болезнь Стюарта —	Аутосомно-рецессивный

Фактор	Краткая характеристика фактора	Состояния и болезни, обусловленные недостаточностью фактора	
		название	тип наследования
		Прауэра)	
Фактор XI, фактор Розенталя, плазменный предшественник тромбопластина	ванной плазме отсутствует, в сыворотке сохраняется. Является ключевым компонентом протромбиназного комплекса, превращающего протромбин в тромбин. Активация фактора X может осуществляться как по «внутреннему», так и по «внешнему» пути свертывания крови Место синтеза точно не установлено, К-витаминезависим, стабилен при хранении плазмы, в адсорбированной плазме и сыворотке сохраняется. Участвует во «внутреннем» пути формирования протромбиназы, активируя фактор IX (в комплексе с активированным фактором XII и фактором 3 тромбоцитов)	Дефицит фактора XI (болезнь Розенталя)	То же
Фактор XII, фактор Хагемана, контактный фактор	Место синтеза не установлено, К-витаминезависим, стабилен при хранении плазмы, в адсорбированной плазме и сыворотке сохраняется. Участвует во «внутреннем» пути формирования протромбиназы, активируя фактор XI	Дефицит фактора XII (болезнь Хагемана)	» »
Фактор XIII фибринстабилизирующий фактор, фибриназа	Место синтеза не установлено, К-витаминезависим, стабилен при хранении плазмы, в адсорбированной плазме сохраняется, в сыворотке отсутствует. Укрепляет дополнительными связями фибрин-полимер, превращая растворимый фибрин S в нерастворимый фибрин I	Дефицит фактора XIII	» »

Оборудование. 1. Водяная баня на 37 °С. 2. Секундомеры.

Материал для исследования. Тромбоцитарная плазма.

Ход определения. В пробирку, установленную в водяной бане, наливают 0,2 мл раствора хлорида кальция и 0,1 мл 0,85 % раствора хлорида натрия. Через 1 мин в пробирку вводят 0,1 мл плазмы, немедленно включают секундомер и отмечают время образования сгустка. Исследование повторяют 2—3 раза и вычисляют средний результат.

Нормальные величины: 60—120с.

Клиническое значение. Укорочение времени рекальцификации указывает на гиперкоагуляцию, удлинение — на гипокоагуляцию. Удлинение этого времени может быть связано с врожденной недостаточностью плазменных факторов свертывания (за исключением факторов VII и XIII), наличием в крови ингибиторов свертывания крови или выраженным дефицитом фактора 3 тромбоцитов (тромбоцитопения, тромбоцитопатия с недостаточностью фактора 3). Может быть удлинено при диссеминированном внутрисосудистом свертывании крови (в стадии «коагулопатии потребления»).

Примечание. В последние годы рекомендуется определять время рекальцификации

плазмы в условиях стандартной контактной активации свертывания каолином.

Литература. Балуда В. П., Баркагаи З. С., Гольдберг Е. Д. и др. Лабораторные методы исследования системы гемостаза.— Томск, 1980, с. 129; Детинкина Г. Н., Дынкина И. М., Торик Ж.-Н. Предложения по унификации методов исследования системы гемостаза,—Лаб. дело, 1983, № 5, с. 269—270.

4.4.3. Активированное частичное (парциальное) тромбопластиновое время (АЧТВ)

Важной модификацией определения активированного времени рекальцификации плазмы является АЧТВ, заключающееся в исследовании реакции рекальцификации плазмы в условиях стандартизации не только контактной, но и фосфолипидной активации. С этой целью к плазме наряду с контактным активатором добавляют частичный (парциальный) тромбопластин, который в функциональном отношении подобен тромбоцитарному тромбопластину. В качестве заменителя тромбоцитарного тромбопластина обычно используют эритрофосфатид или кефалин. Чувствительность этих тестов к дефициту плазменных факторов свертывания крови (иск-

лючая факторы VII и XIII) выше, но зато стандартная фосфолипидная активация делает невозможным выявление недостаточности коагуляционной активности тромбоцитов.

Метод определения каолин-эритрофосфатидного времени. Принцип. Определяется время рекальцификации бестромбоцитной плазмы в условиях стандартизованной контактной (каолином) и фосфолипидной (эритрофосфатидом) активации свертывания крови.

Реактивы. 1. 3,8 % раствор цитрата натрия (см. 4.1). 2. 0,025 моль/л раствор хлорида кальция (см. 4.4.2). 3. 0,85 % раствор хлорида натрия. 4. Каолин-эритрофосфатидная смесь: 2,5–3 % эмульсию фосфолипидов эритроцитов, выпускаемую Минским институтом переливания крови под названием эритрофосфатид, разводят 0,85 % раствором хлорида натрия до 0,1 % эмульсии, расфасовывают по 1 мл во флаконы или ампулы, герметично закрывают и хранят при -20°C . Перед работой эмульсию размораживают, разводят 0,85 % раствором хлорида натрия до концентрации 0,01 % и добавляют каолин (белая глина — $\text{Al}_2\text{O}_3\text{-SiO}_2\text{-}2\text{H}_2\text{O}$; Курский химико-фармацевтический завод) из расчета 5 мг на 1 мл эмульсии.

Оборудование. 1. Водяная баня на 37°C . 2. Секундомеры.

Материал для исследования. Бестромбоцитарная плазма.

Ход определения. В пробирку вводят 0,1 мл исследуемой плазмы и 0,1 мл каолин-эритрофосфатидной смеси, перемешивают содержимое и ставят пробирку в водяную баню. Через 5 мин в пробирку добавляют 0,1 мл предельно прогретого при 37°C раствора хлорида кальция и немедленно включают секундомер. Вынимая пробирку из бани каждые 1–2 с и слегка наклоняя ее, отмечают время образования сгустка. Исследование повторяют и вычисляют средний результат.

Нормальные величины: 38–55 с.

Клиническое значение. Удлинение АЧТВ наблюдается при врожденной недостаточности факторов свертывания крови (за исключением факторов VII и XIII), наличии в крови ингибиторов свертывания (в частности, при лечении гепарином), диссеминированном внутрисосудистом свертывании крови и фибринолизе. Укорочение АЧТВ указывает на гиперкоагуляцию и рассматривается как фактор риска тромбозов.

Примечания. 1. Вместо эритрофосфатида можно использовать кефалин. 2. На основе определения АЧТВ разработаны коррекционные пробы на выявление недостаточности факторов свертывания крови XII, XI, IX и VIII, а также циркулирующих ингибиторов и методы количественного определения факторов свертывания XII, XI, IX и VIII. 3. Определение АЧТВ является распространенным способом контроля за лечением гепарином.

Литература. Балуда В. П., Баркаган З. С., Гольдберг Е. Д. и др. Лабораторные методы исследования системы гемостаза.—

Томск, 1980, с. 147–148, 299–300; Детинкина Г. Н., Дыпкина И. М., Торик Ж. Н. Предложение по унификации методов исследования системы гемостаза.— Лаб. дело, 1984, № 5 с. 270–271.

4.4.4. Протромбиновое время (протромбиновый индекс)

Это вариант определения времени рекальцификации плазмы с добавлением тканевого тромбoplastина. В комплекс с фактором VII и Ca^{2+} он непосредственно активирует фактор X, так что результаты теста зависят от активности фактора VII, фактора X и факторов, включенных в процесс свертывания крови на этапах тромбино- и фибринообразования (факторов V, II и I).

На основе исследования протромбинового времени разработаны одностадийные методы определения факторов II, V и VII.

Унифицированный метод определения протромбинового времени плазмы (1974). Принцип. Определяют время свертывания плазмы при добавлении тромбoplastина и хлорида кальция.

Реактивы. 1. 3,8 % раствор цитрата натрия или 1,34 % раствор оксалата натрия (см. 4.1). 2. 0,025 моль/л раствор хлорида кальция (см. 4.4.2). 3. 1 % суспензия тромбoplastина. При недостаточно активном тромбoplastине (удлиненное протромбиновое время плазмы крови донора) используют 2 % суспензию.

Оборудование. 1. Водяная баня на 37°C . 2. Секундомеры.

Материал для исследования. Бестромбоцитарная плазма.

Ход определения. В пробирку наливают 0,1 мл плазмы донора и 0,1 мл раствора тромбoplastина и ставят пробирку в водяную баню. Через 1 мин туда же добавляют 0,1 мл раствора хлорида кальция, немедленно включают секундомер и отмечают время образования сгустка. Исследование повторяют и вычисляют средний результат. Точно так же определяют время свертывания исследуемой плазмы.

Нормальные величины: 12–20 с (в зависимости от активности тромбoplastина).

Клиническое значение. Удлинение протромбинового времени наблюдается при врожденной или приобретенной недостаточности факторов, отражающих функционирование внешнего механизма образования протромбиназы, ее действие на протромбин и последующее образование фибрина (факторы X, VII, V, II, I). Обычно оно отмечается у больных, принимающих оральные антикоагулянты (неодикумарин, фенилин, синкумар, омефин), при тяжелых поражениях паренхимы печени и недостаточности витамина K (механическая желтуха, нарушения всасывания в кишечнике, кишечный дисбактериоз). Терапия непрямыми антикоагулянтами считается адекватной, если протромбиновое время увеличивается примерно в 2 раза.

Примечания. 1. Нередко применяется вариант, отличающийся тем, что растворы

тромбопластина и хлорида кальция предварительно смешивают в соотношении 1 : 1 и к 0,1 мл плазмы добавляют 0,2 мл тромбопластин-кальциевой смеси. 2. При лечении оральными антикоагулянтами уменьшается активность не только факторов X, VII и II, отражающаяся на протромбиновом времени, но и фактора IX, недостаточность которого не влияет на протромбиновое время. В связи с этим контроль за лечением антивитаминами К осуществляется путем сочетанного определения протромбинового времени и АЧТВ (см. 4.4.3), чувствительного к дефициту фактора IX. 3. Часто результаты исследования выдают в виде протромбинового индекса, который представляет собой выраженное в процентах отношение протромбинового времени нормальной плазмы к протромбиновому времени исследуемой плазмы. У здоровых людей он колеблется в пределах 95—105 %. Уменьшение протромбинового индекса имеет такое же значение, как удлинение протромбинового времени.

Унифицированный метод определения протромбинового времени разведенной плазмы (1974). Принцип тот же.

Реактивы те же и дополнительно 0,85 % раствор хлорида натрия.

Оборудование то же.

Материал для исследования. Бестромбоцитарная исследуемая и донорская плазма.

Ход определения. Донорскую плазму разводят 0,85 % раствором хлорида натрия в соотношении 1 : 1. В пробирку набирают 0,2 мл раствора хлорида кальция, добавляют 0,1 мл суспензии тромбопластина и ставят в водяную баню. Через 30 с вводят туда же 0,1 мл разведенной плазмы, немедленно включают секундомер и отмечают время образования сгустка. Исследование повторяют и берут средний результат. Точно так же определяют протромбиновое время исследуемой плазмы.

Нормальные величины примерно те же, колеблются в зависимости от активности тромбопластина.

Клиническое значение то же.

Унифицированный метод определения протромбинового времени капиллярной крови (1974). Принцип. Определяют время свертывания цитратной капиллярной крови при добавлении суспензии тромбопластина и раствора хлорида кальция.

Реактивы. 1. 3,8 % раствор цитрата натрия (см. 4.1). 2. 0,5 % раствор хлорида кальция. 3. 1 % или 2 % суспензия тромбопластина.

Оборудование. 1. Водяная баня на 37 °С. 2. Секундомеры. 3. Скарификаторы. 4. Микропипетки вместимостью 0,1 мл.

Материал для исследования. Цитратная исследуемая и донорская кровь.

Ход определения. В микропипетку набирают 0,02 мл раствора цитрата натрия. Мякоть пальца донора протирают спиртом и после его высыхания делают прокол стерильным скарификатором. Набирают в ту же микропипетку 0,08 мл свободно выступающей крови,

немедленно выдувают содержимое в пробирку и перемешивают кровь с антикоагулянтом. Точно так же набирают цитратную кровь еще в две пробирки. Каждую пробирку устанавливают последовательно в водяную баню и через 1 мин добавляют 0,1 мл суспензии тромбопластина и 0,1 мл раствора хлорида кальция. В момент добавления последнего реактива включают секундомер и отмечают время образования сгустка. Вычисляют средний результат. Точно так же берут цитратную кровь у обследуемого лица и определяют ее протромбиновое время.

Нормальные величины примерно те же, колеблются в зависимости от активности тромбопластина.

Клиническое значение то же.

Литература. *Балуда В. П., Баркаган З. С., Гольдберг Е. Д.* и др. Лабораторные методы исследования системы гемостаза.— Томск, 1980, с. 169—170.

4.4.5. Время свертывания плазмы при активации фактора X

Относящиеся к этой группе пробы можно представить как еще две важные модификации определения времени рекальцификации. В одном случае к плазме перед рекальцификацией добавляют только активатор фактора X, а в другом — активатор фактора X и заменитель тромбоцитарного тромбопластина. Таким образом, в одном случае обеспечивается стандартная активация только фактора X, а в другом — стандартная активация фактора X и стандартная фосфолипидная активация. В качестве активатора фактора X используют яд гадюки Рассела (препарат стипвен) или яд отечественной гюрзы (препарат лебетокс), а в качестве заменителя тромбоцитарного тромбопластина — эритрофосфатид или кефалин. Сопоставление результатов этих проб между собой и с результатами определения протромбинового времени позволяет дифференцировать недостаточность фактора 3 тромбоцитов и дефицит плазменных факторов VII и X. На основе лебетокс-эритрофосфатидного (стипвен-кефалинового) времени разработан количественный метод определения активности фактора X.

Метод определения лебетокс-времени (стипвен-времени). Принцип. Исследуется время рекальцификации тромбоцитарной плазмы в условиях стандартной активации фактора X.

Реактивы. 1. 3,8% раствор цитрата натрия (см. 4.1). 2. 0,025 моль/л раствор хлорида кальция (см. 4.4.2). 3. Раствор лебетокса или стипвена («Стаго», Франция, и др.) с активностью 15—20 с, т. е. в условиях опыта, описываемых ниже, нормальная плазма должна свернуться за 15—20 с. 4. 0,85 % раствор хлорида натрия или буфер Михаэлиса рН 7,35 (см. 4.3.5).

Оборудование. 1. Водяная баня на 37 °С. 2. Секундомеры.

Материал для исследования. Тромбоцитарная плазма.

Ход определения. В одну пробирку наливают 0,1 мл исследуемой плазмы и 0,1 мл

0,85 % раствора хлорида натрия (буфера Михаэлиса), а в другую — 0,1—0,15 мл рабочего раствора лебетокса или стипвена и 0,1—0,15 мл раствора хлорида кальция. Обе пробирки помещают в водяную баню. Через 1—2 мин из пробирки, содержащей смесь растворов лебетокса и хлорида кальция, 0,2 мл переносят в пробирку с исследуемой плазмой. В момент добавления смеси включают секундомер и отмечают время образования сгустка. Исследование повторяют и вычисляют средний результат.

Нормальные величины: 15—20 с.

Клиническое значение. Удлинение лебетокс (стипвен)-времени наблюдается при врожденной недостаточности факторов X, V, II и I, тяжелых поражениях паренхимы печени, механической желтухе, нарушениях всасывания в кишечнике, лечении антивитаминами K, тромбоцитопениях, тромбоцитопатии с недостаточностью фактора 3 тромбоцитов, диссеминированном внутрисосудистом свертывании крови и остром фибринолизе. Нормальное лебетокс (стипвен)-время в сочетании с удлинением протромбинового времени указывает на недостаточность фактора VII.

Метод определения лебетокс-эритрофосфатидного (лебетокс-кефалинового, стипвен-кефалинового) времени. Принцип. Исследуется время рекальцификации бестромбоцитарной плазмы в условиях стандартной активации фактора X и стандартной фосфолипидной активации.

Реактивы те же и еще эритрофосфатид (кефалин) с активностью 60—70 с. Рабочая его концентрация 0,01 % (см. 4.4.3).

Оборудование то же.

Материал для исследования. Бестромбоцитная плазма.

Ход определения отличается от предыдущего только тем, что вместо изотонического раствора хлорида натрия к плазме добавляют эмульсию эритрофосфатида.

Нормальные величины: 15—20 с.

Клиническое значение такое же, за исключением того, что недостаточность фактора 3 тромбоцитов не влияет на это время. Удлинение лебетокс-времени в сочетании с нормальным лебетокс-эритрофосфатидным временем свидетельствует о дефиците фактора 3 тромбоцитов.

Литература. Баркаган З. С. Исследования системы гемостаза в клинике (методические указания).— Барнаул, 1975, с. 132—133; Caen J., Larrieu M. I., Samama M. L'hemostase. Methodes d'exploration et diagnostic pratique.— Paris, 1968, p. 136—137.

4.4.6. Время свертывания плазмы при прямой стимуляции превращения фибриногена в фибрин (тромбиновое и рептилазовое время)

Методы основаны на способности тромбина и рептилазы (фермента змеиного яда) индуцировать превращение фибриногена в фибрин без

участия других факторов свертывания крови. Рептилаза в отличие от тромбина отщепляет от молекулы фибриногена только 2 фибринопептида А (тромбин высвобождает дополнительно 2 фибринопептида В), не активирует фактор XIII и не инактивируется комплексом гепарин—антиромбин III. Обе пробы позволяют оценить конечный этап свертывания крови, поскольку результаты зависят лишь от концентрации фибриногена, его свойств (структуры) и наличия в крови ингибиторов тромбина. Важно отметить, что гепарин не влияет на рептилазовое время, поэтому гипергепаринемия легко распознать по удлинению тромбинового времени в сочетании с нормальным рептилазовым временем. Продукты деградации фибрина, угнетающие действие тромбина на фибриноген и замедляющие полимеризацию фибрин-мономера, удлиняют как тромбиновое, так и рептилазовое время.

Метод определения тромбинового времени. Принцип. Определяется свертывание плазмы при добавлении раствора тромбина со стандартной активностью.

Реактивы. 1. 3,8 % раствор цитрата натрия (см. 4.1). 2. Буфер Михаэлиса pH 7,35 (см. 4.3.5). 3. Свежеприготовленный раствор тромбина с активностью 15—18 с. Обычно 1—3 мг сухого тромбина с помощью стеклянной палочки растворяют в 1 мл буфера Михаэлиса и получают раствор, вызывающий свертывание равного объема (0,1—0,2 мл) 0,1 % раствора фибриногена или адсорбированной нормальной плазмы (см. 4.4.10), разведенной в 2—2,5 раза буфером Михаэлиса, за 5—7 с. Непосредственно перед работой этот раствор разводят буфером Михаэлиса так, чтобы он вызвал свертывание равных объемов вышеупомянутых субстратов за 15—18 с, и ставят в ледяную баню. Все растворы тромбина готовят и хранят в силиконированных пробирках. 4. 0,1 % раствор бычьего фибриногена. Готовят на 0,85 % растворе хлорида натрия или буфере Михаэлиса. При взвешивании сухого фибриногена учитывают весовое соотношение свертываемого белка и буферных солей, указываемое в сопроводительной инструкции к препарату. Если, например, известно, что в препарате фибриногена на 1 г свертываемого белка приходится 2 г буферных солей, то в 100 мл изотонического раствора хлорида натрия растворяют не 100 мг препарата, а 300 мг.

Оборудование. Водяная баня на 37 °С. Секундомеры.

Материал для исследования. Тромбоцитная или бестромбоцитная плазма.

Ход определения. В пробирку наливают 0,2 мл плазмы и ставят в водяную баню. Через 1 мин добавляют 0,2 мл раствора тромбина, немедленно включают секундомер и отмечают время свертывания плазмы. Опыт повторяют и берут средний результат.

Нормальные величины: 15—18 с.

Клиническое значение. Удлинение тромбинового времени наблюдается при врожденной недостаточности фибриногена (афибриногенемия, гипофибриногенемия, дисфибриногенемия), диссеминированном внутрисосуди-

стом свертывании крови, острым фибринолизе, тяжелых поражениях паренхимы печени и наличии в крови ингибиторов тромбина. Определение тромбинового времени является одним из распространенных методов контроля за лечением гепарином и фибринолитиками.

Л и т е р а т у р а. *Андреевко Г. В., Карабасова М. А., Лютова Л. В.* и др. Методы исследования фибринолитической системы крови. М.: Изд-во Московск. ун-та, 1981, с. 43; *Балуда В. П., Баркаган З. С., Гольдберг Е. Д.* и др. Лабораторные методы исследования системы гемостаза. — Томск, 1980, с. 185—186, 300—301.

Метод определения рептилазового времени. **П р и н ц и п.** Исследуется время свертывания плазмы при добавлении раствора рептилазы со стандартной активностью.

Р е а к т и в ы. 1. 3,8 % раствор цитрата натрия (см. 4.1). 2. Раствор рептилазы с активностью 15—17 с («Стаго», Франция; «Пентафарм», Швейцария и др.).

Оборудование. 1. Водяная баня на 37 °С. 2. Секундомеры.

М а т е р и а л д л я и с с л е д о в а н и я. Тромбоцитная или бестромбоцитная плазма.

Ход определения. В пробирку набирают 0,2 мл исследуемой плазмы и ставят в водяную баню. Через 1 мин добавляют 0,1 мл раствора рептилазы, немедленно включают секундомер и отмечают время появления сгустка. Определение повторяют и вычисляют средний результат.

Н о р м а л ь н ы е в е л и ч и н ы: 15—17 с.

К л и н и ч е с к о е з н а ч е н и е. Рептилазовое время удлиняется при врожденной недостаточности фибриногена (афибриногемия, гипофибриногемия, дисфибриногемия), диссеминированном внутрисосудистом свертывании, фибринолизе, тяжелых поражениях паренхимы печени и наличии в крови некоторых ингибиторов свертывания. При гипергепаринемии рептилазовое время не изменяется.

П р и м е ч а н и е. Действие, подобное рептилазе, оказывает яд ямкоголовой змеи, среднеазиатского щитомордника. Тест с этим ялом проводят так же, как и пробу с рептилизой.

Л и т е р а т у р а. *Балуда В. П., Баркаган З. С., Гольдберг Е. Д.* и др. Лабораторные методы исследования системы гемостаза. — Томск, 1980, с. 186—189.

4.4.7. Тромбоэластография

П р и н ц и п. С помощью прибора тромбоэластографа (гемокоагулографа, гемокоагулометра) регистрируют начало свертывания и изменения упругости сгустка крови во времени. Метод позволяет определять образование, ретракцию и лизис (растворение) сгустка крови.

Р е а к т и в ы. 1. 3,8 % раствор цитрата натрия (см. 4.1). 2. Раствор хлорида кальция (концентрация указывается в инструкции к прибору).

Оборудование. Тромбоэластограф (гемокоагулограф, гемокоагулометр).

М а т е р и а л д л я и с с л е д о в а н и я. Цельная нестабилизированная кровь (в этом случае реактивы не требуются), цитратная кровь, цитратная плазма.

Ход определения соответствует инструкции (в зависимости от типа тромбоэластографа).

Н о р м а л ь н ы е в е л и ч и н ы. Устанавливаются эмпирически для каждого прибора.

К л и н и ч е с к о е з н а ч е н и е. С помощью тромбоэластографа (гемокоагулографа) могут быть выявлены и количественно оценены хронометрическая и/или структурная гипокоагуляция (замедленное свертывание и/или образование недостаточно упругого сгустка крови), хронометрическая и/или структурная гиперкоагуляция (ускоренное свертывание и/или образование чрезмерно упругого сгустка крови), гипоретракция и гиперретракция сгустка крови (пониженное или повышенное напряжение ретрактивных сил), а также гипофибринолиз и гиперфибринолиз (замедленное или ускоренное уменьшение упругости образовавшегося сгустка достижения максимальных значений).

П р и м е ч а н и е. Наряду с традиционным способом расшифровки тромбоэластограммы (гемокоагулограммы), описываемым в инструкции к прибору и основанном на анализе ряда графических параметров с точки зрения их длительности или амплитуды, разработан и внедрен способ, базирующийся на оценке физической и биологической сущности явлений, регистрируемых на тромбоэластограмме (гемокоагулограмме). Этот способ позволяет оценивать ряд параметров сгустка в конкретных физических единицах (напряжение ретрактивных сил, плотность сгустка, структурная вязкость сгустка и др.).

Л и т е р а т у р а. *Балуда В. П., Баркаган З. С., Гольдберг Е. Д.* и др. Лабораторные методы исследования системы гемостаза. — Томск, 1980, с. 222—230; *Якунин Г. А.* Современные методы анализа тромбодинамограммы (методическое пособие). Ч. 1. — М., 1973.

4.4.8. Электрокоагулография

П р и н ц и п. С помощью прибора электрокоагулографа регистрируются начало свертывания и изменения электрического сопротивления сгустка крови во времени. Метод позволяет определять образование, ретракцию и лизис сгустка крови.

Р е а к т и в ы. 1. 3,8 % раствор цитрата натрия (см. 4.1). 2. Раствор хлорида кальция (концентрация указывается в инструкции к прибору).

Оборудование. Коагулограф Н-334.

М а т е р и а л д л я и с с л е d o в а н и я. Цельная нестабилизированная кровь (в этом случае реактивы не требуются), цитратная кровь, цитратная плазма.

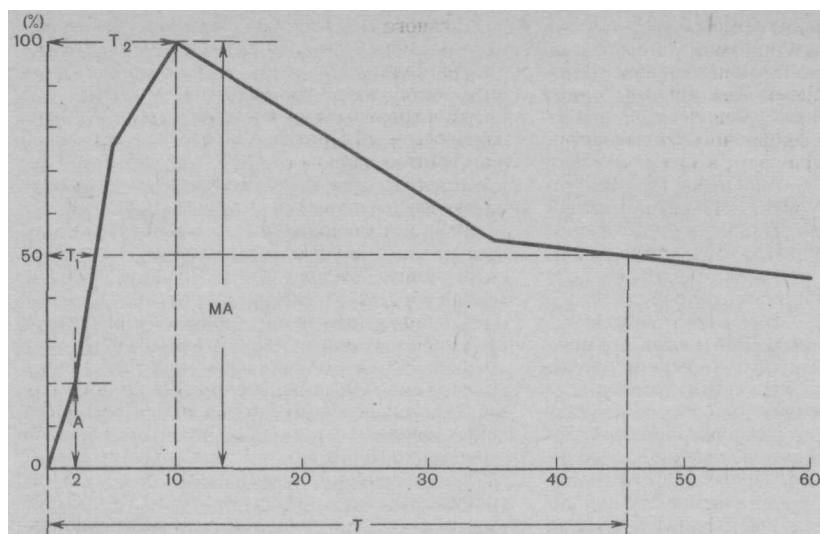


Рис. 7. Аутокоагулограмма и ее параметры. На оси ординат — свертывающая активность гемолizat-кальциевой смеси (ГКС) в процентах; на оси абсциссе — время инкубации ГКС в минутах. А — свертывающая активность гемолizat-кальциевой смеси (ГКС) на 2-й минуте инкубации; МА — максимальная свертывающая активность ГКС; Т₁ — время достижения 1/2 максимальной свертывающей активности ГКС; Т₂ — время достижения максимальной свертывающей активности ГКС; Т — время от начала инкубации ГКС до момента, когда ее свертывающая активность в процессе снижения вновь достигает 1/2 максимальной свертывающей активности.

Ход определения соответствует инструкции.

Нормальные величины. Устанавливаются эмпирически для каждого прибора.

Клиническое значение. С помощью электрокоагулографа (коагулографа) могут быть выявлены и количественно оценены хронометрическая и/или структурная гипокоагуляция (замедленное свертывание и/или образование сгустка с недостаточно высоким электрическим сопротивлением), хронометрическая и/или структурная гиперкоагуляция (ускоренное свертывание и/или образование сгустка с чрезмерно высоким электрическим сопротивлением), а также гипофибринолиз и гиперфибринолиз (замедленное или ускоренное уменьшение электрического сопротивления образовавшегося сгустка крови после достижения максимальных значений).

Литература. *Ватмахер У. А., Толстопова И. А., Пьянкова Т. И.* Коагулограф — новый портативный прибор для исследования системы свертывания крови. — Лаб. дело, 1969, № 8, с. 496—499.

4.4.9. Аутокоагуляционный тест

Исследуется динамика нарастания и последующего снижения тромбопластин-тромбиновой активности в испытуемой плазме при ее рекальцификации в присутствии гемолизата эритроцитов обследуемого (рис. 7). Аномальные ре-

зультаты регистрируются при дефиците факторов XII, XI, X, IX, VIII, II и I, а также при избытке быстро и медленно действующих анти тромбинов. Метод применяется главным образом в научных исследованиях.

Литература. *Баркаган З. С.* Исследование системы гемостаза в клинике (методические указания). — Барнаул, 1975, с. 83—87; *Сятковский В. А., Василенко Л. П.,* Применение аутокоагуляционного теста в клинических лабораторных исследованиях. — Лаб. дело, 1981, № 8 с. 459—462.

4.4.10. Тест генерации тромбопластина

Тест Биггс — Дугласа (модифицированный).

Принцип. Определяется активность тромбопластина, образующегося в смеси ингредиентов, приготовленных из исследуемой крови, и коррекция выявленных нарушений аналогичными ингредиентами нормальной крови. При нормальном содержании в крови факторов V и X, что устанавливается путем дополнительного определения протромбинового времени, этот тест позволяет выявлять и дифференцировать недостаточность плазменных факторов VIII, IX и XI + XII, а также фактора 3 тромбоцитов.

Реактивы. 1. 3,8 % раствор цитрата натрия (см. 4.1). 2. 0,025 моль/л раствор хлорида кальция (см. 4.4.2). 3. 0,85 % раствор хлорида натрия. 4. Нитратная нормальная пул-плазма,

субстратная. Смесь равных количеств 5—10 образцов бестромбоцитной плазмы здоровых людей (готовят заранее и хранят небольшими порциями при -20°C). 5. Плазменный компонент здорового человека. Смешивают 3 г геля гидроокиси алюминия фабричного производства с 4 мл дистиллированной воды, а затем разводят буфером (см. 4.3.5) в соотношении 1 : 4 (разведение в 5 раз). После этого к 4,5 мл цитратной нормальной бестромбоцитной плазмы добавляют 0,5 мл приготовленной суспензии гидроокиси алюминия, ставят смесь в водяную баню при 37°C и помешивают стеклянной палочкой в течение 3 мин. Далее смесь центрифугируют при 3000 об/мин в течение 5—10 мин, отсасывают адсорбированную плазму (протромбиновое время такой плазмы должно быть не менее $2-2\frac{1}{2}$ мин; если оно короче, то процедуру адсорбции повторяют), разливают небольшими порциями в пластиковые или стеклянные силиконовые пробирки, укупоривают и замораживают при -20°C . В адсорбированной плазме сохраняются факторы I, V, VIII, XI и XII, но отсутствуют факторы II, VII, IX и X. Адсорбированную плазму (алюминиевую) перед работой размораживают и разводят 0,85 % раствором хлорида натрия в соотношении 1 : 4 (разведение в 5 раз). 6. Сывороточный компонент здорового человека. Готовят заранее сыворотку крови здорового человека (см. 4.1), расфасовывают ее по 1—2 мл и замораживают при -20°C . В ней сохраняются факторы VII, IX, X, XI и XII, но отсутствуют факторы II, V и VIII. Перед работой нормальную сыворотку размораживают и разводят 0,85 % раствором хлорида натрия в соотношении 1 : 9 (разведение в 10 раз). 7. Тромбоцитарный компонент здорового человека. Осадок тромбоцитов, получаемый после центрифугирования 5—6 мл тромбоцитной плазмы при 4°C в течение 15—20 мин при 3000—4000 об/мин и отсасывания бестромбоцитной плазмы, заливают 5—6 мл охлажденного (4°C) 0,85 % раствора хлорида натрия, взбалтывают и центрифугируют на холоде при том же режиме. Надосадочную жидкость отбрасывают, еще дважды повторяют процедуру отмывания тромбоцитов, а затем к осадку тромбоцитов добавляют 0,85 % раствор хлорида натрия в объеме, равном объему взятой тромбоцитной плазмы, и с помощью стеклянной палочки готовят суспензию тромбоцитов.

Оборудование. 1. Водяная баня на 37°C . 2. Секундомеры.

Материал для исследования. Плазменный, сывороточный и тромбоцитарный компоненты обследуемого (готовят так же, как соответствующие компоненты здорового человека).

Ход определения. Составляют следующие 5 рядов смесей: 1-й ряд (плазменный) — адсорбированная плазма больного + сыворотка здорового + суспензия тромбоцитов здорового; 2-й ряд (сывороточный) — адсорбированная плазма здорового + сыворотка больного + суспензия тромбоцитов здорового; 3-й ряд (плазменно-сывороточный) — адсорбированная плазма больного + сыворот-

ка больного + суспензия тромбоцитов здорового; 4-й ряд (тромбоцитарный) — адсорбированная плазма здорового + сыворотка здорового + суспензия тромбоцитов больного; 5-й ряд (контрольный) — адсорбированная плазма здорового + сыворотка здорового + суспензия тромбоцитов здорового.

Тестирование всех рядов проводят одинаково, начиная с контрольного ряда. В 5—6 пробирок разливают по 0,1 мл раствора хлорида кальция и устанавливают пробирки в водяную баню. Ставят туда же пробирку с 0,6—0,8 мл субстратной плазмы (пул-плазмы). В новую пробирку набирают 0,2 мл адсорбированной нормальной плазмы, 0,2 мл нормальной сыворотки и 0,2 мл нормальной суспензии тромбоцитов. Компоненты перемешивают, ставят пробирку в водяную баню, добавляют 0,2 мл раствора хлорида кальция и немедленно включают секундомер. Через 2 мин 0,1 мл смеси переносят в одну из пробирок, содержащую 0,1 мл раствора хлорида кальция, и вводят туда же 0,1 мл прогретой субстратной плазмы. В момент добавления субстратной плазмы включают второй секундомер и отмечают время образования сгустка. Исследование повторяют через 4; 6; 8; 10 и 12 мин инкубации смеси (результат обычно регистрируется на 4-й и 6-й минуте). Подобным образом исследуют и все остальные ряды.

Нормальные величины. Наиболее короткое время варьирует в пределах 7—11 с и регистрируется на 4-й или 6-й минуте инкубации.

Клиническое значение. Возможные результаты теста в зависимости от недостаточности охватываемых им факторов (включая формы, обусловленные появлением ингибиторов факторов) представлены в табл. 37.

Таблица 37. Результаты теста генерации тромбопластина при различных нарушениях свертывания крови

следующие ряды	Показания теста при различных нарушениях свертывания крови				ингибиторы факторов свертывания
	дефицит факторов				
	VIII	IX	XI + XII	фактор 3 тромбоцитов	
1-й	Нарушение	Норма	Норма	Норма	Нарушение
2-й	Норма	Нарушение	»	»	»
3-й	Нарушение	»	Нарушение	»	»
4-й	Норма	Норма	Норма	Нарушение	Норма

Примечание. Тест генерации тромбопластина чувствительнее к нарушениям тромбопластинообразования, чем АЧТВ (см. 4.4.3) и основанные на его определении коррекционные пробы, но и он выявляет лишь

4.4.11. Одностадийное определение факторов VIII, IX, XI и XII

значительный дефицит факторов VIII, IX, XI + XII и фактора 3 тромбоцитов. При легких формах недостаточности факторов свертывания крови решающее значение может иметь их количественное определение применением специфических «дефицитных» плазм. Принимая во внимание частоту различных форм гемофилии, количественное определение факторов свертывания крови следует проводить, начиная с фактора VIII, а затем факторов IX, XI и XII. Вопрос о количественном определении фактора X решается в зависимости от результатов определения протромбинового и лебетокс-времени (стипвен-времени) (см. 4.4.4 и 4.4.5).

Литература. Балуда В. П., Баркаган З. С., Гольдберг Е. Д. и др. Лабораторные методы исследования системы гемостаза.— Томск, 1980, с. 146—152.

Специфические методы исследования коагуляционного гемостаза. К числу специфических относят методы, характеризующие концентрацию и/или активность отдельных факторов свертывания крови, их ингибиторов и дериватов фибриногена. В клинической практике эти методы применяются реже (исключение составляют методы определения фибриногена, некоторых его производных и фибринстабилизирующего фактора), поскольку для этого необходимы моноспецифические антисыворотки (для определения концентрации специфического антигена) или плазмы с изолированной недостаточностью известных факторов (для определения специфической коагуляционной активности).

В последние годы для определения активности отдельных факторов свертывания крови, антикоагулянтов и компонентов фибринолитической системы начинают применять также амидолитические методы, основанные на использовании относительно специфических пептидных субстратов. Эти субстраты представляют собой синтетические три- или тетрапептиды, имитирующие структуры естественных субстратов некоторых факторов свертывания крови и плазмينا, к которым посредством амидной связи присоединяется индикаторное вещество, хромоген или флюороген. Под действием соответствующих факторов индикаторное соединение отщепляется от пептида и изменяет окраску или флюоресценцию исследуемого образца пропорционально активности определяемого фактора. Ряд иностранных фирм выпускает субстраты и целые наборы реактивов для амидолитического определения плазменных факторов свертывания II, VIII, X и XII, тромбоцитарных факторов 3 и 4, гепарина, антитромбина III и отдельных компонентов фибринолитической системы (активатора плазминогена, плазминогена, плазмина, антиплазминов).

Литература. Бокарев И. //., Кузнецов В. А., Буторов В. Н., Семушин Б. В. Применение хромогенных пептидных субстратов в лабораторной диагностике.— Лаб. дело, 1981, № 8. с. 481—485.

Методы основаны на определении АЧТВ (см. 4.4.3) разведенной исследуемой плазмы при компенсации возможного дефицита всех факторов, влияющих на этот показатель, кроме определяемого. В качестве примера описывается определение активности фактора VIII (антигемофильного глобулина, антигемофильного фактора А), поскольку дефицит этого фактора (гемофилия А) является наиболее частой формой наследственной коагулопатии.

Унифицированный метод определения активности фактора VIII (1974). Принцип. Определяется АЧТВ (см. 4.4.3) исследуемой разведенной плазмы при компенсации субстратной плазмой возможного дефицита всех факторов, кроме фактора VIII.

Реактивы. 1. 3,8 % раствор цитрата натрия (см. 4.1). 2. 0,9% (0,85%) раствор хлорида натрия. 3. Барбиталово-солевой буфер рН 7,5: хлорид натрия — 7,3 г, диэтилбарбитуровая кислота — 2,76 г, диэтилбарбитуровокислый натрий — 2,06 г, бидистиллированная вода — до 1 л. 4. 2 % раствор двузамещенного цитрата натрия. Растворяют 2 г двузамещенного цитрата натрия в 100 мл дистиллированной воды. 5. Взвесь каолина в эмульсии эритрофосфата (см. 4.4.3). 6. 0,033 моль/л (0,366%) раствор хлорида кальция. Растворяют 366 мг высушенного до постоянной массы хлорида кальция в 100 мл дистиллированной воды или разводят 5 % раствор хлорида кальция (см. 4.4.2) в 13,66 раза дистиллированной водой. 7. Цитратная нормальная бестромбоцитарная пул-плазма (см. 4.4.10). Отличие заключается лишь в том, что нитратную кровь здоровых людей центрифугируют в рефрижераторной центрифуге (4°C). 8. Субстратная плазма. Получают из крови больного тяжелой формой гемофилии А; содержание фактора VIII колеблется в пределах 1—3 %. Критерием пригодности плазмы является время ее свертывания в описываемых ниже условиях опыта. Оно должно быть в пределах 120—135 с. Кровь стабилизируют 2 % раствором двузамещенного цитрата натрия в соотношении 4 : 1, центрифугируют при 4 °С в течение 20 мин при 2500 об/мин, отсасывают надосадочную жидкость и подвергают ее повторному центрифугированию при тех же условиях. Бестромбоцитарную плазму отсасывают, разливают по 3—4 мл в пенициллиновые флаконы, укупоривают их и хранят при —30 °С. Субстратная плазма пригодна для определения фактора VIII при хранении 2—3 мес.

Оборудование. 1. Рефрижераторная центрифуга. 2. Водяная баня на 37 °С. 3. Секундомеры.

Материал для исследования. Бестромбоцитарная плазма, которую получают путем центрифугирования цитратной крови (см. 4.1) в рефрижераторной центрифуге при 4 °С. Во время работы взвесь каолина в эмульсии эритрофосфата, пул-плазму, исследуемую и субстратную плазмы сохраняют в ледяной бане, а раствор хлорида кальция — в бане при 37 °С.

Ход определения. В пробирку вносят 0,1 мл взвеси каолина в эмульсии эритрофосфатида, 0,1 мл субстратной плазмы и 0,1 мл разведенной стандартной или исследуемой плазмы и ставят в водяную баню. Через 6 мин в пробирку добавляют 0,1 мл раствора хлорида кальция, перемешивают содержимое и определяют время образования сгустка. Опыт повторяют еще дважды и вычисляют средний результат.

Расчет концентрации (активности) фактора ведутся по таблице или графику, которые составляются на основании данных, получаемых при исследовании различных разведений нормальной плазмы с известным содержанием (активностью) фактора VIII.

Начинают с исследования нормальной плазмы. Для этого ее разводят барбитоловым буфером в соотношениях 1:4, 1:9, 1:19, 1:39, 1:79, 1:159 и 1:319 (т. е. последовательно в 5; 10; 20; 40; 80; 160 и 320 раз) и, как описано выше, определяют время свертывания плазмы, разведенной в 10 раз. Если оно отличается от 65 с, то путем уменьшения или увеличения концентрации эмульсии эритрофосфатида добиваются того, чтобы оно стало равно 65 с. После этого определяют время свертывания во всех остальных разведениях плазмы и на основании полученных данных строят в билогарифмическом масштабе кривую разведения, откладывая на вертикальной оси время свертывания исследуемых образцов, а на горизонтальной оси — процент активности фактора VIII (за 100 % принимают активность фактора VIII в стандартной плазме, разведенной в 10 раз).

Затем определяют время свертывания исследуемой плазмы, разведенной в 10 раз барбитоловым буфером, и находят по кривой разведения соответствующую ему активность фактора VIII. Содержание фактора VIII можно рассчитать не только в процентах, но и в единицах активности. Для этого применяют формулу:

$$\Phi_{\text{VIII,ед.}} = \frac{\Phi_{\text{VIII, \%}} \cdot V}{100},$$

где $\Phi_{\text{VIII,ед.}}$ — содержание фактора VIII в единицах активности; $\Phi_{\text{VIII, \%}}$ — содержание фактора VIII в процентах; V — объем исследуемой плазмы.

За единицу активности фактора VIII принимают количество фактора VIII в плазме, содержащей 100% активности фактора VIII.

Клиническое значение. Уменьшение активности фактора VIII наблюдается при его врожденном дефиците или дефекте (гемофилия А), диссеминированном внутрисосудистом свертывании крови (вследствие «потребления») и острым фибринолизе (вследствие расщепления). Повышение активности фактора VIII описано при предтромботических состояниях и эндотелиопатиях.

Примечание. Подобным образом с применением соответствующих «дефицитных» плазм может быть определена активность фактора свертывания IX (антигемофильного глобулина В, фактора Кристмаса), XI (плаз-

менного предшественника тромбопластина) и фактора XII (фактора Хагемана, контактного фактора).

Наряду с коагуляционными (коагулологическими) методами в литературе описаны иммунологические и амидологические (см. введение перед 4.4.11) методы определения факторов свертывания, участвующих во внутреннем пути образования протромбиназы.

4.4.12. Одностадийное определение фактора X (фактора Стюарта—Прауэра)

Метод Денсона. Принцип. Определяется лебетокс-эритрофосфатидное (лебетокс-кефалиновое, стипвен-кефалиновое) время свертывания исследуемой плазмы при компенсации возможного дефицита всех факторов, участвующих в реакции, кроме фактора X.

Реактивы те же, которые применяют для определения лебетокс-эритрофосфатидного времени (см. 4.4.5), и дополнительно субстратная плазма — цитратная бестромбоцитарная плазма большого с тяжелой недостаточностью фактора свертывания X. Субстратная плазма может быть приготовлена и искусственно. Для этого венозную бычью кровь смешивают с реактивом Винтроба (получают растворением 1,2 г оксалата аммония и 0,8 г оксалата калия в 100 мл дистиллированной воды) или 1,34 % раствором оксалата натрия в соотношении 9:1. Стабилизированную кровь центрифугируют 7 мин при 1500 об/мин и 4 °С, собирают тромбоцитарную плазму и центрифугируют ее 30 мин при 4500 об/мин и 4 °С. Полученную бедную тромбоцитами плазму с помощью воронки фильтруют через два асбестовых фильтра: верхний, содержащий 20 % асбеста, и нижний, содержащий 30 % асбеста (диаметр фильтров должен быть около 14 см). Фильтрацию ведут при комнатной температуре со скоростью 1 капля в 1 с. Одновременно фильтруют 1—1,5 л бычьей плазмы. Первые 200 мл профильтрованной плазмы выбрасывают, остальной фильтрат собирают порциями по 50 мл. В каждой порции определяют протромбиновое и лебетокс-эритрофосфатидное время. Те порции, в которых протромбиновое время равно 120 с и более, а лебетокс-эритрофосфатидное — 80 с и более, пригодны для употребления. В этой плазме отсутствуют факторы VII и X. Отобранную профильтрованную плазму расфасовывают по 3 мл, укупоривают и хранят при —20—30 °С.

Оборудование. 1. Водяная баня на 37 °С. 2. Секундомеры.

Материал для исследования. Бестромбоцитарная плазма обследуемого и нормальная пул-плазма (см. 4.4.10).

Ход определения. Исследование проводят так же, как при определении лебетокс-эритрофосфатидного времени (см. 4.4.5). Отличие заключается только в том, что нормальную пул-плазму и исследуемую плазму перед работой разводят буфером, а перед добавлением эритрофосфатида смешивают с субстратной плазмой

в соотношении 1 : 1 (0,1 мл плазмы исследуемого или пул-плазмы + 0,1 мл субстратной плазмы). Испытуемую плазму перед исследованием разводят буфером Михаэлиса в соотношении 1 : 9, а нормальную пул-плазму — в соотношениях от 1 : 9 до 1 : 999 (в 10; 20; 40; 80; 100; 200 и 1000 раз). По данным исследования различных разведений нормальной пул-плазмы строят в билогарифмическом масштабе кривую зависимости лебетокс-эритрофосфатидного времени свертывания нормальной пул-плазмы от активности фактора X (за 100 % принимают активность пул-плазмы, разведенной буфером в 10 раз). По этой кривой находят активность фактора X в исследуемой плазме, соответствующую ее лебетокс-эритрофосфатидному времени.

К л и н и ч е с к о е з н а ч е н и е. Уменьшение активности фактора X наблюдается при его врожденной недостаточности (болезнь Стюарта—Прауэра), тяжелых поражениях паренхимы печени, механической желтухе, нарушениях всасывания в кишечнике, лечении антивитаминами K, внутрисосудистом свертывании и фибринолизе.

П р и м е ч а н и е. Для определения содержания (активности) фактора X разработаны также иммунологические и простые амидолитические методы (см. введение перед 4.4.11).

Л и т е р а т у р а. Баркаган З. С. Исследование системы гемостаза в клинике (методические указания) — Барнаул, 1975, с. 134—136; Caen I, Larrieu M. J., Samama M. L'hemostase. Methodes d'exploration et diagnostic pratique.— Paris, 1968, p. 127—129.

4.4.13. Одностадийное определение фактора II

Метод Сулье—Ларье. Принцип. Определяется протромбиновое время свертывания разведенной исследуемой плазмы при компенсации возможного дефицита всех факторов протромбинового комплекса, кроме фактора II.

Р е а к т и в ы. 1. 3,8 % раствор цитрата натрия (см. 4.1). 2. 0,025 моль/л раствор хлорида кальция (см. 4.4.2). 3. Тромбопластин-кальциевая смесь (см. 4.4.4). 4. Адсорбированная бычья плазма. Венозную бычью кровь смешивают с реактивом Винтроба (см. 4.4.12) в соотношении 9 : 1 и центрифугируют при 4500—6000 об/мин в течение 30 мин. Супернатант собирают и подвергают повторному центрифугированию при 6000 об/мин в течение 30 мин. Полученную бедную тромбоцитами плазму переносят в другую пробирку и добавляют к ней чистый сульфат бария из расчета 10 г на 100 мл плазмы. Смесь постоянно взбалтывают при комнатной температуре в течение 20 мин, а затем центрифугируют при 6000 об/мин в течение 20 мин. Собирают надосадочный слой плазмы и определяют в нем протромбиновое время. Если оно составляет менее 3 мин, процедуру адсорбции повторяют, добиваясь того, чтобы протромбиновое время адсорбированной плазмы превышало 3 мин. Готовую плазму, в которой сохраняется

фактор V, но отсутствуют факторы II, VII и X, разливают небольшими (1—3 мл) порциями в пенициллиновые флаконы, укупоривают их и хранят при -20°C . 5. Нормальная человеческая сыворотка. В пробирки, предварительно промытые смесью 4 объемов изотонического раствора хлорида и 1 объема буфера Михаэлиса (рН 7,35), набирают по 3 мл венозной крови здорового человека. Добавляют в каждую пробирку по 1 капле суспензии тканевого тромбопластина (см. 4.4.4), разведенной в 10 раз буфером Михаэлиса. После свертывания крови пробирки ставят на 4—6 ч при 37°C , а затем оставляют при комнатной температуре на 18—24 ч. Далее кровь центрифугируют при 3500 об/мин в течение 20 мин, отсасывают сыворотку и смешивают ее с раствором Винтроба в соотношении 5:1. Смесь инкубируют 48 ч при 4°C , а затем разливают небольшими порциями в пенициллиновые флаконы, укупоривают их и хранят при -20°C . В приготовленной таким образом сыворотке сохраняются факторы VII и X, но отсутствуют факторы II и V. 6. Буфер Михаэлиса рН 7,35 (см. 4.3.5).

О б о р у д о в а н и е. 1. Водяная баня на 37°C . 2. Секундомеры.

М а т е р и а л д л я и с с л е д о в а н и я. Тромбоцитарная плазма.

Х о д о п р е д е л е н и я. Исследуемую плазму разводят буфером Михаэлиса в соотношении 1 : 9; 0,1 мл разведенной плазмы переносят в другую пробирку, добавляют в нее 0,1 мл субстратного реактива, состоящего из смеси адсорбированной бычьей плазмы и нормальной сыворотки в соотношении 2:1, и ставят пробирку в водяную баню. Через 1 мин в эту пробирку вносят 0,2 мл тромбопластин-кальциевой смеси и отмечают время образования густка. Исследование повторяют и вычисляют средний результат. Точно так же определяют время свертывания нормальной пул-плазмы, разведенной буфером Михаэлиса в 10; 20; 40; 80; 100; 200 и 1000 раз. Строят кривую разведения на билогарифмической бумаге, откладывая на вертикальной оси время свертывания пробы, а на горизонтальной — содержание фактора II в разведенной нормальной пул-плазме (содержание фактора II в пул-плазме, разведенной в 10 раз, принимают за 100 %). Зная время образования густка в исследуемой разведенной плазме, устанавливают по кривой содержание (активность) в ней фактора II (в процентах).

К л и н и ч е с к о е з н а ч е н и е. Уменьшение активности фактора II отмечается при его врожденной недостаточности и тех же патологических состояниях, при которых наблюдается приобретенный дефицит фактора X (см. 4.4.12).

П р и м е ч а н и е. Активность фактора II может быть оценена также хромогенными методами (см. введение перед 4.4.11).

Л и т е р а т у р а. Баркаган Э. С. Исследование системы гемостаза в клинике (методические указания).— Барнаул, 1975, с. 125—127; Caen I, Larrieu M. J., Samama M. L'hemostase. Methodes d'exploration et diagnostic pratique.— Paris, 1968, p. 129—129.

4.4.14. Одностадийное определение фактора V

Метод Оврена. Принцип. Определяется протромбиновое время свертывания разведенной исследуемой плазмы при компенсации возможного дефицита всех факторов протромбинового комплекса, кроме фактора V.

Реактивы. 1. 3,8 % раствор цитрата натрия (см. 4.1). 2. 0,025 моль/л раствор хлорида кальция (см. 4.4.2). 3. Тромбопластин-кальциевая смесь (см. 4.4.4). 4. Буфер Михаэлиса рН 7,35 (см. 4.3.5). 5. Субстратная плазма: цитратная бестромбоцитарная плазма больного с тяжелой недостаточностью фактора свертывания V. Плазма, лишенная фактора V, может быть приготовлена также искусственно. Для этого венозную кровь здорового человека смешивают с реактивом Винтроба (см. 4.4.12) в соотношении 9:1, после чего центрифугируют 20 мин при 4500—6000 об/мин. Супернатант отсасывают, разливают в пробирки по 3—5 мл, герметично закрывают последние и инкубируют при 37 °С в течение 18—36 ч, периодически проверяя протромбиновое время плазмы. Инкубацию прекращают, когда оно станет равным 60 с и более. В такой плазме сохраняются факторы II, VII и X, но отсутствует фактор V. Приготовленную субстратную плазму разливают по 1—3 мл в пенициллиновые флаконы, укупоривают их и хранят при —20 °С.

Оборудование. 1. Водяная баня на 37 °С. 2. Секундомеры.

Материал для исследования. Тромбоцитная плазма.

Ход определения. Исследование проводят так же, как при одностадийном определении фактора II (см. 4.4.13), но вместо субстратного реактива используют субстратную плазму, лишенную фактора V. Построение калибровочной кривой и определение по ней содержания фактора V в исследуемой плазме проводят так же, как при определении фактора II.

Клиническое значение. Снижение уровня фактора V наблюдается при наследственном дефиците фактора V, а также при ряде заболеваний, сопровождающихся нарушением его синтеза (болезни печени), повышенным потреблением (внутрисосудистое свертывание крови) или расщеплением (активация системы фибринолиза).

Литература. Баркаган З. С. Исследование системы гемостаза в клинике (методические указания).— Барнаул, 1975, с. 127—130; Caen I., Larrieu M. I., Samama M. L'hémostase. Methodes d'exploration et diagnostic pratique.— Paris, 1968, p. 120—122, 129.

4.4.15. Одностадийное определение фактора VII

Метод Оврена. Принцип. Определяется протромбиновое время разведенной исследуемой плазмы при компенсации возможного дефицита всех факторов протромбинового комплекса, кроме фактора VII.

Реактивы. 1. 3,8 % раствор цитрата натрия (см. 4.1). 2. 0,025 моль/л раствор хлорида кальция (см. 4.4.2). 3. Буфер Михаэлиса рН 7,35 (см. 4.3.5). 4. Тромбопластин и тромбопластин-кальциевая смесь (см. 4.4.4). 5. Субстратная плазма (цитратная бестромбоцитарная плазма больного с тяжелой недостаточностью фактора VII).

Оборудование. 1. Водяная баня на 37 °С. 2. Секундомеры.

Материал для исследования. Тромбоцитарная плазма.

Ход определения. Исследование проводят так же, как при определении активности фактора V.

Клиническое значение. Уменьшение содержания (активности) фактора VII наблюдается при врожденном дефиците или молекулярном дефекте фактора VII, приеме непрямым антикоагулянтов, паренхиматозных поражениях печени и К-витаминной недостаточности (механическая желтуха, кишечный дисбактериоз).

Примечание. В качестве субстратной плазмы можно использовать также профильтрованную через фильтр Зейтца нормальную плазму (см. 4.4.12). В ней отсутствуют факторы VII и X, поэтому с применением описанного принципа можно оценить суммарную активность факторов VII и X. После этого следует определить лебетокс-время испытуемой плазмы и таким образом дифференцировать недостаточность фактора VII (лебетокс-время нормальное) от недостаточности фактора X (лебетокс-время удлиненное).

Литература. Баркаган З. С. Исследование системы гемостаза в клинике (методические указания).— Барнаул, 1975, с. 130—132, 135; Caen J., Larrieu M. I., Samama M. L'hémostase. Methodes d'exploration et diagnostic pratique.— Paris, 1968, p. 125—127, 129.

4.4.16. Методы, характеризующие концентрацию (активность) антикоагулянтов

Наибольшее значение имеют методы определения циркулирующих антикоагулянтов (см. примечание 4.4.3) и антитромбинов. Из числа быстродействующих антитромбинов наиболее известными являются гепарин (точнее образующийся при его введении комплекс гепарин — антитромбин III) и продукты деградации фибрина (оген)а, а из медленно действующих — антитромбин III. Методы определения продуктов деградации фибрина рассмотрены в подразделе 4.5, а методы определения антитромбина III не приводятся, так как они очень трудоемки (коагулологические) или требуют применения иностранных реактивов (амидолитические, иммунологические).

Определение концентрации гепарина в плазме. Принцип. Определяют минимальную концентрацию протамина сульфата, необходимую для нейтрализации гепарина в исследуемой

плазме. Найденную концентрацию переводят в единицы нейтрализованного гепарина.

Реактивы. 1. 3,8 % раствор цитрата натрия или 1,34 % раствор оксалата натрия (см. 4.1). 2. 1 % раствор протамина сульфата. 3. Раствор тромбина с активностью 15 с (см. 4.4.6). 4. Имидазоловый буфер pH 7,4; растворяют 1,36 г имидазола в 100 мл бидистиллированной воды. В другую колбу вместимостью 100 мл набирают 25 мл приготовленного раствора имидазола, добавляют 13,6 мл 0,1 н. HCl и доводят дистиллированной водой общий объем до 100 мл.

Оборудование. 1. Водяная баня на 37 °С. 2. Секундомеры.

Материал для исследования. Бестромбоцитная плазма.

Ход определения. Из 1% раствора протамина сульфата готовят растворы с концентрациями протамина сульфата 100; 10; 5; 2,5 и 1,25 мкг/мл (путем соответствующего разведения буфером). Набирают в 5 пустых пробирок по 0,1 мл плазмы. В первую пробирку добавляют 0,1 мл 100 мкг/мл раствора протамина сульфата, во вторую 0,1 мл 10 мкг/мл раствора протамина сульфата и т. д. Последовательно помещают пробирки в водяную баню на 1 мин и определяют время образования сгустков при добавлении 0,1 мл раствора тромбина. Устанавливают наиболее низкую концентрацию протамина сульфата, которая полностью нормализует тромбиновое время. Активность гепарина в плазме рассчитывают, исходя из того, что 1 мг протамина сульфата нейтрализует 85 ЕД гепарин;] (международного стандарта).

Нормальные величины. Принимается, что в крови здоровых людей гепарина нет.

Клиническое значение. Устанавливается уровень гепарина в крови при его введении в больших (лечебных) дозах.

Примечание. С применением протамина сульфата может быть определена концентрация гепарина и в цельной крови.

Литература. *Howie E. J. W., Thompson I. H., nidialicim P., Owen C. A.* Mayo clinic laboratory manual of hemostasis.— W. B. Saunders company, 1971, p. 123—125; *Caen J., Lurriet M. L., Samama M.* L'hemostase. Methodes <IV>plor:ilii el diagnostic pratique. Paris, 1968, p. 202—203.

4.4.17. Методы, характеризующие конечный этап свертывания крови (фибриноген и его производные, активность фактора XIII)

Определение фибриногена и его производных в плазме. Распространенные методы определения фибриногена основаны на превращении фибриногена плазмы в фибрин (посредством рекальцификации, добавления тромбопластина и т. п.) с его последующим подсушиванием и навешиванием или растворением, окрашиванием и колориметрированием, а также на осаждении фибриногена (путем высаливания или тепловой денатурации). В клинической

практике нередко применяются и иммунологические методы, в частности при подозрении на дисфибриногемию. С практической точки зрения зачастую важно определить не только концентрацию свертываемого тромбином фибриногена, но и концентрацию ряда высокомолекулярных производных фибриногена (растворимого фибрина, растворимых комплексов фибрин-мономера), которые не трансформируются в фибрин при добавлении тромбина. Для их обнаружения и определения предложены «паракоагуляционные пробы», а также методы, основанные на применении принципов гель-фильтрации и гель-электрофореза. В клинике чаще всего используются «паракоагуляционные пробы», в частности этаноловая и протаминсульфатная.

Унифицированный гравиметрический метод определения фибриногена (1974). Рекомендуемый в настоящее время вариант с использованием тромбина. Принцип. Высушивается и взвешивается сгусток, образующийся при добавлении к определенному объему плазмы раствора тромбина стандартной активности.

Реактивы. 1. 1,34% раствор оксалата натрия или 3,8% раствор цитрата натрия (см. 4.1). 2. 0,85 % раствор хлорида натрия. 3. Раствор тромбина в 0,85 % растворе хлорида натрия с активностью 10 с (см. 4.4.6).

Оборудование. 1. Водяная баня на 37 °С. 2. Секундомеры.

Материал для исследования. Бестромбоцитная плазма.

Ход определения. Набирают в пробирку 1 мл плазмы, добавляют в нее 0,2 мл раствора тромбина и немедленно опускают в пробирку стеклянную палочку. Включают секундомер и ставят пробирку на водяную баню. Образующийся фибрин наматывают на стеклянную палочку, которую вынимают через 10 мин инкубации (если сгусток не извлекается, то содержимое пробирки вытряхивают в чашку Петри). Сгусток переносят на беззольный фильтр, высушивают и взвешивают на торсионных весах.

Нормальные величины: 9—15 мг. При умножении массы сухого фибрина на переводной коэффициент 25 получают значение концентрации фибриногена в мг% (г/л). Норма 200—400 мг% (2—4 г/л).

Клиническое значение. Уменьшение концентрации фибриногена наблюдается при его врожденной недостаточности (афибриногемия, гипофибриногемия, некоторые дисфибриногемии), тяжелых заболеваниях печени, диссеминированном внутрисосудистом свертывании крови, остром фибринолизе. Увеличение концентрации фибриногена отмечается при инфекционных заболеваниях, хронических воспалительных процессах, злокачественных новообразованиях, тромбозах и тромбоэмболиях, во время беременности, после травм, родов и операций.

Литература. *Балуда В. П., Баркаган З. С., Голдберг Е. Д.* и др. Лабораторные методы исследования системы гемостаза.— Томск, 1980, с. 192.

Унифицированный колориметрический метод определения фибриногена (1974). Принцип. Путем добавления раствора тромбина фибриноген плазмы превращают в фибрин, затем его подвергают гидролизу и в гидролизате определяют концентрацию белка по биуретовой реакции.

Реактивы. 1. 1,34% раствор оксалата натрия или 3,8% раствор цитрата натрия (см. 4.1). 2. 0,85% раствор хлорида натрия. 3. Раствор тромбина в 0,85% растворе хлорида натрия с активностью 7—10 с (см. 4.4.6). 4. 1 н. раствор NaOH. 5. Биуретовый реактив: к 1,5 г сульфата меди добавляют 6 г сегнетовой соли ($KNaC_4H_4O_6 \cdot 4H_2O$) и 500 мл дистиллированной воды. К этому раствору при постоянном помешивании добавляют 300 мл 10% раствора NaOH и доводят дистиллированной водой общий объем до 1 л. 6. Фибриноген бычий или человеческий с известной концентрацией свертываемого белка.

Оборудование. 1. Водяная баня на 37 °С. 2. Фотоэлектроколориметр. 3. Секундомер.

Материал для исследования. Бестромбоцитарная плазма.

Ход определения. В 2 пробирки (для параллельных определений) вводят по 0,2 мл плазмы, добавляют по 0,1 мл раствора тромбина и ставят пробирки в водяную баню. Через 1 ч сгустки извлекают, трижды промывают охлажденным 0,85% раствором хлорида натрия и высушивают на фильтровальной бумаге. Каждый из сгустков помещают в пробирку с 1 мл раствора NaOH и ставят пробирки на 5 мин в кипящую воду. Пробу охлаждают до комнатной температуры и добавляют в каждую пробирку по 1 мл биуретового реактива. Через 30 мин пробу колориметрируют в кювете с длиной оптического пути 10 мм при длине волны 500—560 нм (зеленый светофильтр) против дистиллированной воды. Для определения количества фибриногена в мг% (г/л) предварительно строят график соотношения между показаниями ФЭКа и концентрациями фибриногена в растворе. Для этого используют стандартные разведения чистого фибриногена (коагулируемого белка) в пределах от 50 до 1000 мг% (от 0,5 до 10 г/л).

Нормальные величины. 200—350 мг% (2—3,5 г/л).

Клиническое значение. См. гравиметрический метод.

Литература. Детинкина Г. Н., //ынкина И. М., Торик Ж. Н. Предложения по унификации методов исследования системы гемостаза.—Лаб. дело, 1984, № 4, с. 227 и № 5, с. 272—273.

Этаноловый тест. Принцип. Наблюдают за образованием геля в плазме после добавления 50% раствора этанола. При наличии в плазме комплексов фибрин-мономера с продуктами расщепления фибриногена/фибрина и фибриногеном происходит высвобождение фибрин-мономера, который затем полимеризуется с образованием геля.

Реактивы. 1. 3,8% раствор цитрата натрия (см. 4.1). 2. 50% раствор этанола.

Оборудование. Не требуется.

Материал для исследования. Бестромбоцитарная плазма.

Ход определения. В пробирку вводят 0,15 мл 50% раствора этанола и 0,5 мл плазмы, пробирку встряхивают и помещают в штатив при комнатной температуре. Если через 1—10 мин в пробирке образуется гель, то проба считается положительной («1»).

Нормальные показатели. Помутнение или появление небольшой зернистости (отрицательный результат—«0»).

Клиническое значение. Положительная проба указывает на присутствие в плазме комплексов фибрин-мономера с продуктами расщепления фибриногена/фибрина и фибриногеном, что рассматривается как важный лабораторный критерий диссеминированного внутрисосудистого свертывания крови или массивного тромбоза, сопровождающихся активацией системы фибринолиза. По сравнению с протаминсульфатным тестом (см. далее) этот тест чувствительнее к растворимым комплексам фибрин-мономера.

Литература. Breen F. A., Tullis J. L. Ethanol gelation: a rapid screening test for intravascular coagulation.—Ann. intern. med., vol. 69, № 6, p. 1197—1206; Ingram G. I. C., Brozovic M., Staler N. (i. P. Bleeding disorders investigation and management.—Blackwell scientific publication, 1982, p. 304.

Протаминсульфатный тест. Принцип. Наблюдают за образованием геля в плазме после добавления слабых растворов протамин сульфата. Подобно 50% раствору этанола они вызывают высвобождение фибрин-мономера из его растворимых комплексов с последующей полимеризацией, а также осаждение ранних продуктов расщепления фибриногена/фибрина.

Реактивы. 1. 3,8% раствор цитрата натрия (см. 4.1). 2. 0,85% раствор хлорида натрия. 3. 1% раствор протамин сульфата в 0,85% растворе хлорида натрия pH 6,0.

Оборудование. Не требуется.

Материал для исследования. Бестромбоцитарная плазма, полученная путем центрифугирования нитратной крови или богатой тромбоцитами плазмы при 2000 об/мин в течение 30 мин.

Ход определения. 1% раствор протамин сульфата разводит последовательно 0,85% раствором хлорида натрия в 5; 10; 20; 40; и 80 раз; 0,2 мл каждого из приготовленных растворов переносят в соответствующим образом помеченные 5 пробирок (в одну пробирку один раствор) и добавляют в каждую пробирку по 0,2 мл исследуемой плазмы. Пробирки оставляют на 30 мин при комнатной температуре, а затем исследуют их в прямом свете на темном фоне. Образование геля и фибриновых нитей учитывают как положительный результат («1»), а образование зерен или помутнение — как отрицательный результат («0»).

Нормальные величины. Отрицательный результат во всех разведениях протамина сульфата.

Клиническое значение. Образование геля или нитей фибрина хотя бы в одном из разведений протамина сульфата рассматривается как указание на повышение уровня растворимых комплексов фибрин-мономера и/или ранних продуктов деградации фибрина. Это наблюдается при остром внутрисосудистом свертывании крови и массивных тромбозах. Выпадение положительного результата только в первых 1—2 пробирках более характерно для увеличения концентрации растворимых комплексов фибрин-мономеров, а положительный результат в пробирках всего ряда более характерен для повышения уровня ранних продуктов расщепления фибриногена/фибрина.

Литература. *Niewiarowski S., Gurewich V.* Laboratory identification of intravascular coagulation: the SDPS test for the detection of fibrin monomer and fibrin degradation products.— *J. Lab. clin med.*, 1971, vol. 77, p. 665—676.

Унифицированный ускоренный метод определения фактора XIII (1974). Принцип. Определяется время растворения сгустка плазмы в растворе мочевины после инкубации плазмы с моноидуксусной кислотой, блокирующей активность фактора XIII, и рекальцификации.

Реактивы. 1. 1,34% раствор оксалата натрия или 3,8% раствор цитрата натрия (см. 4.1). 2. 0,5% раствор моноидуксусной кислоты: растворяют 0,5 г моноидуксусной кислоты (CH₂ICOOH) в 100 мл бидистиллированной воды. При работе с реактивом необходимо соблюдать осторожность, так как это летучее, раздражающее и аллергизирующее вещество. 3. 0,025 моль/л раствор хлорида кальция. 4. 0,12% раствор кислой щавелевокислой мочевины.

Оборудование. Секундомер.

Материал для исследования. Тромбоцитарная плазма.

Ход определения. К 0,2 мл исследуемой плазмы добавляют 0,1 мл раствора моноидуксусной кислоты и 0,4 мл раствора хлорида кальция. Перемешивают содержимое пробирки встряхиванием и оставляют на 20 мин при комнатной температуре. К образовавшемуся сгустку добавляют 2 мл раствора кислой щавелевокислой мочевины и определяют с помощью секундомера время полного растворения фибринового сгустка при постоянном встряхивании. Исследование проводят дважды и вычисляют средний результат. Точно так же определяют время растворения фибриновых сгустков здорового человека.

Активность фактора XIII в исследуемой плазме определяют по формуле: активность фактора XIII = $A/B \cdot 100$ %, где A — время лизиса сгустка исследуемой плазмы; B — время лизиса сгустка нормальной плазмы.

Нормальные величины: 70 ± 15 с, что принимается за 100 %.

Клиническое значение. Уменьшение активности фибринстабилизирующего фактора наблюдается при его врожденной недостаточности или в связи «с потреблением» при массивном внутрисосудистом свертывании крови.

Примечания. При нарушении первой фазы свертывания крови (гемофилия) для образования сгустка необходимо добавить, кроме хлористого кальция, 0,1 мл раствора тромбина с активностью 10—20 с. 2. Тяжелая недостаточность фактора XIII (менее 1% от нормы) может быть распознана по растворению сгустка исследуемой плазмы в 1% растворе монохлоруксусной кислоты или 30% растворе мочевины в течение 1 ч (сгустки нормальной плазмы при этом не растворяются).

Литература. *Балуда В. П., Баркагаи З. С., Гольдберг Е. Д.* и др. Лабораторные методы исследования системы гемостаза.— Томск, 1980, с. 196—198; *Caen J., Larrieu M. J., Samama M.* L'hemostase. Methodes d'exploration et diagnostic pratique.— Paris, 1968, p. 192—193.

4.5. МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ ФИБРИНОЛИТИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ КРОВИ (ФИБРИНОЛИТИЧЕСКОГО ЗВЕНА ИЛИ КОМПОНЕНТА СИСТЕМЫ ГЕМОСТАЗА)

Известны общеоценочные методы и методы определения отдельных компонентов фибринолитической системы: плазмина — фермента, расщепляющего фибрин, а при некоторых условиях также фибриноген и другие факторы свертывания крови, плазминогена — неактивного предшественника плазмина, активаторов плазминогена, ингибиторов активации плазминогена и ингибиторов плазмина. Общеоценочные методы основаны на измерении времени лизиса (раст-

ворения) сгустков исследуемой крови (цельной, разведенной) или эуглобулиновой фракции плазмы, на оценке степени лизиса сгустков исследуемой разведенной плазмы за стандартное время или на исследовании интенсивности лизиса стандартных сгустков (пленок, пластин) фибрина под действием исследуемой плазмы или ее эуглобулиновой фракции. Отдельные компоненты системы фибринолиза могут быть изучены с применением тех же подходов, но после

предварительной обработки исследуемого материала (инкубации с плазмином, стрептокиназой, проактиватором) или стандартных пластин фибрина (прогревания), тромбозластографическими, казеинолитическими, амидолитическими (см. введение перед 4.4.11), иммунологическими, иммунохимическими и некоторыми другими методами.

О фибринолитической активности крови можно судить также по содержанию в ней продуктов деградации фибриногена/фибрина (ПДФ). Повышение уровня ПДФ рассматривается как один из основных лабораторных признаков гиперфибринолиза. Наибольшее клиническое значение имеют общеоценочные методы, методы фибриновых пластин и методы определения в крови ПДФ.

4.5.1. Время лизиса зуглобулиновых сгустков

Унифицированный метод (1974). Принцип. Измеряется время спонтанного лизиса сгустка, получаемого из зуглобулиновой фракции бестромбоцитной плазмы при добавлении к ней раствора хлорида кальция.

Реактивы. 1. 1,34% раствор оксалата натрия или 3,8% раствор цитрата натрия (см. 4.1.). 2. 1% раствор уксусной кислоты. 3. Боратный буфер pH 9,0; растворяют 1 г буры ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$) и 9 г NaCl в 1 л дистиллированной воды. 4. 0,025 моль/л раствор хлорида кальция (см. 4.4.2). 5. Дистиллированная вода.

Оборудование. Водяная баня на 37°C.

Материал для исследования. Бестромбоцитная плазма.

Ход определения. В пробирку наливают 8 мл дистиллированной воды, 0,15 мл уксусной кислоты и 0,5 мл исследуемой плазмы. Перемешивают содержимое и ставят в холодильник (4°C) на 30 мин. Смесь центрифугируют в течение 5 мин при 1500 об/мин, сливают надосадочную жидкость и удаляют остатки жидкости опрокидыванием пробирки на фильтровальную бумагу. Вводят в пробирку 0,5 мл боратного буфера и, осторожно помешивая палочкой, растворяют осадок зуглобулинов. Две пробы по 0,2 мл переносят в 2 другие пробирки, ставят их в водяную баню и добавляют в каждую пробирку по 0,2 мл раствора хлорида кальция. Через несколько минут в пробирках образуются сгустки, и с этого момента начинают отчет времени растворения сгустков. В ответе приводят средний результат.

Нормальные величины: 3—5 ч.

Клиническое значение. Укорочение времени растворения сгустков указывает на повышение фибринолитической активности, удлинение — на снижение.

Примечание. Метод может применяться в качестве общеоценочного и для изучения способности фибринолитической системы к активации. В последнем случае определяют время лизиса зуглобулиновых сгустков до и после венозного стаза. Венозный стаз

осуществляется путем наложения манжеты сфигмоманометра на плечо и поддержания в ней минимального артериального давления (обычно 80 мм рт. ст.) в течение 10—20 мин. Вторую пробу крови берут из локтевой вены руки, на которую наложена манжета, непосредственно перед ее снятием. Время лизиса зуглобулиновых сгустков после венозного стаза укорачивается в норме в 1,5—2 раза в зависимости от длительности стаза.

Литература. Андреев Г. В., Карабасова М. А., Лютова Л. В. и др. Методы исследования фибринолитической системы крови. — М.: Изд-во Московск. ун-та, 1981, с. 40—42.

4.5.2. Методы, основанные на применении фибриновых пластин

Эти методы используются для исследования активности отдельных компонентов системы фибринолиза. Наибольшее их число может быть определено путем одновременного изучения лизиса стандартных непрогретых и прогретых фибриновых пластин под действием плазмы и ее зуглобулиновой фракции, подвергавшихся и не подвергавшихся обработке стрептокиназой.

Определение активности плазмينا и активатора плазминогена на Аструпу и соавт. Принцип. Измеряется зона (площадь) лизиса стандартного слоя фибрина (фибриновой пластины) на месте нанесения плазмы и/или ее зуглобулиновой фракции.

Реактивы. 1. 3,8% раствор цитрата натрия (см. 4.1). 2. 0,85% раствор хлорида натрия. 3. 0,3% раствор бычьего фибриногена в 0,85% растворе хлорида натрия (см. 4.4.6). 4. Раствор тромбина в 0,85% растворе хлорида натрия с активностью 8—10 с (см. 4.4.6).

Оборудование. 1. Столик с уровнем. 2. Чашки Петри.

Материал для исследования. Бестромбоцитная плазма и/или ее зуглобулиновая фракция (см. 4.5.1).

Приготовление фибриновой пластины. Наливают в пробирку или колбочку 9 мл 0,85% раствора хлорида натрия, взвешивают нужное количество фибриногена, высыпают его в пробирку (колбочку) с 0,85% раствором хлорида натрия и ставят пробирку на 1 ч в термостат при 37°C. Периодически пробирку достают из термостата и осторожно встряхивают, добываясь полного растворения фибриногена. После этого в пробирку с раствором фибриногена добавляют 0,2 мл раствора тромбина и быстро выливают содержимое в чашку Петри, установленную на ровной горизонтальной поверхности. Под действием тромбина фибриноген превращается в фибрин и застывает тонким слоем. Через 1—1½ ч после образования фибрина пластины пригодны для работы. Их можно хранить в течение 7—10 дней при 4—6°C на ровной поверхности, проложив между чашкой и крышкой увлажненную водой фильтровальную бумагу.

А. Ход определения суммарной активности плазмينا и активаци-

тора плазминогена. На фибриновую пластину наносят 0,03 мл плазмы (эуглобулиновой фракции), закрывают чашку Петри крышкой, высланной изнутри увлажненной фильтровальной бумагой, и помещают чашку на 18—24 ч в термостат при 37 °С. После чего измеряют площадь лизиса, которая и отражает активность плазмينا и активатора плазминогена. Площадь лизиса обычно характеризуется произведением двух перпендикулярных диаметров и выражается в квадратных миллиметрах.

Б. Ход раздельного определения активности плазмина и активатора плазминогена. Готовят одновременно две фибриновые пластины, после чего одну из пластин прогревают в течение 30 мин при 85 °С, что приводит к разрушению плачминогена, содержащегося в этой пластине. Таким образом, одна из пластин лишается субстрата для действия активатора плазминогена, имеющегося в исследуемом материале. Затем на обе пластины наносят по 0,03 мл плазмы (эуглобулиновой фракции), какописанорнее, определяют фибринолитическую активность исследуемых образцов на обеих пластинах. За активность плазмина принимается площадь лизиса на прогретой пластине, а за активность активатора плазминогена — разность между площадями лизиса на непрогретой и прогретой пластине.

Нормальные величины. Активность активатора плазминогена в крови составляет 25—35 мм², а активность плазмина — 8—15 мм².

Клиническое значение. Уменьшение зон лизиса указывает на снижение активности определяемых компонентов, а увеличение — на повышение.

Литература. Андреев Г. В., Карабцова М. А., Лютова Л. В. и др. Методы исследования фибринолитической системы крови. М.: Из-во Москвитин. ун-та, 1981, с. 43—45; Коваленко А. Н. Дополнительные возможности метода стандартных фибриновых пластин.— Лаб. дело, 1980, № 10, с. 615—618.

4.5.3. Продукты деградации фибрина (ПДФ)

Описаны неиммунологические и иммунологические методы определения содержания ПДФ в сыворотке крови. Первые основаны на осаждении ПДФ (нагреванием, охлаждением, протамипа сульфатом), на способности ПДФ индуцировать склеивание стафилококков или на антиполимеризационном и антитромбиновом действии ПДФ. Иммунологические методы основаны на применении антифибриногеновой сыворотки или сыворотки, содержащей антитела к отдельным фрагментам фибрина. Предложены иммунодиффузионные, иммуноэлектрофоретические, радиоиммунные и т. п. методы, а также методы, основанные на исследовании агглютинации частиц латекса, геммагглютинации тромжени геммагглютинации.

Проба с протамипа сульфатом для обнаружения ПДФ в крови. Принцип. Наблюдают за образованием осадка в сыворотке крови после добавления к ней 1 % раствора протамипа сульфата, обладающего способностью осажждать ранние ПДФ.

Реактивы. 1 % раствор протамипа сульфата.

Оборудование. 1. Водяная баня на 37 °С. 2. Секундомер.

Материал для исследования. Свежая сыворотка крови (см. 4.1).

Ход определения. В пробирку набирают 0,4 мл сыворотки и добавляют 0,1 мл раствора протамипа сульфата. Перемешивают содержимое и ставят пробирку в водяную баню. Через 5 мин пробирку вынимают и читают результат. Образование геля, нитей или хлопьев учитывают как положительный результат («1»), а помутнение или зернистость — как отрицательный результат («0»).

Нормальные величины. Помутнение или зернистость (отрицательный результат — «0»).

Клиническое значение. Положительный результат («1») указывает на увеличение содержания ПДФ в сыворотке, что является одним из лабораторных критериев патологического внутрисосудистого свертывания крови. Проба становится положительной при концентрации ПДФ 0,015 г/л (15 мкг/мл) и более.

Литература. Гуштов С. З., Воронина И. Е., Литвинов Р. И. Два простых способа обнаружения продуктов деградации фибрина в кровию — Лаб. дело, 1982, №6 с. 454 - 356.

Иммунодиффузионный метод определения ПДФ. Принцип. Наблюдают за образованием дуг преципитации в агаровой пластине, на которую наносят на определенном расстоянии друг от друга исследуемую и антифибриногеновую сыворотки.

Реактивы. 1. Агар-агар волокнистый. 2. Веронал-ацетатный буфер рН 8,6, ионная сила 0,5 ц. В небольшом количестве доведенной до кипения дистиллированной воды растворяют 9,25 г диэтилбарбитуровой кислоты, охлаждают раствор, добавляют 6,5 г ацетата натрия и 1,88 г NaOH и доводят дистиллированной водой общий объем до 1 л. Если рН отличается от 8,6, путем добавления слабых (0,1 моль/л) растворов HCl или NaOH доводят его до этой величины. 3. Антифибриногеновая сыворотка. 4. Фибриноген человека или бестромбоцитарная плазма с известной концентрацией антигена фибриногена.

Оборудование. Чашки Петри и трубочные резцы, позволяющие сделать в агаровой пластине одно центральное отверстие диаметром 8 мм и 6 периферических отверстий диаметром 4 мм, расположенных на одинаковом расстоянии от центрального отверстия и друг от друга. Расстояние между центральным и периферическим отверстием должно составлять не менее 7 мм.

Материал для исследования. Свежая сыворотка крови (см. 4.1).

Приготовление агаровой пластины. В пробирке или колбочке готовят 1,5 % раствор агара на веронал-ацетатном буфере с добавлением мертиолата в концентрации 1:10000, разогревают его в бане с кипящей водой до гомогенного состояния, после чего 10 мл расплавленного агара выливают в чашку Петри, установленную на ровной горизонтальной поверхности. Когда агар станет твердым, в нем делают трубчатыми резцами отверстия (обычно в чашке Петри делают 14 отверстий: 2 центральных и вокруг каждого из них по 6 периферических).

Определение чувствительности антифибриногеновой сыворотки. Готовят 0,2 % (2 г/л) раствор очищенного фибриногена человека в веронал-ацетатном буфере. Разводят его веронал-ацетатным буфером, готовят растворы с концентрациями фибриногена 1; 0,5; 0,25; 0,125 и т.д. до 0,008 г/л (8 мкг/мл). В центральные отверстия вносят по 0,1 мл антифибриногеновой сыворотки, а в периферические — по 0,05 мл приготовленных растворов фибриногена. Агаровые пластины оставляют на сутки при комнатной температуре во влажной камере, а затем определяют наименьшую концентрацию фибриногена, образующую дугу преципитации с антифибриногеновой сывороткой. Эта концентрация и характеризует чувствительность антифибриногеновой сыворотки.

Ход определения. Исследуемую сыворотку разводят в 2; 4; 8; 16 и 32 раза. Вносят в центральные отверстия агаровой пластины по 0,1 мл антифибриногеновой сыворотки, а в периферические — исследуемую сыворотку и ее различные разведения. Через сутки инкубации чашки Петри при комнатной температуре определяют наибольшее разведение сыворотки, которое еще образует дугу преципитации. Рассчитывают концентрацию ПДФ по формуле: $C = A \cdot B$, где A — чувствительность антифибриногеновой сыворотки (минимальная концентра-

ция антигена фибриногена, которая может быть определена с применением имеющейся антифибриногеновой сыворотки); K — предельное разведение исследуемой сыворотки, при котором еще образуется дуга преципитации с антифибриногеновой сывороткой; C — концентрация ПДФ в исследуемой сыворотке.

Нормальные величины. У здоровых людей ПДФ этим методом не обнаруживаются, так как их концентрация находится за пределами чувствительности метода (менее 8 мкг/мл).

Клиническое значение. Увеличение концентрации ПДФ наблюдается при массивных тромбозах или диссеминированном внутрисосудистом свертывании крови с вторичным гиперфибринолизом и при лечении фибринолитическими препаратами.

Примечания. Чувствительность стандартных антифибриногеновых сывороток, производимых в ГДР и ЧССР, составляет не менее 0,016 г/л (16 мкг/мл), что обеспечивает надежное выявление клинически значимого повышения уровня ПДФ (≥ 20 мкг/мл). При отсутствии стандартной антифибриногеновой сыворотки ее можно приготовить в лаборатории, пользуясь известными методическими рекомендациями.

Литература. *Елизарова А. И., Федорова З. Д.* Получение антифибриногеновых сывороток, применяемых для определения продуктов распада фибриногена и фибрина.— Лаб. дело, 1971, № 12, с. 722- 724; *Парадесва И. К., Жукова И. В.* Количественное определение продуктов деградации фибриногена и фибрина методом иммунодиффузии.— Лаб. дело, 1979, № 10, с. 590—592; *Якунин Г. А., Смолянский А. Я., Кургузов О. П., Грабский М. А.* Определение содержания антигена фибриногена/фибрина в плазме и сыворотке крови методом радиальной иммунодиффузии.— Лаб. дело, 1982, № 7, с. 24—26.

Раздел 5

МЕТОДЫ КЛИНИЧЕСКОЙ БИОХИМИИ

5.1. БЕЛКИ

5.1.1. Общий белок

Белки относятся к высокомолекулярным соединениям; в их состав входит более 20 видов α -аминокислот, соединенных между собой пептидной связью (CO — NH). Различают простые и сложные белки. Простые белки состоят только из аминокислот, в сложные входят и другие вещества: в липопротеиды — липиды, в гликопротеиды — углеводы, в нуклеопротеиды — нуклеиновые основания, в хромопротеиды — различные окрашенные соединения. Плазма крови человека в норме содержит более 100 видов белков. Примерно 90 % общего белка составляют альбумин, иммуноглобулины, липопротеиды, фибриноген, трансферрин; другие белки присутствуют в плазме в небольших количествах.

Большинство специфических свойств белков зависит от химического строения и пространственной конфигурации макромолекул. Белки обладают гидрофильными свойствами, т. е. имеют большое сродство к воде, образуя с водой коллоидные растворы, отличающиеся неустойчивостью. Под влиянием разнообразных воздействий белки легко выпадают в осадок. На этом свойстве белковых растворов основаны различные осадочные пробы. Белки относятся к веществам, обладающим амфотерными свойствами, т. е. содержат кислые гидроксильные группы и основные аминокислотные группы, поэтому заряд их зависит от pH раствора, что важно учитывать при электрофоретическом разделении белков. В состав белков в среднем входит 16 % азота. В биологических жидкостях определяют общий белок, группы (фракции) белков, близкие по физическим и химическим свойствам, и индивидуальные белки. Для определения индивидуальных белков наиболее чувствительны и специфичны иммунологические методы, основанные на применении специфических антисывороток.

Методы определения общего белка в сыворотке крови основаны на различных принципах. Азотометрические — на определении содержащегося в нем азота (первый такой метод предложен J. Kjeldahl в 1883 г.), весовые (гравиметрические) — на высушивании белков до постоянной массы и последующем взвешивании на аналитических весах; спектрофотометрические — на определении поглощения при 280 нм; фотометрические — на измерении окрашенных продуктов реакции; рефрактометрические — на

определении на рефрактометре коэффициентов рефракции или преломления света.

Наиболее распространены рефрактометрические и фотометрические биуретовые методы. Биуретовый реактив был предложен в 1848 г. Однако эта реакция для определения общего белка в сыворотке крови стала широко применяться значительно позже. В биуретовой реакции атом меди связывает атомы азота белка с образованием цветных соединений. Первые биуретовые реактивы состояли из медного купороса и едкого натра. Концентрация щелочи может быть различной. Наибольшее распространение получил биуретовый реактив Вейксельбаума с концентрацией щелочи 0,2 моль/л. Включение тартрата калия и натрия в биуретовый реактив повысило его стабильность. Замена тартрата калия и натрия на динатриевую соль ЭДТА не дает особых преимуществ по сравнению с реактивом Вейксельбаума, так же как и использование предложенного Kingsley трифосфатбиуретового реактива с заменой едкого натра трифосфатом натрия. Увеличение концентрации сульфата меди незначительно влияет на результаты определения белка. Биуретовая реакция чувствительна к температуре. Повышение температуры увеличивает скорость развития окраски, которая достигает максимума через 5 мин. На данном принципе основано определение общего белка в сыворотке крови в поточных, дискретных и центрифужных автоанализаторах.

В биуретовом методе Лоури чувствительность выше за счет сочетания биуретовой реакции с реакцией Фолина с применением реактива Фолина — Чиокольтео. В фотометрических биуретовых методах для получения правильных результатов важным является выбор калибровочного материала, учитывая, что общий белок состоит из индивидуальных белков различного состава. Некоторые естественные белки, например альбумин человеческой и бычьей сыворотки, могут быть использованы в качестве калибровочных материалов. Белки для калибровочного материала должны быть хорошо охарактеризованы и иметь концентрацию не менее 70 г/л.

Унификация методов. Биуретовый метод определения общего белка в сыворотке крови был утвержден в качестве унифицированного в 1972 г. В СССР выпускается «Набор химических реактивов для определения общего белка в сыворотке крови по биуретовой реакции». Набор создан для унифицированного метода; в качестве калибровочного материала использован ампули-

рованный раствор плацентарного альбумина с концентрацией 100 г/л.

Унифицированный метод по биуретовой реакции. П р и н ц и п. Белки реагируют в щелочной среде с сульфатом меди, при этом образуются соединения, окрашенные в фиолетовый цвет (биуретовая реакция).

Р е а к т и в ы. 1. Натрия хлорид, ч. д. а. или х. ч., 154 ммоль/л (изотонический раствор): 9 г хлорида натрия помещают в мерную колбу вместимостью 1 л, растворяют в воде и доводят до метки водой. 2. Натр едкий, ч. д. а. или х. ч., 0,2 моль/л: 8 г едкого натра помещают в мерную колбу вместимостью 1 л, осторожно растворяют в воде и доводят до метки водой. 3. Калия йодид ч. д. а. или х. ч., 30 ммоль/л раствор йодида калия в 0,2 моль/л растворе едкого натра; 0,5 г йодида калия помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят 0,2 моль/л раствором едкого натра до метки и растворяют. Реактив стабилен в течение 2 нед при хранении в посуде из темного стекла. 4. Калий-натрийвиннокислый 4-водный (сегнетова соль) ч. д. а. 5. Меди сульфат 5-водный ч. д. а. или х. ч. 6. Биуретовый реактив: 4,5 г сегнетовой соли растворяют в 40 мл 0,2 моль/л растворе едкого натра, прибавляют 1,5 г сульфата меди и 0,5 г йодида калия и растворяют. Доливают до 100 мл 0,2 моль/л раствором едкого натра. Реактив стабилен при хранении в посуде из темного стекла. 7. Рабочий раствор биуретового реактива: 20 мл биуретового реактива смешивают с 80 мл 0,5 % раствора йодида калия. Раствор стабилен. 8. Калибровочный раствор альбумина (из человеческой сыворотки): 100 г/л раствор альбумина в 154 ммоль/л растворе хлорида натрия.

М а т е р и а л д л я и с с л е д о в а н и я. Сыворотка крови.

Х о д о п р е д е л е н и я. Опытная проба: к 0,1 мл сыворотки прибавляют 5 мл рабочего раствора биуретового реактива и смешивают избегая образования пены. Через 30 мин (и не позднее чем через 1 ч) измеряют на фотометре в кювете с толщиной слоя 1 см при длине волны 500—560 им (зеленый светофильтр) против холостой пробы. Холостая проба: к 5 мл рабочего биуретового реактива прибавляют 0,1 мл 154 ммоль/л раствора хлорида натрия, далее обрабатывают как опытную пробу.

Р а с ч е т в е д у т п о к а л и б р о в о ч н о м у г р а ф и к у.

П о с т р о е н и е к а л и б р о в о ч н о г о г р а ф и к а: из калибровочного раствора готовят рабочие растворы как указано ниже.

№ пробы	Калибровочный раствор альбумина, мл	154 ммоль/л раствор хлорида натрия, мл	Концентрация альбумина, г/л
1	0,2	0,8	20
2	0,4	0,6	40
3	0,6	0,4	60
4	0,8	0,2	80
5	1,0	—	100

Из каждого разведения берут по 0,1 мл рабочего раствора и прибавляют по 5 мл рабочего биуретового реактива; через 30—60 мин измеряют на фотометре, как в опыте, против холостой пробы. По полученным данным строят калибровочный график. Калибровочная кривая линейна до 100 г/л альбумина.

Н о р м а л ь н ы е в е л и ч и н ы : 65—85 г/л (6,5—8,5 г/100 мл).

О ц е н к а а н а л и т и ч е с к о й н а д е ж н о с т и м е т о д а. Метод специфичен, отличается хорошей воспроизводимостью. Воспроизводимость (V) составляет 1,5—3,5 %. На правильность метода влияет качество калибровочного материала и корригирование результатов со значением холостой пробы на реактивы и сыворотку. Небольшое число веществ оказывает интерферирующее действие в данной реакции: билирубин при концентрации больше 85 мкмоль/л, триглицериды — больше 11,4 ммоль/л. Для устранения интерференции, вызванной липемией (присутствием хиломикроннов), применяют экстракцию диэтиловым эфиром. Большинство лекарств не вызывает интерференцию.

Л и т е р а т у р а. Методические указания по применению унифицированных клинических лабораторных методов исследований. Под ред. В. В. Меньшикова.—М., 1973, с. 45—47; Weichselbaum T. Amer. J. Clin. Pathol., 1946, vol. 16, p. 40.

К л и н и ч е с к о е з н а ч е н и е. Изменение содержания общего белка в сыворотке крови происходит при уменьшении процессов синтеза белка, нарушении водного баланса, усиленном распаде и потере белка. Гипопротеинемия наблюдается при нефротическом синдроме, синдроме мальабсорбции (энтерит, хронический панкреатит), экссудативной энтеропатии, заболеваниях кожи (ожоги, экзема), массивных кровотечениях, задержке солей и воды (хронические почечные заболевания), агаммаглобулинемии, гипогаммаглобулинемии, неправильном питании, голодании. Уменьшение содержания белка в плазме крови может наступить также в результате задержки воды при сердечной декомпенсации, заболеваниях, сопровождающихся отеками или большими потерями белка с мочой, например при нефритах. Нарушением синтеза белка и уменьшением его вследствие этого в сыворотке крови сопровождаются раковая кахексия, длительные воспалительные процессы.

Г и п е р п р о т е и н е м и я наблюдается при плазмоцитоме, макроглобулинемии Вальденстрема, хронических воспалительных заболеваниях (ревматоидный артрит, диффузные болезни соединительной ткани — коллагенозы, бронхоэктазы, цирроз печени), состояниях и болезнях, сопровождающихся дегидратацией (понос, рвота, сахарный диабет).

П р и т я ж е л ы х т р а в м а х увеличение содержания общего белка в плазме крови может наступить за счет потери части внутрисосудистой жидкости. При острых инфекционных заболеваниях к гиперпротеинемии приводит усиленный синтез белков острой фазы, при хронических инфекционных заболеваниях — повышение синтеза иммуноглобулинов.

5.1.2. Альбумин

Альбумин — простой белок, синтезирующийся и печени; в плазме крови поддерживает коллоидно-осмотическое давление, играет важную роль в транспорте многих веществ экзогенного и эндогенного происхождения.

Методы определения альбумина — фотометрические, электрофоретические, иммунологические. Фотометрические методы основаны главным образом на взаимодействии альбумина с красителями. С этой целью применяют бромкрезоловый зеленый (БКЗ), бромкрезоловый красный, метиловый оранжевый, натриевую соль 2-(4-оксиазобензол)-бензойной кислоты (ОБК); бромфеноловый голубой и др. Наиболее распространены методы с использованием в качестве красителей БКЗ и ОБК. Наиболее специфичным является метод с БКЗ; при pH 7,0 альбумин обладает высокой степенью сродства к БКЗ. При применении ацетатного буфера окраска развивается быстро и остается стабильной в течение 2 ч. Интенсивность образования окрашенного соединения зависит от вида буфера. При применении ацетатного и лактатного буфера достигается наибольшая чувствительность метода (соотношение объемов пробы и реактивов может составлять 1:500). Оптимум рН ацетатного буфера равен 4,1—4,2. Метод с БКЗ требует введения в реакцию детергентов для предотвращения преципитации комплекса альбумина с БКЗ. С этой целью используют катионные, анионные детергенты, чаще применяют неионные детергенты — твин 20, твин 80, бридж 35, тритон X-100 и др. Метод, основанный на реакции альбумина с 2-(4-оксиазобензо. i) бензойной кислотой, отличается низкой чувствительностью и специфичностью, а также нестабильностью окраски конечного продукта реакции.

Унификация методов. Метод определения альбумина по реакции с бромкрезоловым зеленым утвержден в качестве унифицированного в 1979 г.

Унифицированный метод по реакции с бромкрезоловым зеленым. П р и н ц и п. При взаимодействии альбумина с БКЗ в слабокислой среде в присутствии детергента образуется окрашенный комплекс синего цвета.

Р е а к т и в ы. 1. Уксусная кислота, 1 моль/л: в мерную колбу вместимостью 1 л помещают 60 мл ледяной уксусной кислоты и доводят объем водой до метки. 2. Натр едкий ч. д. а., х. ч. 1 моль/л. 3. Полиоксиэтиленлауриловый эфир (бридж 35). 4. Ацетатный буфер, 0,05 моль/л, pH 4,2 с добавлением детергента: 0,85 г бриджа 35 растворяют в 200 мл воды, добавляют 50 мл 1 моль/л раствора уксусной кислоты, 13,2-мл 1 моль/л раствора едкого натра и доводят объем водой до 1 л. Перемешивают, проверяют pH. Реактив стабилен при хранении в холодильнике. 5. Бромкрезоловый зеленый (БКЗ) водорастворимый, индикатор, ч. д. а. 1,2 ммоль/л: 0,4292 г БКЗ растворяют в 200—300 мл воды в мерной колбе емкостью 500 мл и доводят объем до метки.

Стабилен при хранении в холодильнике в посуде из темного стекла. 6. Рабочий раствор БКЗ в ацетатном буфере: в мерную колбу вместимостью 1 л помещают 85 мл 1,2 ммоль/л раствора БКЗ, доводят объем до метки ацетатным буфером с детергентом. Стабилен при хранении в холодильнике в посуде из темного стекла. 7. Основной калибровочный раствор альбумина, 10 г/100 мл. Можно использовать ампулированный 10 % раствор альбумина плацентарного.

М а т е р и а л д л я и с с л е д о в а н и я. Сыворотка крови, свободная от гемолиза.

Х о д о п р е д е л е н и я. Опытная проба: 10 мкл сыворотки крови (или 0,1 мл сыворотки, разведенной в 10 раз 154 ммоль/л раствора NaCl) тщательно перемешивают, избегая образования пены, с 4 мл рабочего раствора БКЗ в ацетатном буфере. Через 5—10 мин измеряют на фотометре в кювете с толщиной слоя 1 см при длине волны 630—690 нм (красный светофильтр) против холостой пробы на реактивы или на спектрофотометре при длине волны 625 нм в кювете с толщиной слоя 1 см. Окраска стабильна в течение 8 ч. Холостую пробу ставят так же, как опытную, но вместо сыворотки добавляют 0,1 мл воды.

Расчет ведут по калибровочной кривой.

П о с т р о е н и е к а л и б р о в о ч н о й к р и в о и: готовят ряд разведений основного калибровочного раствора, как указано ниже. Калибровочные растворы обрабатывают, как опытные, но вместо сыворотки добавляют 10 мкл калибровочного раствора. Калибровочная кривая линейна до концентрации альбумина 60 г/л.

№ пробы	Основной калибровочный раствор альбумина, мл	Дистиллированная вода, мл	Содержание альбумина в сыворотке крови, г/л
1	1,0	4,0	20
2	1,5	3,5	30
3	2,0	3,0	40
4	2,5	2,5	50
5	3,0	2,0	60

Н о р м а л ь н ы е в е л и ч и н ы: 35—50 г/л (3,5—5,0 г/100 мл).

В о с п р о и з в о д и м о с т ь. V 2—5 %.

Л и т е р а т у р а. Лукичева Т. И., Сенгебова Н. А. Лаб. дело. 1977, № 11, с. 675—677; 1978, № 4, с. 227—233; Slurardin V., Ney J. /. klin. Cliein. klin. Biochem., 1972, Bd 10, S. 338—344.

К л и н и ч е с к о е з н а ч е н и е. Гиперальбуминемия наблюдается при тех же состояниях, что и гиперпротеинемия. Гипоальбуминемия наступает при больших потерях белка, связанных с кровотечением при нарушении синтеза альбумина и увеличении процессов распада.

5.1.3. Белковые фракции

Состав фракций белков, выделяемых в биологических жидкостях, в значительной степени зависит от применяемого метода.

Основные методы фракционирования белков сыворотки крови: высаливание нейтральными солями, электрофоретическое фракционирование, иммунологические методы, седиментационный способ, хроматография, гель-фильтрация, осаждение этиловым спиртом при низкой температуре. Наиболее приемлемыми и информативными являются электрофоретические методы разделения. Другие методы не получили широкого распространения.

При электрофоретическом разделении через исследуемую сыворотку, помещенную в камеру с буферным раствором, пропускают электрический ток определенной силы и напряжения. В зависимости от электрического заряда и других физических и химических свойств белковые фракции передвигаются к одному из полюсов (в нейтральной среде — к аноду). Количество выделенных белковых фракций зависит от применяемой поддерживающей среды. В качестве поддерживающей среды при электрофорезе применяют бумагу, пленки ацетат целлюлозы, гели крахмала, полиакриламида, агара и комбинированные среды.

Электрофорез на бумаге был введен в 50-х годах. Оценка результатов производится фотометрически после электрофореза отдельных фракций белков или на денситометре. Недостатки метода: вследствие химической неоднородности бумаги получается недостаточно четкое разделение фракций; большая длительность процессов разделения, окрашивания, отмывания.

Электрофорез на пленках из ацетата целлюлозы по сравнению с бумажным электрофорезом обладает рядом преимуществ: химическая однородность ацетата и одинаковый размер пор позволяют увеличить четкость разделения; время, необходимое для разделения, значительно меньше, чем при электрофорезе на бумаге; для получения четкой электрофореграммы достаточно 0,1—0,3 мкл образца; фон, получаемый после окрашивания, легко отмывается; абсорбция белка пленкой минимальная. Для исследования применяют веронал-мединаловый буфер pH 8,6, веронал-ацетатный буфер pH 8,6, мединал-цитратный буфер pH 8,6, трис-буфер.

Для окраски электрофореграммы применяют: пунцовый С, нигрозин, амидо черный, азокармин, бромфеноловый синий. Чаще других используют пунцовый С-индикатор: при pH 10,0 красный, при pH 12,5 — пурпурный. При электрофорезе на бумаге и пленках ацетата целлюлозы в сыворотке крови получают 5 фракций: альбумин — самая большая и наиболее быстро движущаяся к аноду фракция, далее α_1 -глобулины, α_2 -глобулины, β -глобулины и γ -глобулины — наиболее медленно движущаяся к аноду фракция. Метод электрофореза на пленках из ацетата целлюлозы утвержден в качестве унифицированного в 1979 г. Электрофорез в гелях (агаровом, крахмальном и др.) применяют реже. При электрофорезе в полиакриламидном геле

в сыворотке крови получают более 20 фракций белков.

Методом высаливания нейтральными солями (сульфат аммония, сульфат и фосфат натрия) выделяют только 3 фракции белков плазмы: альбумины, глобулины, фибриноген.

Унифицированный метод электрофоретического разделения на пленках из ацетата целлюлозы. Принцип. Коллоидные частицы белка перемещаются в электрическом поле постоянного тока: в щелочной среде — к аноду, в кислой — к катоду. В щелочной среде в электрическом поле наиболее быстро перемещаются альбумины, затем α_1 - и α_2 -глобулины.

Реактивы. 1. 5,5-Диэтилбарбитуровой кислоты натриевая соль (мединал), фарм. 2. Лимонная кислота ч. д. а., х. ч. 3. Барбитал-цитратный (мединал-цитратный) буфер pH 8,6: 7,36 г 5,5-диэтилбарбитурата натрия (мединала), 0,3 г лимонной кислоты растворяют в 700 мл воды в мерной колбе вместимостью 1 л, проверяют pH и доводят водой до метки. 4. Бромфеноловый синий водорастворимый, индикатор ч. д. а. 5. Ртузь двухлористая (сулема, хлорная ртузь) ч. д. а. 6. Уксусная кислота ледяная х. ч. 7. Пунцовый С. 8. Кислотный красный 2Ж. 9. Трихлоруксусная кислота ч., 50 г/л раствор. 10. Растворы для окрашивания, а) Раствор бромфенолового синего, 0,5 г/л: 10 г двухлористой ртути и 20 мл ледяной уксусной кислоты растворяют в небольшом количестве воды при нагревании на водяной бане, непрерывно помешивая до полного растворения сулемы. Отдельно растворяют 0,5 г бромфенолового синего в воде. Оба раствора помещают в мерную колбу вместимостью 1 л и доводят водой до метки, б) раствор пунцового С: 0,3 г краски растворяют в 100 мл 50 г/л раствора трихлоруксусной кислоты, в) Раствор кислого красного 2Ж: 0,3 г краски растворяют в 100 мл 50 г/л раствора трихлоруксусной кислоты. 11. Отмывающий раствор — уксусная кислота, 50 г/л раствор. 12. Просветляющие растворы, а) Вазелиновое масло, б) Смесь: ледяная уксусная кислота и ацетон (1:1).

Специальное оборудование.

1. Прибор для электрофореза на пленках из ацетата целлюлозы. 2. Пленка из ацетата целлюлозы. 3. Денситометр.

Ход определения. Подготовка прибора: прежде чем приступить к работе, необходимо ознакомиться с инструкцией по эксплуатации прибора. В соответствии с инструкцией заполняют камеры прибора буферным раствором. Следят, чтобы уровень буфера был одинаковым в обеих камерах.

Подготовка пленок из ацетата целлюлозы: смачивают пленки буферным раствором (помещают в буферный раствор на 5 мин). Удаляют избыток влаги фильтровальной бумагой. Закрепляют пленку маговой стороной вверх (пленки должны располагаться параллельно друг другу и строго параллельно стенкам прибора, не должны провисать). Закрывают камеру крышкой и пропускают ток напряжением 150 В в течение 5 мин, после чего выключают ток.

Нанесение сыворотки: на катодный край пленки наносят 1–4 мкл сыворотки в виде узкой полоски, так, чтобы полоски не доходили до края пленки.

Проведение электрофореза: включают ток и проводят электрофоретическое разделение в течение 20 мин при напряжении 150 В и силе тока 1 мА на 1 см поперечного сечения полоски.

Обработка пленок из ацетата целлюлозы: выключают ток, вынимают пленки, высушивают их вначале на воздухе в течение 5–10 мин, затем (для фиксации) в сушильном шкафу при 100 °С в течение 10 мин. Окрашивают в течение 15 мин одним из указанных красителей, после чего пленки несколько раз отмывают от избытка красителя 50 г/л раствором уксусной кислоты до исчезновения фона (3–4 раза). После отмывки пленки промокают фильтровальной бумагой и высушивают на воздухе. Затем пленки просветляют в одном из просветляющих растворов.

Расчет. Измерение проводят на денситометре. Результаты выражают в процентах.

Нормальные величины зависят от вида красителя (табл. 38).

Т а б л и ц а 38. Нормальные величины белковых фракций (в процентах)

Белковые фракции	Окраска	
	пунцовый С	бромфеноловый синий
Альбумин	52 (46,9–61,4)	58 (53,9–62,1)
Глобулины:		
α_1	3,3 (2,2–4,2)	3,9 (2,7–5,1)
α_2	9,4 (7,9–10,9)	8,8 (7,4–10,2)
β	14,3 (10,2–18,3)	13,0 (11,7–15,3)
γ	21,4 (17,6–25,4)	18,5 (15,6–21,4)

Воспроизводимость по каждой из фракции. В серии V ~ 1,5–5 %, изо дня в день V~3–8 %.

Примечания. 1. Можно использовать барбиталовый (мединал-вероналовый) буфер такого же состава, как и для электрофореза на бумаге. 2. После проведения электрофореза буфер из катодной и анодной камер смешивают, что дает возможность использовать его несколько раз.

Литература. *Сентебова Н. А., Медведева Л. А., Александровская Т. Н.* В кн.: Унификация лабораторных методов исследования/Под ред. В. В. Меньшикова. М., 1978, вып. VIII, с. 39–49; *Kohn J.* In: *Laboratory medicine*. V. 1—Hagerstown e. a., 1975, Chap. 12B.

Электрофоретическое разделение на бумаге. Принцип тот же, что при электрофорезе на пленках из ацетата целлюлозы.

Реактивы. 1. Буфер. Можно использовать различные виды буферов — мединал-вероналовш. боратный, трис-буфер. а) Мединал-вероналовый буфер рН 8,6:10,3 г мединала и 1,84 г веронала растворяют и доводят до 1 л

водой, б) Трис-буфер рН 8,9: трис-(оксиметил)-аминометан 60,5 г, этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА) 6 г, борная кислота 4,6 г, вода до 1 л. 2. Раствор красителя. Используют различные красители — бромфеноловый синий, амидо черный, азокармин Б и др.: 1 г бромфенолового синего и 20 г двухлористой ртути (сулемы) растворяют в воде, добавляют 40 г ледяной уксусной кислоты и доводят водой до 2 л. Хранят в посуде из темного стекла. 3. Раствор для элюирования — натр едкий, 0,03 моль/л.

Специальное оборудование. 1. Прибор для электрофореза на бумаге. 2. Хроматографическая фильтровальная бумага марки «Б» (качество фильтровальной бумаги имеет большое значение: она должна быть однородной и плотной).

Ход определения. Подготовка прибора: в камере необходимо поддерживать определенную влажность воздуха, чтобы предохранить фильтровальную бумагу от высыхания. Для этого прибор закрывают крышкой. Буферный раствор в разных отделах камеры должен иметь одинаковый уровень, чтобы избежать переливания жидкости через ленту.

Подготовка бумаги: полосы фильтровальной бумаги смачивают раствором свежего буфера. Избыток буфера удаляют, отжимая полосы между лентами фильтровальной бумаги, и помещают их в электрофоретическую камеру. Бумажная лента может быть расположена горизонтально (горизонтальный электрофорез) или под углом (вертикальный электрофорез). При горизонтальном электрофорезе бумажная лента должна быть хорошо натянута.

Нанесение сыворотки: на край ленты наносят по 5–10 мкл негемолизированной сыворотки в виде поперечной полосы, отступая на 0,5 см от краев.

Проведение электрофореза: камеру закрывают крышкой и проводят электрофорез сыворотки в течение 6–24 ч при напряжении от 3 до 8 В на 1 см пути тока. Продолжительность электрофореза устанавливают в зависимости от силы и напряжения тока, вида буферного раствора, рН, длины, ширины и толщины бумажных полос.

Обработка бумажных полос: выключают ток, вынимают ленты, сушат в сушильном шкафу в течение 10 мин при 105 °С и красят, погружая в раствор красителя на 20 мин. Краситель сливают и ленты несколько раз промывают 20 г/л раствором уксусной кислоты до устранения фона (окрашенные участки бумаги, свободные от белка). Ленты вновь просушивают на воздухе.

Расчет: измерение проводят на денситометре или на фотометре после элюирования. Результаты выражают в процентах.

Элюирование: кусочки ленты, содержащие отдельные фракции, вырезают и помещают в пробирку для элюирования. Для этого в каждую пробирку с глобулиновой фракцией приливают по 10 мл 0,02 моль/л раствора NaOH, к альбуминовой фракции — 20 мл и оставляют в течение 1–2 ч. Измерение проводят в кювете с толщиной слоя 1 см против 0,02 моль/л раствора

NaOH при 500—560 нм (зеленый светофильтр). Величину экстинкции альбуминов умножают на 2. Определяют сумму экстинкции всех фракций, принимая ее за 100 %, и вычисляют долю каждой фракции.

Нормальные величины у взрослых: альбумины 50—70 %; глобулины: он 3—6 %; a_2 9—15; в 8—18 %; у 15—25 %.

Клиническое значение. Диагностическое значение определения альбумина представлено выше. Увеличение содержания α -глобулинов в сыворотке крови характерно для острых воспалительных процессов, так как в данную фракцию входят белки острой фазы (С-реактивный белок, α_1 -гликопротеид, α_1 -анти-трипсин, α_2 -макроглобулин, церулоплазмин, гаптоглобулин и др.). Во фракцию α -глобулинов входит большинство гликопротеидов. Содержание α -глобулинов увеличивается также при различных хронических заболеваниях, злокачественных новообразованиях, метастазировании опухолей, травмах, ревматизме, инфаркте миокарда.

Повышение γ -глобулинов в сыворотке крови чаще наступает при гиперлипотеидемиях различного происхождения, что связано с наличием в данной фракции липопротеидов. Фракция γ -глобулинов увеличивается при патологических состояниях, связанных с интенсификацией иммунологических процессов, так как фракция γ -глобулинов состоит главным образом из иммуноглобулинов. Увеличение содержания γ -глобулинов может наступать за счет образования патологических белков — парапротеинов, относящихся к иммуноглобулинам.

Гипогаммаглобулинемии могут носить врожденный характер или могут быть обусловлены наличием различных заболеваний или патологических состояний, сопровождающихся истощением иммунной системы. К таким заболеваниям относятся злокачественные опухоли, хронические воспалительные процессы, аллергические заболевания.

5.1.4. Осадочные пробы

Применение осадочных проб с диагностической целью основано на изменениях устойчивости белков плазмы при некоторых заболеваниях. В норме белки в плазме крови находятся в коллоидном состоянии и отличаются высокой устойчивостью. При постановке осадочных проб, которые сопровождаются химическим или физическим вмешательством, наступает преципитация белков, приводящая к помутнению или образованию хлопьев.

Основные осадочные пробы. Пробы с применением реакции Таката (проба Таката, проба Гросса, сулемовая проба); тимоловая проба; кефалин-холестериновая проба; цинк-сульфатная (Кункеля) проба; реакция Вельтмана; золото-коллоидальная проба. Наибольшее диагностическое значение при заболеваниях печени имеет тимоловая проба. Тимоловая проба предложена в 1944 г. Маклаганом. Тимоловый реактив

представляет собой насыщенный водный раствор тимола в буфере. Химическая сущность тимоловой пробы окончательно не выяснена. Считают, что проба является положительной при уменьшении альбуминов и увеличении β - и γ -глобулинов.

Способ приготовления тимолового реактива и вид буфера могут влиять на результаты. Тимоловый реактив в вероналовом буфере, предложенный Маклаганом, неустойчив. Повысить устойчивость реактива можно различными способами. Хуэргю и Поппер предложили модифицировать оригинальный реактив Маклагана, изменив способ его приготовления (timoл добавляется к вероналовому буферу в форме концентрированного спиртового раствора).

Позднее было предложено заменить вероналовый буфер трис-буфером, который в сочетании с HCl и малеиновой кислотой увеличивает стабильность реактива. Немаловажное значение имеет оптимизация условий определения. Реакция более чувствительна при pH 7,55 и температуре 23—25 °C.

Оценку помутнения, возникшего в ходе реакции, можно проводить визуально или турбидиметрически. Предложены различные суспензии для построения калибровочной кривой. Чаще других применяют бариево-сульфатный реактив. Тимоловая и сулемовая пробы и проба Вельтмана утверждены в качестве унифицированных в 1972 г.

Тимоловая проба (унифицированный метод). Принцип. При взаимодействии сыворотки с тимолово-вероналовым раствором появляется помутнение вследствие образования глобулино-тимоло-липидного комплекса.

Реактивы. 1. Тимол, 100 г/л спиртовой раствор: 10 г очищенного тимола растворяют в 96 % этиловом спирте в мерной колбе вместимостью 100 мл. Очистка тимола: 100 г тимола ч. растворяют в 100 мл 96 % этилового спирта, фильтруют. К фильтрату прибавляют 1 л холодной воды, сильно встряхивают и оставляют стоять на 20 мин. Затем фильтруют; кристаллы, оставшиеся на фильтре, промывают 2 раза холодной водой, сушат до постоянной массы вначале на фильтровальной бумаге, затем в течение 2—3 дней в эксикаторе над безводным хлоридом кальция. 2. 5,5-Диэтилбарбитуровая кислота (веронал), фарм. 3. 5,5-Диэтилбарбитуровой кислоты натриевая соль (мединал), фарм. 4. Буферный раствор: 2,76 г веронала и 2,06 г медиана растворяют и доводят до 1 л водой. Хранят в холодильнике; при появлении осадка раствор негоден к употреблению. 5. Тимолово-вероналовый буфер pH 7,55—7,6: в мерной колбе вместимостью 100 мл смешивают 80 мл буферного раствора и 1 мл 100 г/л спиртового раствора тимола, встряхивают и доливают буферным раствором до метки. Проверяют pH. 6. Бария хлорид ч. д. а. или х. ч. 7. Калибровочный раствор. а) Раствор хлорида бария: 1,175 г хлорида бария ($BaCl_2 \cdot 2H_2O$) растворяют и доводят до 100 мл водой. б) Серная кислота х. ч., 0,1 моль/л. Суспензия сульфата бария: 3 мл раствора хлорида бария наливают в мерную колбу вместимостью 100 мл и доводят объем до метки

0,1 моль/л раствором серной кислоты при температуре 10 °С (при этой температуре размеры преципитированного сульфата бария дают относительно стабильный результат). Суспензию сульфата бария готовят перед употреблением.

Материал для исследования. Сыворотка крови, свободная от гемолиза.

Ход определения. К 6 мл тимолово-вероналового буферного раствора прибавляют 0,1 мл сыворотки, оставляют стоять 30 мин и затем измеряют оптическую плотность при длине волны 630—690 нм (красный светофильтр) против тимолово-вероналового буфера в кюветках с толщиной слоя 1 см. Реакцию проводят при комнатной температуре.

Расчет ведут по калибровочному графику.

Построение калибровочного графика: из калибровочного раствора сульфата бария (суспензии) готовят разведения, соответствующие единицам помутнения по Шенк—Хогланд. Калибровочные растворы хорошо встряхивают и тотчас при длине волны 630—690 нм в кюветках с толщиной слоя 1 см против воды измеряют.

Суспензия BaSO ₄ , мл	0,1 моль/л раствор NaSO ₄ , мл	Единицы помутнения
1,35	4,65	5
2,7	3,3	10
5,4	0,6	20

Нормальные величины: 0—4 ед.

Примечание. Можно использовать готовый набор реактивов Био-Ла-Тест «Тимоловая проба» («Лахема», ЧССР), в состав которого входят трис-буфер и малеиновая кислота.

Литература. *Huerga J., Popper H. J. Lab. clin. Med.*, 1949, vol. 34, p. 877; *Shank R., Hoagland C. J. biol. Chem.*, 1946, vol. 162, p. 33.

Сулемовая проба (унифицированный метод).

Принцип. Сулема в присутствии мелкодисперсных коллоидов (белков) образует коллоидальный раствор солей ртути. Нарушение дисперсности белковых фракций сыворотки крови вызывает осаждение грубодисперсных частиц.

Реактивы. 1. Сулема, 1 г/л раствор: 0,1 г двухлористой ртути растворяют в воде в мерной колбе вместимостью 100 мл. 2. Натрия хлорид, 154 ммоль/л.

Материал для исследования. Сыворотка крови, свободная от гемолиза.

Ход определения. К 0,5 мл сыворотки добавляют 1 мл 154 ммоль/л раствора NaCl и титруют 1 г/л раствором сулемы. После появления первоначально обратимого помутнения титруют медленно с интервалом 20—30 с до стойкого помутнения (через вертикальный слой жидкости нельзя прочитать газетный текст). Результаты сулемовой реакции выражают в ко-

личестве миллилитров раствора сулемы, пошедших на титрование.

Нормальные величины: 1,6—2,2 мл сулемы.

Литература. *Grinstedt F. Acta med Scand.*, 1948, vol. 131, p. 66.

Проба Вельмана (унифицированный метод). Принцип. При добавлении к сыворотке крови раствора хлорида кальция и нагревании происходит нарушение коллоидальной устойчивости сыворотки.

Реактивы. 1. Кальция хлорид 0,5%. Готовят из 10 % раствора хлорида кальция ($CaCl_2 \cdot 6H_2O$), что соответствует 5 % раствору безводного хлорида кальция. Точно определить массу хлорида кальция невозможно из-за его гигроскопичности, поэтому концентрацию раствора определяют по относительной плотности; 5 % раствор безводного хлорида кальция имеет относительную плотность 1,040. Для приготовления 10 % раствора хлорида кальция 99,14 г $CaCl_2 \cdot 6H_2O$ доводят до 1 л бидистиллированной водой и растворяют, затем измеряют относительную плотность и путем дальнейшего разведения доводят относительную плотность до 1,040. Из полученного раствора, разведя его в 10 раз, готовят 0,5 % раствор хлорида кальция. Для приготовления 0,5 % раствора можно использовать ампулированный раствор хлорида кальция. Если относительная плотность ампулированного раствора 1,040, то 0,5 % раствор готовят разведением ампулированного раствора в 10 раз.

Материал для исследования. Сыворотка крови, свободная от гемолиза.

Ход определения. К 0,1 мл сыворотки прибавляют 4,9 мл воды, перемешивают, опрокидывая пробирку, и прибавляют 0,1 мл 0,5 % раствора хлорида кальция, встряхивают и нагревают пробирку над пламенем до однократного закипания смеси. Охлаждают пробирку и смотрят на свету. Если хлопьев нет, то в эту же пробирку добавляют еще 0,1 мл хлорида кальция и вновь кипятят. Процедуру повторяют, пока не выпадут хлопья.

Результаты оценивают, подсчитывая общее количество пошедшего на реакцию хлорида кальция.

Нормальные величины. В норме коагуляция наступает при прибавлении 0,4—0,5 мл раствора хлорида кальция.

Клиническое значение. Результаты осадочных проб могут быть патологическими при заболеваниях печени, а также при других заболеваниях, сопровождающихся диспротеинемиями. Поэтому их следует расценивать в сочетании с другими лабораторными тестами и клиническими симптомами. Наиболее специфичной для поражения печени является тимоловая проба, она бывает положительной раньше появления желтухи. Сулемовая проба чаще бывает положительной при циррозе печени, токсических поражениях печени, силикозе. В пробе Вельмана коагуляция наступает при прибавлении меньшего количества раствора хлорида кальция при паренхиматозном поражении печени, маля-

рии. Коагуляция мри прибавлении большего количества раствора хлорида кальция наблюдается при ревматизме, туберкулезе легких.

Л и т е р а т у р а . *Weltmann O.* Med. Klin., 1930, vol. 26, p. 240; *Weitmann O.* Wicn. klin. Wschr., 1930, vol. 11, p. 1301.

5.2. ФЕРМЕНТЫ

5.2.1. Общая часть

В основе многих болезней лежат нарушения нормального функционирования ферментативных процессов. Изменения в специфических ферментативных реакциях можно идентифицировать как причину или следствие различных патологических состояний. Эта взаимосвязь наиболее отчетливо выявляется при некоторых врожденных нарушениях метаболизма. Большинство ферментов, катализирующих химические реакции, протекающие в живом организме, находятся в клеточной среде, тем не менее на основании результатов анализов внеклеточных жидкостей (особенно плазмы или сыворотки крови) можно сделать заключение об изменениях, происходящих внутри клеток разных органов и тканей.

Определяемая в норме активность ферментов в сыворотке крови есть результат сбалансированности скорости, с которой ферменты синтезируются внутри клеток и выходят из них, со скоростью удаления ферментов из внеклеточной жидкости путем инактивации и разрушения и их экскреции. Изменения активности ферментов в биологических жидкостях при заболеваниях могут быть обусловлены рядом причин.

Повышение активности может быть результатом ускорения процессов синтеза (например, ЩФ при рахите, гепатите), некроза клеток (например, КК, АсАТ при инфаркте миокарда), понижения выведения (например, ЩФ, ЛАП при закупорке желчных путей), повышения проницаемости клеточных мембран (например, АлАТ, АсАТ при вирусном гепатите).

Понижение активности вызывается уменьшением числа клеток, секретирующих фермент (например, ХЭ при циррозе печени), недостаточностью синтеза (например, церулоплазмин при болезни Вильсона), увеличением выведения фермента (например, церулоплазмин при нефрозе), торможением активности (например, активноститрипсинаантитрипсином).

Наиболее важны с диагностической точки зрения те изменения, которые обусловлены нарушением скорости образования ферментов или высвобождением ферментов из поврежденных или омертвевших клеток. Многие факторы способны повышать проницаемость мембран для белков и таким образом вызывать «утечку» внутриклеточных ферментов: уменьшение доставки кислорода в клетку, истощение запаса глюкозы в крови, лекарственные и химические вещества. Если началось выделение ферментов из клетки, то на скорость появления ферментов в сыворотке крови воздействуют следующие факторы: концентрационный градиент внутри клетки и в сыворотке крови (например, для гепатоцита соотношение концентраций равно 3000:

1 для ЛДГ и 10000:1 для АсАТ и АлАТ); размер и форма молекул ферментов и величина молекулярной массы; внутриклеточная локализация ферментов. Важно также время полураспада фермента в плазме; оно может колебаться от нескольких часов до нескольких дней. Ферменты, поступающие в плазму, могут быть специфичными для плазмы и выполнять в ней определенные физиологические функции. Их активность в плазме больше, чем в клетках или тканях. К ним относятся: церулоплазмин, псевдохолинэстераза, липопротеиновая липаза. Эти ферменты синтезируются в печени и постоянно высвобождаются в плазму. С диагностической точки зрения они представляют интерес, когда их активность в плазме ниже нормы за счет нарушения функции печени.

Вторая группа ферментов, неспецифичных для плазмы, не выполняет определенных физиологических функций в плазме. Их активность в плазме гораздо ниже, чем в клетках и тканях. К ним относятся: а) секретируемые ферменты; б) ферменты, связанные с клеточным метаболизмом. К секретируемым ферментам принадлежат липаза, а-амилаза, ЩФ. Эти ферменты секретируются определенными органами (поджелудочная железа, печень) и выводятся с мочой, желчью. В норме их активность в плазме относительно низка и постоянна. Однако при патологии, если блокирован любой из обычных путей экскреции, активность этих ферментов в плазме значительно увеличивается (например, повышение активности ЩФ в сыворотке крови при закупорке желчевыводящих путей).

Основная группа ферментов — это ферменты клеточного обмена, локализованные внутри клеток в цитоплазме и клеточных структурах; в сыворотке крови их активность низка или они вообще отсутствуют.

Основным принципом ферментной диагностики является выбор оптимального спектра ферментов, изменение активности которых характерно для патологии определенных органов или тканей. Спектр ферментов для диагностики заболеваний некоторых органов: сердце — КК, ЛДГ, АсАТ; скелетные мышцы — КК, АЛД; кости — ЩФ; кровь — ЛДГ₁, ЛДГ₃; поджелудочная железа — а-амилаза, липаза; предстательная железа — КФ; печень (желчные пути) — АлАТ, ГлДГ, ХЭ, ЩФ, 7-ГПТ. Очень высокая активность ферментов в крови может указывать на поражение определенного органа, например, очень высокая активность АлАТ указывает на поражение печени. Имеет значение и знание внутриклеточной локализации ферментов, особенно для контроля за течением болезни. Для ферментной диагностики важны также и сведения о соотношении активности ферментов, например, АсАТ к АлАТ или КК к АсАТ. Опре-

деление активности органоспецифических ферментов, т. е. ферментов, содержащихся только в одном органе, например сорбитолдегидрогеназа (печень), уруканиназа (печень), орнитилкарбамилтрансфераза (печень), не имеет большого диагностического значения. Количество таких ферментов ограничено, а активность их в сыворотке крови очень низкая или они вообще отсутствуют и не всегда определяются существующими методами. Более важно для диагностики определение изоферментов.

Фермент в целом, как правило, содержится в ряде органов, а отдельные изоферменты органоспецифичны. Особое значение в ферментной диагностике имеет знание пределов нормальных величин активности фермента, которые в значительной степени зависят от метода и условий определения. В энзимологии, как ни в какой другой области, существует большое количество единиц активности ферментов, несравнимых между собой, поэтому стандартизация единиц в клинической энзимологии — необходимое условие для получения диагностически значимых и сравнимых результатов лабораторных исследований.

Методические вопросы определения активности ферментов. Из-за низкой активности ферментов в биологических жидкостях, а также из-за трудности дифференциации различных ферментов химическим способом на практике, как правило, не применяется прямое химическое определение активности ферментов, а измеряется каталитический эффект ферментов путем измерения скорости реакции, при которой субстрат под действием фермента превращается в продукт реакции. Эта величина известна как «скорость реакции» и при определенных условиях прямо пропорциональна количеству присутствующего фермента.

Чтобы понять механизм ферментативной реакции, необходимо иметь представление о ее кинетике, т. е. о тех законах, которым подчиняется реакция, протекающая под действием фермента. Строгое математическое описание кинетики ферментативных реакций очень сложно. Классические кинетические реакции могут иметь различный порядок. Скорость реакции нулевого порядка зависит только от катализатора, а не от концентрации реагирующих веществ.

Скорость реакции первого порядка зависит от концентрации одного из реагирующих веществ. Реже встречаются реакции второго и третьего порядка, скорость которых зависит от двух или трех компонентов реакции соответственно. При высокой концентрации субстрата скорость ферментативной реакции практически не зависит от изменения концентрации субстрата. При этом в отношении субстрата реакция приобретает нулевой порядок, происходит насыщение фермента субстратом. При этих условиях скорость реакции зависит только от активности фермента.

Исследование эффекта насыщения привело L. Michaelis, M. Menten в 1913 г. к созданию общей теории кинетики ферментативных реакций, которой установлена зависимость между скоростью ферментативной реакции и концен-

трацией субстрата согласно уравнению Михаэлиса — Ментен. Константа Михаэлиса (К_м) характеризует степень сродства фермента с субстратом и представляет собой концентрацию субстрата, при которой скорость ферментативной реакции равна половине максимальной.

Основные требования, предъявляемые к ферментативной реакции. Активность фермента необходимо определять в условиях насыщения фермента субстратом; до конца измерения должна быть израсходована только небольшая часть субстрата; субстрат не должен содержать примесей, влияющих на определение.

Факторы, влияющие на активность ферментов. Температура, вид субстрата и его концентрация; вид буфера и его концентрация; рН; наличие активаторов и ингибиторов.

Ферментативная реакция чувствительна к изменению температуры. При повышении температуры энергия тепловых движения молекул увеличивается, в результате чего число молекул, способных достичь переходного состояния, т. е. подвергнуться действию фермента, возрастает, при дальнейшем повышении температуры может наступать инактивация ферментов. Температурный коэффициент скорости реакции равен приблизительно 10 % на 1 °С. Это значит, что при повышении температуры на 1 °С активность фермента увеличивается на 10 %. Однако при значительном повышении температуры скорость реакции снижается из-за денатурации белка.

В 1961 г. Международный биохимический союз рекомендовал измерять активность фермента при температуре 25 °С, в 1964 г. эти рекомендации были изменены на 30 °С. Международная согласованность температуры измерения активности ферментов является предпосылкой для международной стандартизации методов, так как при разной температуре оптимальные значения рН, концентрации буфера, субстрата и других параметров реакции различны.

Главное свойство ферментов, отличающее их от других катализаторов, — высокая специфичность; фермент вступает в реакцию только с определенным химическим веществом — субстратом. Некоторые ферменты обладают почти абсолютной специфичностью по отношению к данному субстрату. Так, ЛДГ специфична к L-лактату, глутаматдегидрогеназа — к L-глутамату. Специфичность других ферментов выражена не столь сильно — их действие простирается обычно на определенную группу веществ. К таким ферментам относятся фосфатазы, пептидазы.

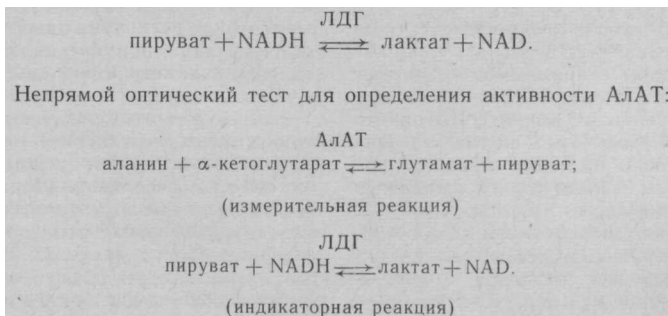
Для определения активности ферментов в ряде случаев применяют синтетические субстраты, так как иногда бывает трудно определить физиологический субстрат или продукты распада синтетического субстрата определить легче, чем физиологического. Как указано ранее, при определенной концентрации субстрата достигается максимальная скорость реакции. Рассчитать концентрацию субстрата, при которой достигается максимальная скорость реакции, можно теоретически, исходя из уравнения Михаэлиса — Ментен.

Для достижения максимальной скорости ферментативной реакции концентрация субстрата должна во много раз (50 и более) превышать константу Михаэлиса. На практике не используют слишком высокую концентрацию субстрата, так как субстрат или его продукт может тормозить активность фермента. Если для реакции взять концентрацию субстрата, в 10 раз превышающую константу Михаэлиса, то скорость реакции составит 90 % от максимальной, что достаточно для практических целей. Эмпирически также можно определить необходимую субстратную концентрацию по кривой изменения скорости реакции при увеличении концентрации субстрата. Вид буфера может оказывать значительное влияние на активность ферментов, особенно ЩФ. Все ферменты имеют оптимальную область pH действия. В качестве активаторов для многих ферментов могут служить органические и неорганические соединения. Например, активатором для КК являются сульфгидрильные соединения, для ЩФ — ионы магния. При определении активности ферментов чаще приходится иметь дело с ингибиторами. Ингибиторы ферментов могут находиться в исследуемом материале и в реактивах. В моче, например, много ингибиторов ЛДГ. Ионы тяжелых металлов органических и неорганических реактивов являются ингибиторами для большинства ферментов.

На практике для каждого фермента экспериментально должна подбираться концентрация субстрата, оптимум pH, вид буфера и его концентрация. Оптимизация условий определения активности ферментов повышает аналитическую надежность результатов исследования и их диагностическую информативность, поэтому определение активности ферментов предпочтитель-

нее проводить в оптимизированных условиях относительно концентрации субстрата, буфера, активаторов и величины pH.

Методы определения активности ферментов. Существует большое количество методических принципов определения активности ферментов, различающихся по технике исполнения, аналитическим качествам, способу измерения активности ферментов. По способу измерения различают: непрерывное кинетическое измерение, двухточечное измерение, измерение по конечной точке. Преимущество кинетического измерения состоит в возможности прямого непрерывного измерения скорости ферментативной реакции в начальной линейной части кривой при оптимизированной концентрации реактивов. С этой точки зрения наиболее точными и приемлемыми являются методы, основанные на оптическом тесте. Оптический тест был разработан Варбургом в 30-х годах. Принцип теста Варбурга основан на разнице поглощения при определенной длине волны (340 нм) восстановленной (NADH) и окисленной (NAD) форм никотинамидадениндинуклеотида. При длине волны 340 нм NADH имеет максимальную абсорбцию, тогда как NAD не имеет поглощения при данной длине волны. Качество реактива имеет большое значение для получения правильных результатов. Поэтому коэффициент молярной абсорбции рекомендуется проверять в лаборатории, он не должен быть ниже $5 \cdot 10^3 \text{ моль}^{-1} \cdot \text{м}^2$. Различают прямой и непрямой оптические тесты. Прямой оптический тест применяется для определения активности дегидрогеназ. Непрямой оптический тест включает, помимо измерительной, индикаторную и вспомогательную реакции. Например, прямой оптический тест для определения активности ЛДГ:



При непрямом оптическом тесте требуется введение в реакцию ферментов. Активность ферментов измеряют на спектрофотометре предпочтительно с термостатированной кюветой, а также на биохимических анализаторах, позволяющих измерять кинетику ферментативной реакции. К преимуществам методов, основанных на оптическом тесте, относятся возможность определения активности ферментов при оптимизированных условиях, в начальной линейной части кривой, при кинетике нулевого порядка. К фак-

торам, снижающим специфичность данных методов, относится влияние метаболитов эндогенного происхождения. В редоксиндикаторных методах NADH восстанавливает синий тетразолий или другие вещества с образованием окрашенных соединений. Промежуточным продуктом служит феназинметасульфат.

Флуориметрические методы определения активности ферментов более чувствительны, чем спектрофотометрические. Сравнительно новыми и еще более чувствительными являются хемилю-

Т а б л и ц а 39. Уменьшение активности ферментов в сыворотке крови при хранении [Bergmeyer H. U., 1983]

Ферменты	Температура хранения	
	20—25 °С	2—8 °С
Аланинаминотрансфераза	3 д* — 17 %	3 д — 10 %
Альдолоза	5 д — 15 %	5 д — 8 %
Аспартатамино- трансфераза	3 д — 10 %	3 д — 8 %
α -Амилаза	До 5 д	5 д — без снижения
Холинэстераза	» 7 д	7 д — без снижения
Глутаматдегидро- геназа	3 д — 15 %	3 д — 5 %
γ -Глутамилтран- спептидаза	До 7 д	7 д — без снижения
Креатинкиназа	24 ч — 2 %	7 д — 2 %
Креатинкиназа, МВ-фракция	1 ч < 10 %	24 ч < 10 %
Лактатдегидро- геназа	3 д — 2 %	3 д — 8 %
ЛДГ ₁	7 д — 5 %	7 д — 5 %
Лейцинаминопеп- тидаза	До 7 д	7 д — без снижения
Липаза	24 ч	5 д — без снижения
Щелочная фосфа- таза	7 д — 10 %	7 д — без снижения
Кислая фосфата- за	7 д — без снижения при стабилизации раствором NaHSO ₄ 5 мг/мл	

* д — день.

минесцентные методы с применением люциферин-люциферазной системы. Из перечисленных методов наиболее широкое клиническое применение находят спектрофотометрические методы. Оптический тест Варбурга лежит в основе методических принципов, заложенных в большинство выпускаемых коммерческих наборов реактивов.

Для определения активности ферментов применяют фотометрические методы, основанные на образовании окрашенных соединений с продуктами ферментативной реакции. Как правило, измерение проводят по конечной точке, что является недостатком методов этой группы, и точность их ниже, чем методов, основанных на оптическом тесте Варбурга. Исключение составляют методы, в которых в ходе реакции непосредственно из субстрата образуется окрашенное соединение.

Материал исследования. Наиболее часто активность ферментов определяют в сыворотке, плазме, моче, клетках крови. Для большинства ферментов не имеет принципиального значения, определяется ли активность фермента в плазме или сыворотке крови. Это имеет значение для тех ферментов, которые содержатся в тромбоцитах,

как, например, КФ, АДД, ЛДГ, так как при свертывании крови указанные ферменты будут освобождаться из тромбоцитов, поэтому активность ЛДГ, АДД в сыворотке крови будет выше, чем в плазме. Важно также знать содержание ферментов в эритроцитах. Те ферменты, которые содержатся в эритроцитах, при гемолизе попадают в сыворотку и активность их в сыворотке будет значительно выше. В табл. 39 представлены данные о стабильности ряда ферментов. Практически важен также вопрос о разведении сыворотки при высокой активности фермента. Для ряда ферментов (АСАТ, КК) известен эффект разведения, т. е. при разведении сыворотки 154 ммоль/л раствором NaCl активность фермента не снижается пропорционально разведению. Это объясняется различными причинами: концентрация белка в сыворотке может влиять на активность фермента во время инкубации; при разведении нарушается соотношение ингибиторов и активаторов, что также не дает ожидаемого результата от разведения, поэтому при определении активности ферментов предпочтительнее не разводить сыворотку, а уменьшать время инкубации.

Множественные формы ферментов. Множественность молекулярных форм ферментов может быть обусловлена различными причинами. Она может быть закодирована генетически, тогда такие множественные формы называют изоферментами, и может быть обусловлена гетерогенностью полипептидных цепей (например, ЛДГ), различием в аминокислотном составе фермента (например, для АСАТ). Множественность молекулярных форм — более широкое понятие, чем изоферменты, она может быть обусловлена различным строением небелковой части молекулы (например, ШФ), конформационной изомерией (например, МДГ) и другими факторами. Изоферментами обозначают группу ферментов из организма одного и того же биологического вида, обладающих одним типом субстратной специфичности, но отличающихся по физико-химическим и иммунологическим свойствам. Изоферменты отличаются друг от друга по кинетическим свойствам (отношение к ингибиторам, активаторам, сродство с субстратом). Для большинства ферментов установлено существование множественных форм. Важность изучения изоферментов для диагностики была впервые установлена в 1957 г. для ЛДГ. Изоферменты способны образовывать комплексы с иммуноглобулинами, липидами, липопротеинами и другими компонентами сыворотки, что может менять их электрофоретическую подвижность.

Методы определения изоферментов. К ним относятся электрофоретические методы на различных носителях, хроматографические, иммунологические; методы, основанные на определении субстратного оптимума изоферментов; термическое инактивирование; ингибирование различными веществами; методы, основанные на различном сродстве изоферментов к субстратам. Наиболее распространены электрофоретические методы определения изоферментов на различных носителях: бумаге, крахмальном геле, плен-

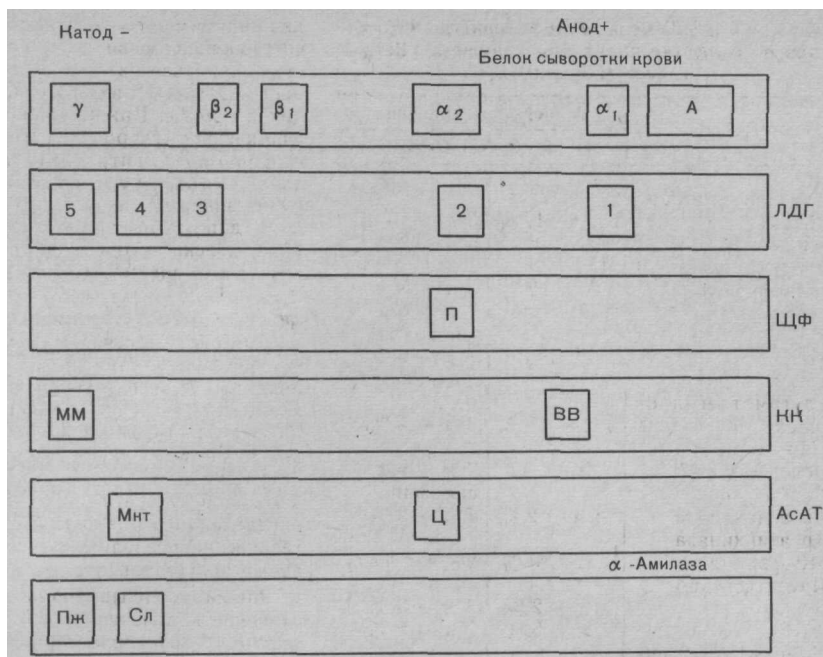


Рис. 8. Схема расположения некоторых изоферментов сыворотки крови при электрофорезе на бумаге или ацетатцеллюлозе.

1,2,3,4,5 — соответствующие изоферменты ЛДГ — ЛДГ₁, ЛДГ₂, ЛДГ₃, ЛДГ₄, ЛДГ₅; П — печеночный изофермент ЩФ; ММ — мышечный изофермент К.К; ВВ — мозговой изофермент К.К; Мнт — митохондриальный изофермент АсАТ; Ц — цитоплазматический изофермент АсАТ; Пж — поджелудочный изофермент α-амилазы; Сл — слюнный изофермент α-амилазы.

ках из ацетата целлюлозы, полиакриламидном геле (рис. 8). Хроматографические методы основаны на разной степени адсорбции изоферментов.

Иммунологическая дифференциация изоферментов предусматривает применение специфических антисывороток. Электрофореграммы различных ферментов представлены на рис. 8.

Стандартизация и унификация методов определения активности ферментов предусматривает выбор и оценку унифицированных методов для практической работы в клинко-диагностических лабораториях, разработку наиболее точных, референтных (эталонных) методов. Референтные методы предназначены для оценки аналитической надежности унифицированных методов, для оценки качества референтных и контрольных материалов, они также могут быть использованы для практической работы в клинко-диагностических лабораториях. Референтные методы для ферментов разрабатываются на основе: оптимизации параметров реакции, стандартизации условий измерения; установления необходимой степени чистоты реактивов и калибровочных материалов, требований к точности приборов; оценки аналитической надежности методов. Международной федерацией клинической химии (МФКХ) разработаны общие требования к измерению активности ферментов и референтные

методы для ряда ферментов, а также требования к референтным материалам для измерения активности ферментов¹. В рамках рабочей группы экспертов стран — членов СЭВ также разработаны правила определения активности ферментов.

Согласно разработанным рекомендациям номенклатура ферментов должна употребляться в соответствии с рекомендациями (1972) Комиссии Международного биохимического союза по номенклатуре и классификации ферментов (с дополнениями по 1975 г.); определение активности ферментов рекомендуется проводить в оптимизированных условиях с кинетическим измерением; предпочтительная температура измерения 30 °С, колебания ее не должны превышать ± 0,05 °С.

Активность ферментов выражается в моль/(с · л); мкмоль/(с · л); нмоль/(с · л). Международная единица (МЕ) — мкмоль/(мин · л) соответствует 16,67 нмоль/(с · л); единица, используемая в унифицированных методах — мкмоль/(ч · мл) соответствует 278 нмоль/(с · л).

¹ IFCC. Committee on Standards. Expert Panel on Enzymes, 1975, 1976, 1977, 1979. IFCC. Scientific Committee. Expert Panel on Enzymes, 1980, 1981.

Комиссия по величинам и единицам МФКХ и Международного союза теоретической и прикладной химии предложила именовать величину нмоль/(с · л) каталом. Поскольку присвоение производным единицам собственных наименований может производиться только в соответствии с решением Генеральной конференции по мерам и весам, то до такого решения наименование катал — неприемлемо.

Вопросами выбора методов определения активности ферментов успешно занимаются, помимо международных организаций, многие национальные комитеты. Созданы Комиссии по ферментам Американской ассоциации Клинической химии (США), Немецкого общества Клинической химии (ФРГ), Скандинавский комитет по ферментам, Английская рабочая группа по ферментам. Комиссии по ферментам работают в Австрии, Канаде, Франции, Италии, Японии.

Помимо выбора метода, важным направлением в деятельности вышеуказанных организаций является разработка референтных материалов для методов определения активности ферментов, определение их стабильности, чистоты и возможность их применения для проведения

межлабораторных экспериментов и проверки качества методов.

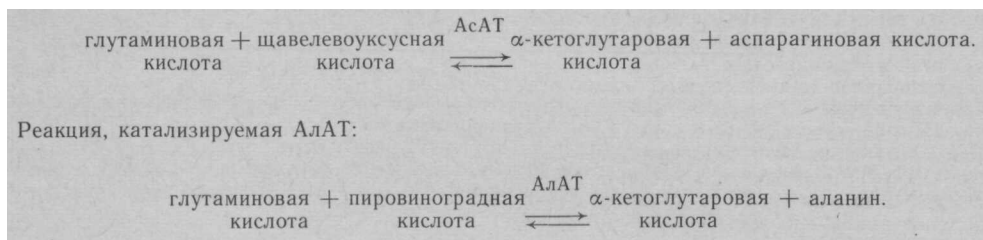
Л и т е р а т у р а . *Номенклатура ферментов.* Рекомендации (1972) Международного биохимического союза по номенклатуре и классификации ферментов, а также по единицам ферментов и символам кинетики ферментативных реакций.—М.: ВИНТИ, 1979.—320; Вилкинсон Д. (Wilkinson J. H.). Принципы и методы диагностической энзимологии/Пер. с англ.—М.: Медицина, 1981.—624 с.

5.2.2. Аминотрансферазы

Аспартаминотрансфераза — АсАТ (L-аспартат: 2-оксоглутарат аминотрансфераза; К. Ф. 2.6.1.1) катализирует обратимый перенос аминогрупп с L-аспарагиновой кислоты на α-кетоглутаровую.

Аланинаминотрансфераза — АлАТ (L-аланин: 2-оксоглутарат аминотрансфераза; К. Ф. 2.6.1.2) катализирует обратимый перенос аминогрупп с L-аланина на α-кетоглутаровую кислоту.

Реакция, катализируемая АсАТ:



Ферменты открыты советскими учеными А. Е. Браунштейном и М. Г. Крицман. АсАТ и АлАТ обнаружены во всех исследованных к настоящему времени тканях человека и животных. АсАТ состоит из изоферментов: цитоплазматического и митохондриального, каталитические свойства которых различны. Митохондриальная форма фермента имеет более высокие величины K_m для α-кетоглутарата и более низкие для L-аспартата.

Методы определения аминотрансфераз основаны главным образом на определении скорости образования пировиноградной и щавелевоуксусной кислот, так как нет простых способов определения L-аспарагиновой, α-кетоглутаровой кислот и L-аланина. Для определения активности АсАТ и АлАТ наиболее распространенными являются спектрофотометрические и колориметрические методы.

Первые спектрофотометрические методы, основанные на оптическом тесте, были предложены для АсАТ А. Карген в 1955 г., для АлАТ — F. Wroblewski, J. La Due в 1956 г. В последующем эти методы были модифицированы и оптимизированы.

Первый динитрофенилгидразиновый метод определения АсАТ и АлАТ описан N. H. Tongasi

с соавт. Наиболее распространенным динитрофенилгидразиновым методом является метод Райтмана — Френкеля (1956), в котором определяют окрашенные динитрофенилгидразоны щавелевоуксусной и пировиноградной кислот без экстракции их толуолом в отличие от метода Тонгази. Метод Бабсона, принцип которого основан на образовании щавелевоуксусной кислотой с солями диазония окрашенного продукта реакции, прост по исполнению, дает надежные результаты, но пригоден только для определения АсАТ. Методы определения глутаминовой кислоты с помощью бумажной хроматографии трудоемки и применяются главным образом в научных исследованиях. Манометрические методы трудоемки и не применяются в клинических лабораториях. Флуориметрические методы высокочувствительны и точны, но требуют специального оборудования. Методы с в-гидроксibenзальдегидом и ванилином не нашли применения из-за низкой специфичности.

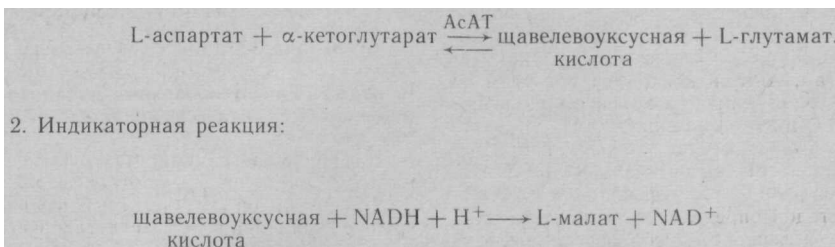
Оптимизация условий определения и унификации методов. В большинстве стран в качестве стандартного предлагаются методы, основанные на оптическом тесте. Различия в национальных рекомендациях по стандартизации методов касаются не принципа метода, а оптимизирован-

ных условий измерения. За исключением метода МФКХ, ни в одном стандартном методе не добавляется в инкубационную среду пиридоксаль-5-фосфат, являющийся коферментом для АсАТ и АЛАТ. Добавление его в инкубационную среду позволяет увеличить чувствительность метода. Степень активации зависит от многих факторов: вида буфера, концентрации субстрата, концентрации апофермента, содержания витамина В₆ в организме.

Советском Союзе в 1972 г. утвержден в качестве унифицированного модифицированный метод Райтмана — Френкеля. В качестве наиболее точных рекомендованы оптимизированные методы, основанные на оптическом тесте Варбурга.

АсАТ. Унифицированный метод по оптимизированному оптическому тесту. При и ц и и. Различие спектров поглощения окисленной и восстановленной форм NAD при 340 им.

1. Основная реакция:



Равновесие реакции сдвинуто вправо.

Реактивы. 1. Калия фосфат однозамещенный (KН₂РO₄) х. ч., ч. д. а. 2. Калия фосфат двузамещенный (K₂НРO₄ · 3Н₂O) ч.д.а. 3. L-Аспарагиновая кислота или L-аспарагиновой кислоты натриевая соль. 4. Фосфатный буфер 0,1 моль/л, рН 7,4; 0,16 г однозамещенного фосфата калия и 2,07 г двузамещенного фосфата калия трехводного растворяют в 40—60 мл воды, проверяют рН и доводят водой в мерной колбе до 100 мл. Стабилен при хранении в холодильнике. 5. Субстратно-буферный раствор 0,25 моль/л L-аспарагиновой кислоты в 0,1 моль/л фосфатном буфере рН 7,4; 3,30 г L-аспарагиновой кислоты (или 3,9 г натриевой соли L-аспарагиновой кислоты) растворяют в 40—50 мл 0,1 моль/л фосфатного буфера, проверяют рН и доводят фосфатным буфером в мерной колбе до 100 мл. Если применяют L-аспарагиновую кислоту, то к навеске перед растворением в фосфатном буфере для установления рН 7,4 добавляют «20—26 мл 1 моль/л раствора едкого натра и затем проверяют рН. Стабилен при хранении в холодильнике в течение месяца. 6. в-Никотинамидениндинуклеотид восстановленный, динатриевая соль, 15 ммоль/л; 16 мг NADH·Na₂·4Н₂O растворяют в 1,5 мл воды. Раствор стабилен в течение 2 нед при хранении в темной посуде в холодильнике. Коэффициент молярного поглощения не ниже 5,6 · 10² м² X X моль⁻¹ при 340 нм. 7. α-Кетоглутаровая кислота, 0,45 моль/л; 0,2 г α-кетоглутаровой кислоты растворяют в 2,5 мл воды и добавляют 0,5 мл 5 моль/л раствора едкого натра. Если используют динатриевую соль α-кетоглутаровой кислоты, то 0,26 г соли растворяют в 3 мл воды. Раствор стабилен в течение 2 нед при хранении в холодильнике. α-Кетоглутаровая кислота не должна содержать примесей пирувата и малата. 8. Малатдегидрогеназа из сердца свиньи (L-малат: NAD⁺ оксидоредуктаза; К. Ф. 1.1.1.37). Суспензия в 50 % растворе глицерина. Специ-

фическая каталитическая активность выше 17 ммоль/(с·л). Примеси: АсАТ < 0,01 %, ГлДГ < 0,003 %, ЛДГ < 0,01 %. Для приготовления рабочего раствора к 20 мкл суспензии добавляют 5 мл воды. 9. Лактатдегидрогеназа из скелетной мышцы кролика или свиньи. Суспензия в 50 % растворе глицерина. Специфическая каталитическая активность выше 8 ммоль/(с·л). Примеси: АсАТ < 0,01 %, ГлДГ < 0,003 %, АЛАТ < 0,01 %. Для приготовления рабочего раствора к 40 мкл суспензии добавляют 5 мл воды. Стабилен в течение 3 мес при хранении в холодильнике в хорошо закупоренной посуде. 10. Натр едкий, 5 моль/л; 1 моль/л. 11. Натрия хлорид, 154 ммоль/л (физиологический раствор).

Примечание. Для определения активности АсАТ и АЛАТ по оптическому тесту используют отечественные реактивы квалификации «х.ч.» или «ч.д.а.» или импортные, например, можно использовать реактивы фирмы «Reanal» (ВНР). Реактивы квалификации «ч.» непригодны. Все реактивы готовят на бидистиллированной воде, хранят при температуре от 0 до +4 °С. Уменьшение стабильности может наступить за счет роста микроорганизмов. Поэтому в растворы рекомендуется добавлять несколько капель хлороформа.

Специальное оборудование. Спектрофотометр с термостатированной кюветой. Измерение проводят при 340 нм.

Материал для исследования. Сыворотка крови или плазма, свободные от гемолиза.

Ход определения. Перед определением температура растворов и сыворотки должна быть доведена до температуры измерения. Перед работой можно готовить смесь реактивов, состоящую из субстратно-буферного расмтра.

раствора NADH, МДГ и ЛДГ в соотношении 60: 1 : 1 : 1. Определение проводят по следующей схеме.

В термостати- рованную кювету приливают	Опыт- ная проба, мл	Холо- стая проба, мл	Конечная кон- центрация ве- ществ в пробе
Субстратно- буферный раствор	3,0	3,0	Фосфатный бу- фер -80 ммоль/л L-Аспарагино- вая кислота — 200 ммоль/л 0,18 ммоль/л
NADH-раст- вор	0,05	0,05	
МДГ-суспен- зия	0,05	0,05	10000 нмоль/ /(с-л)
ЛДГ-суспен- зия	0,05	0,05	10000 нмоль/ /(с-л)
Сыворотка крови 154 ммоль/л раствор хлор- ида натрия	0,5 —	— 0,05	
Перемешивают и оставляют стоять на 10 мин при 30 или 37° С			
Раствор а-ке- тоглутаровой кислоты	0,1	0,1	12 ммоль/л

Перемешивают и через 60 с (лаг-фаза) изме-
ряют экстинкцию и одновременно включают
секундомер. Точно через 1, 2, 3 мин (или через
более короткие, но равные промежутки времени)
измеряют экстинкцию.

Поправку на холостой опыт проводят по
формуле:

$$\left(\frac{\Delta E}{\Delta t}\right)_{\text{оп}} - \left(\frac{\Delta E}{\Delta t}\right)_{\text{хол}} = \left(\frac{\Delta E}{\Delta t}\right)_{\text{скор}}$$

Скорректированную величину опытной про-
бы используют в дальнейших расчетах.

Расчет производят по формуле:
активность, моль/(с · м³) = нмоль/(с-л) · 10⁶ =

$$= \frac{V_{p.c}}{\varepsilon \cdot l \cdot V_{\text{сыв}}} \cdot \left(\frac{\Delta E}{\Delta t}\right)_{\text{скор}}$$

где V_f с.— объем реакционной смеси, мл;
 $V_{\text{сыв}}$ — объем сыворотки, мл; l — время реак-

ции, с; $\frac{\Delta E}{\Delta t}$ — изменение экстинкции за 1 с;

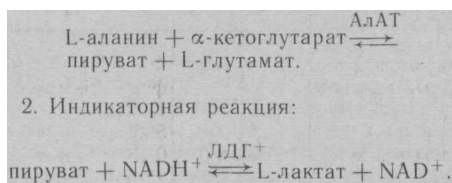
F — коэффициент молярной экстинкции (Л1)Н
кювете в метрах

Нормальные величины: от 30 до
420 нмоль/(с-л) ((от 2 до 25 МЕ) при 30 °С.

Примечание. Определение активности
фермента можно проводить по микрометоду.
Для этого перед работой готовят смесь ре-
активов, состоящую из субстратно-буферно-
го раствора, растворов NADH, ЛДГ, МДГ
в соотношении 60: 1 : 1 : 1. Опытная проба
включает смесь реактивов — 0,630 мл, сыво-
ротку — 0,10 мл, а-кетоглутаровую кисло-
ту — 0,02 мл. Холостую пробу ставят так
же, как опытную, но вместо сыворотки до-
бавляют 154 ммоль/л раствор хлорида натрия.
Определение проводят по той же схеме, что и
в макрометоде.

**АЛАТ. Унифицированный метод по оптими-
зированной оптической тесту. П р и н ц и и**
тот же, что для АсАТ.

1. Основная реакция:



Реактивы. 1. Калия фосфат однозаме-
щенный (K₂HPO₄) ч.д.а., х.ч. 2. Калия фосфат
двухзамещенный (K₂HPO₄ · 3H₂O) ч.д.а. 3. Фос-
фатный буфер, 0,1 моль/л, рН 7,4: 0,16 г одно-
замещенного фосфата калия и 2,07 г двухзаме-
щенного фосфата калия трехводного растворя-
ют в 40—60 мл воды, проверяют рН и доводят
водой в мерной колбе до 100 мл. Стабилен при
хранении в холодильнике. 4. L-а-Аланин. 5.
Субстратно-буферный раствор, 0,63 моль/л L-
аланина в 0,1 моль/л фосфатном буфере, рН 7,4:
5,62 г L-аланина растворяют в 80 мл 0,1 моль/л
фосфатного буфера, проверяют рН и доводят
фосфатным буфером в мерной колбе до 100 мл.
Стабилен в течение 2 мес при хранении в холо-
дильнике. 6. р-Никотинамидадениндинуклеотид
восстановленный, динатриевая соль, 15 ммоль/л
(коэффициент молярной экстинкции не ниже
5,6 · 10² м² · моль⁻¹ при 340 нм): 16 мг
NADH-Na₂-4H₂O растворяют в 1,5 мл воды.
Раствор стабилен в течение 2 нед при хранении
в темной посуде в холодильнике. 7. Натр едкий,
5 моль/л. 8. а-Кетоглутаровая кислота, 0,56 моль/л:
0,245 г а-кетоглутаровой кислоты растворяют
в 2,5 мл воды и добавляют 0,5 мл 5 моль/л
раствора едкого натра. Если используют ди-
натриевую соль а-кетоглутаровой кислоты, то
0,318 г соли растворяют в 3 мл воды. Раствор
стабилен в течение 2 нед при хранении в холо-
дильнике. 9. Лактатдегидрогеназа из скелетной
мышцы кролика или свиньи, суспензия в 50 %
растворе глицерина. Специфическая каталити-
ческая активность выше 8 ммоль/(с · л). При-
меси: АсАТ < 0,01 %, ГлДГ < 0,003 %, АЛАТ < 0,01 %. Для приготовления рабочей)
раствора к 45 мкл суспензии добавляют 5 мл

воды. Стабилен в течение 3 мес при хранении в холодильнике. 10. Натрия хлорид, 154 ммоль/л (физиологический раствор). Все реактивы лучше готовить на бидистиллированной воде.

Специальное оборудование то же, что для АсАТ.

Материал исследования. Свежая сыворотка или плазма крови, свободные от гемолита. Фермент стабилен при 4 °С в течение суток.

Ход определения. Перед определением температура растворов и сыворотки должна быть доведена до температуры измерения. Перед работой можно готовить смесь реактивов, состоящую из субстратно-буферного раствора, раствора NADH и ЛДГ в соотношении 60 : 1 : 1. Определение проводят по следующей схеме.

В термостатированную кювету приливают	Опытная проба, мл	Холодная проба, мл	Конечная концентрация веществ в пробе
Субстратно-буферный раствор	3,0	3,0	Фосфатный буфер — 80 ммоль/л L-Аланин — 500 ммоль/л
NADH-раствор	0,05	0,05	0,18 ммоль/л
ЛДГ	0,1	0,1	20 000 нмоль/(с·л)
Сыворотка крови 154 ммоль/л раствор хлорида натрия	0,5	—	
	—	0,5	

Перемешивают и оставляют стоять на 10 мин при 30 или 37 °С

Раствор а-кетоглутаровой кислоты	0,1	0,1	15 ммоль/л
----------------------------------	-----	-----	------------

Перемешивают, через 60 с (лаг-фаза) измеряют экстинкцию и одновременно включают секундомер. Точно через 1, 2, 3 мин (или через более короткие, но равные промежутки времени) измеряют экстинкцию. Измерение опытной и холостой проб проводят против воды при 340 нм в кювете с толщиной слоя 1 см.

Поправку на холостой опыт проводят по формуле:

$$\left(\frac{\Delta E}{\Delta t}\right)_{\text{оп}} - \left(\frac{\Delta E}{\Delta t}\right)_{\text{хол}} = \left(\frac{\Delta E}{\Delta t}\right)_{\text{скор}}$$

Скорректированную величину опытной пробы используют в дальнейших расчетах.

Расчет производят по формуле:

$$\text{активность, моль}/(\text{с} \cdot \text{м}^3) = \text{нмоль}/(\text{с} \cdot \text{л}) \cdot 10^6 = \frac{V}{\varepsilon \cdot l \cdot V} \cdot \left(\frac{\Delta E}{\Delta t}\right)_{\text{скор}}$$

Условные обозначения те же, что для определения АсАТ.

Нормальные величины: от 30 до 420 нмоль/(с · л) [(от 2 до 25 МЕ)] при 30 °С.

Примечание. Определение активности фермента можно проводить по микрометоду. Для этого перед работой готовят смесь реактивов, состоящую из субстратно-буферного раствора, растворов NADH и ЛДГ в соотношении 60 : 1 : 2. Опытная проба включает: смесь реактивов — 0,630 мл; сыворотку — 0,10 мл; а-кетоглутаровую кислоту — 0,02 мл. Определение проводят по той же схеме, что и в макрометоду.

Оценка аналитической надежности методов. Коэффициенты вариации 2—6 %. При использовании реактивов, свободных от ингибиторов, и точного спектрофотометра метод дает правильные результаты. Реакции для АсАТ и АлАТ линейны до величины активности 4000 нмоль/(с · л).

Литература. Делекторская Л. Н. В. кн.: Унификация лабораторных методов исследования / Под ред. В. В. Меньшикова.— М., 1978, вып. VIII, с. 83—89; Bergmeyer // U. (Hrsg.) Methoden der enzymatischen Analyse. Weinheim/Verlag Chemie, 1974, Bd 1, S. 769—775, 785—792; Karmen A. J. Clin. Invest., 1955, vol. 34, p. 131; Wroblewski F., La Due J. S. Proc. Soc. exp. biol. Med., 1956, vol. 91, p. 569—571.

Унифицированный динитрофенилгидразиновый метод Райтмана — Френкеля. Принцип. В результате переаминирования, происходящего под действием АсАТ и АлАТ, образуются щавелевоуксусная и пировиноградная кислоты. При добавлении 2,4-динитрофенилгидразина в щелочной среде образуются окрашенные гидразоны пировиноградной и щавелевоуксусной кислот.

Реактивы. 1. Натрия фосфат двузамещенный (Na₂HPO₄), 0,1 моль/л: 14,2 г Na₂HPO₄ доводят до 1 л водой. 2. Калия фосфат однозамещенный, 0,1 моль/л: 13,60 г KN₂PO₄ доводят до 1 л водой. 3. 0,1 моль/л фосфатный буфер pH 7,4: смешивают 840 мл 0,1 моль/л раствора Na₂HPO₄ и 160 мл 0,1 моль/л раствора KN₂PO₄. Полученный раствор с индикатором бромтимоловым синим должен давать голубую окраску. Величину pH буфера доводят под контролем pH-метра. К приготовленному раствору в качестве консерванта можно добавить 5—10 мл хлороформа. 4. Натр едкий, 0,05 моль/л; 1 моль/л. 5. Бромтимоловый синий, 0,04 % раствор: 100 мг индикатора растирают в ступке с 3,2 мл 0,05 моль/л раствора едкого натра. После растворения смывают водой в мерную колбу вместимостью 250 мл и доводят водой до метки. 6. DL-Аспарагиновая кислота или L.-аспарагиновая кислота*. 7. DL-Аланин или L-аланин*. 8. а-

* Если берется вместо DL-аспарагиновой кислоты L-аспарагиновая, а вместо DL-аланина L-аланин, то навеска уменьшается вдвое.

Кетоглутаровая кислота. 9. Субстратный раствор для определения АсАТ: 29,2 мг а-кетоглутаровой кислоты и 2,66 г DL-аспарагиновой кислоты растворяют в 1 моль/л растворе едкого натра. Едкий натр следует прибавлять осторожно, небольшими порциями, до полного растворения составных частей и до получения рН 7,4. Раствор переливают количественно в мерную колбу вместимостью 100 мл, ополаскивая 0,1 моль/л фосфатным буфером рН 7,4. Доливают буфер в колбу до метки, тщательно перемешивают, прибавляют 1 каплю хлороформа и сохраняют в холодильнике в замороженном виде. Перед употреблением замороженный раствор должен полностью оттаять (повторное оттаивание не рекомендуется). 10. Субстратный раствор для определения АлАТ: 29,2 мг а-кетоглутаровой кислоты и 1,78 г DL-аланина отвешивают на аналитических весах. Дальнейшая работа проводится так же, как для субстратного раствора АсАТ. 11. HCl 1 моль/л. 12. Раствор 2,4-динитрофенилгидразина: 19,8 мг 2,4-динитрофенилгидразина растворяют в небольшом количестве 1 моль/л раствора HCl при нагревании на водяной бане. После охлаждения доводят объем HCl до 100 мл. На следующий день реактив фильтруют. Раствор стабилен при хранении в холодильнике в посуде из темного стекла. 13. Натр едкий, 0,4 моль/л, свободный от карбонатов. Бутыли с реактивом и водой закрывают пробками с оплотнительными трубками, наполненными натральной известью. 14. Пировинограднокислый натрий. Для приготовления калибровочного раствора 11 мг кристаллического пирувата натрия (белого цвета) растворяют в небольшом количестве воды, переносят в мерную колбу вместимостью 100 мл и доводят объем раствора до метки водой; 1 мл раствора содержит 110 мкг пирувата натрия, что соответствует 88 мкг (или 1 мкмоль) пировиноградной кислоты.

Материал для исследования. Сыворотка крови, свободная от гемолиза.

Ход определения АсАТ. Опытная проба: в пробирку вносят 0,5 мл субстратного раствора для определения АсАТ, нагревают при 37 °С в течение 5 мин, добавляют 0,1 мл сыворотки и инкубируют при 37 °С 30 мин. Затем добавляют 0,5 мл раствора 2,4-динитрофенилгидразина и выдерживают в течение 20 мин при комнатной температуре. Добавляют 5 мл 0,4 моль/л раствора едкого натра, тщательно перемешивают и оставляют для развития окраски на 10 мин при комнатной температуре. Измеряют на ФЭКе при длине волны 500–560 нм (зеленый светофильтр) в кювете с толщиной слоя 1 см против холостой пробы.

Холостую пробу ставят так же, как опытную, но сыворотку добавляют после инкубации.

Ход определения АлАТ. В пробирку вносят 0,5 мл субстратного раствора АлАТ и нагревают при 37 °С в течение 5 мин. Затем вносят 0,1 мл сыворотки и инкубируют при 37 °С 30 мин. Дальнейший ход анализа осуществляют так же, как и при определении АсАТ,

Расчет активности ферментов в сыворотке крови производят по калибровочному графику. Построение калибровочного графика: из калибровочного раствора готовят ряд разведений, как указано ниже.

№ пробирки	Калибровочный раствор пирувата натрия, мл	Ди-стиллиро-ванная мл	Пировино-градная кислота		Активность фермента, нмоль/(с-л) АсАт, АлАТ
			мкг	мкм.л.п.ь	
1	0,05	0,55	4,4	0,05	278
2	0,1	0,5	8,8	0,1	556
3	0,15	0,45	13,2	0,15	834
4	0,2	0,4	17,6	0,2	1112
5	0,25	0,35	22,0	0,25	1390

Калибровочные пробы ставят так же, как опытные, но вместо сыворотки добавляют разведенные калибровочные растворы. Измеряют против холостой пробы, в которую вместо калибровочных растворов добавляют воду. Калибровочная кривая линейна до величины экстинкции 0,3.

Нормальные величины: для АсАТ, АлАТ 28–190 нмоль/(с-л) [0,1–0,68 мкмоль/(ч-мл)] при 37 °С.

Оценка аналитической надежности метода. Воспроизводимость: коэффициенты вариации составляют 2–6 % в зависимости от условий определения. Правильность метода зависит в значительной степени от правильного построения калибровочной кривой и правильной постановки холостой пробы. Специфичность: абсорбционная способность гидразона шавелевоуксусной и пировиноградной кислот выше, чем гидразона а-кетоглутаровой кислоты при 500 нм. Интерференция: ацетилсалициловая кислота (аспирин), барбитураты, пенициллин, опиаты завышают результаты во всех методах.

Литература. *Reltman S., Frankel S.* Amer. J. Clin. Pathol., 1957, vol. 28, p. 56.

Клиническое значение. Несмотря на отсутствие органной специфичности, определение АсАТ и АлАТ при заболеваниях печени и сердца имеет большую диагностическую ценность. При инфаркте миокарда активность АсАТ в сыворотке крови повышена: активность возрастает через 4–6 ч после инфаркта миокарда и снижается до нормы на 3–7-й день.

Особенно важное значение имеет определение аминотрансфераз для раннего выявления гепатита. Острый гепатит сопровождается резким повышением АлАТ; АсАТ при этом также повышена, но обычно ниже активности АлАТ. Активность АлАТ начинает увеличиваться уже в продромальной стадии, когда другие признаки болезни еще не появились. Коэффициент Де Ритиса АсАТ/АлАТ < 1. При тяжелом поражении печени соотношение активности ферментов меняется.

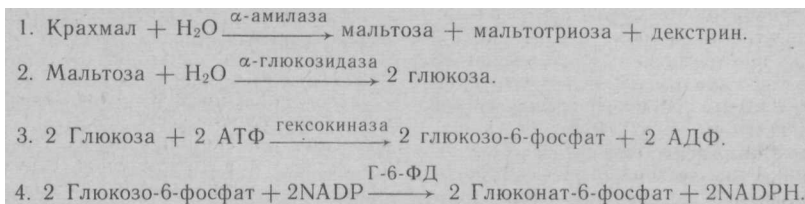
5.2.3. а-Амилаза

а-Амилаза (1,4-а-D-глюкан глюканогидролаза, К. Ф. 3.2.1.1) — один из первых открытых ферментов; катализирует эндогидролиз а-1,4-глюкозидных связей крахмала, гликогена и родственных им полисахаридов до мальтозы, декстринов и других полимеров. У человека а-амилаза секретируется поджелудочной и слюнными железами, небольшая ее активность обнаруживается в тканях печени и скелетной мускулатуры. Молекулярная масса а-амилазы относительно низкая (~ 48000); в отличие от большинства ферментов она фильтруется в клубочках почек и содержится в моче. а-Амилаза состоит из двух изоферментов: панкреатического (Р-тип) и слюнного (S-тип), каждый из которых делится на несколько фракций. Изоферменты происходят соответственно из поджелудочной и слюнной желез. Существует также макроамилаза, которая не выделяется почками из-за большой величины молекулы, но может встречаться в сыворотке крови в норме и при патологии. У здоровых людей в сыворотке крови около 70 % амилитической активности приходится на слюнный изофермент, в моче приблизительно такой же процент приходится на панкреатическую изоамилазу. Два изофермента а-амилазы имеют почти идентичные ката-

литические и иммунологические свойства, незначительно отличаются по электрофоретической подвижности, но разделяются при гель-фильтрации на ДЭАЭ-сефадексе.

Методы определения а-амилазы в биологических жидкостях основаны на различных принципах: сахарифицирующие или редуктометрические методы — на определении образующихся из крахмала Сахаров (метод Энгельгардта — Герчука, 1925); амилотластические — на определении остатка нерасщепленного крахмала по степени интенсивности его окраски с йодом (методы Самоги, Смита — РОЭ, Каравая). Амилотластические методы более чувствительны и специфичны, чем редуктометрические, но также не лишены недостатков: точность их во многом зависит от качества крахмала и оптимизации условий определения.

Вискозиметрические методы основаны на измерении вязкости суспензии крахмала. Они не отличаются высокой точностью и редко применяются. Методы с применением хромогенных субстратов основаны на использовании комплексов субстрат-краситель, которые под действием а-амилазы распадаются с образованием водорастворимого красителя. К новым методам определения активности а-амилазы относятся методы, основанные на сопряженных ферментных реакциях.



Наиболее перспективными являются фотометрические методы с применением субстратов — п-нитрофенилмальтозида или п-нитрофенилмальтогептозида.

Зарубежными фирмами выпускаются наборы реактивов с применением хромогенных субстратов; реже наборы реактивов, основанные на сопряженных ферментных реакциях. Для определения изоферментов а-амилазы наиболее точными являются электрофоретические методы.

Оптимизация условий определения и унификация методов. В качестве субстрата в методах определения а-амилазы чаще всего применяют крахмал. Крахмал-полисахарид, состоящий на 10—20% из амилозы, имеющей 1,4-глюкозидные связи и растворимой в воде, и амилопектина, нерастворимого в воде, имеющего, кроме того, 1,6-глюкозидные связи. Содержание амилозы в различных препаратах крахмала варьирует, поэтому качество крахмала имеет большое значение. Предпочтительнее использовать крахмал, обладающий лучшей растворимостью и дающий наивысшую интенсивность окраски с йодом. В качестве субстрата мшгут

быть использованы также амилоза, мальтотриоза. Оптимум pH действия фермента находится в пределах значений от 6,5 до 7,5. Активность фермента значительно возрастает в присутствии ионов хлора. В молекулу а-амилазы входит атом кальция. Ионы кальция не только активизируют а-амилазу, но и предохраняют ее от потери активности и распада под влиянием протеолитических ферментов.

Ингибирование активности а-амилазы фторидами, цитратом, оксалатом и ЭДТА объясняется связыванием ионов кальция. Вид буфера не влияет на активность фермента. В большинстве стран применяются в качестве стандартных амилотластические методы. В СССР в 1972 и 1974 г. утверждены в качестве унифицированных два амилотластических метода: Смита — Роя и Каравая.

Унифицированный амилотластический метод со стойким крахмальным субстратом (Каравая). Принцип а-Амилаза гидролизует расщепление крахмала с образованием конечных продуктов, не дающих цветной реакции с йодом. Об активности а-амилазы судят по уменьшению интенсивности окраски.

Реактивы. 1. Бензойная кислота ч.д.а. или х.ч. 2. Натрия фосфат двузамещенный безводный (Na_2HPO_4) ч.д.а. 3. Крахмал растворимый для нефелометрии или крахмал по Lintner. Крахмал по Lintner выпускается зарубежными фирмами специально для использования его в качестве субстрата при определении α -амилазы. 4. Натрия хлорид, 0,154 моль/л. 5. Субстратно-буферный раствор рН 7,0: 13,3 г Na_2HPO_4 и 2 г бензойной кислоты растворяют в 250 мл 0,154 моль/л хлорида натрия и доводят до кипения. Суспендируют 0,2 г растворимого крахмала в небольшом количестве холодной воды и вводят в кипящий буферный раствор. Кипятят 1 мин, охлаждают и доводят водой до 500 мл. Стабилен при хранении при комнатной температуре в течение 10–12 дней. Субстратно-буферный раствор должен быть прозрачным. 6. Калия йодид ч.д.а., х.ч. 7. Калий йодноватокислый ч.д.а., х.ч. 8. Калия фторид ч.д.а. 9. HCl концентрированная, х.ч. 10. 0,01 н. раствор йода: 0,036 г йодноватокислого калия и 0,45 г йодида калия растворяют в 40 мл воды и медленно при помешивании добавляют 0,09 мл концентрированной HCl . 5 г фторида калия растворяют в 50 мл воды, фильтруют в мерную колбу, приливают 40 мл раствора йода и доливают водой до 100 мл. Хранят в посуде из темного стекла. Годен в течение месяца. Если в рабочий раствор йода не добавляют фторид калия, то его следует готовить ежедневно.

Материал для исследования. Свежая сыворотка или плазма крови, моча или дуоденальное содержимое, предварительно разведенное 154 ммоль/л раствором хлорида натрия в 100 раз.

Ход определения. Микровариант. Опытная проба: 0,5 мл субстратно-буферного раствора помещают в пробирку, нагревают 5 мин при 37 °С, добавляют 0,01 мл биологической жидкости. Инкубируют 7,5 мин при 37 °С. Время инкубации следует строго отсчитывать по секундомеру с момента добавления биологической жидкости в крахмальный субстрат. Тотчас же после инкубации добавляют 0,5 мл 0,1 н. раствора йода и доводят объем водой до 5 мл. Измеряют на ФЭКе в кювете с толщиной слоя 1 см при длине волны 630–690 нм (красный светофильтр) против воды.

Холостую пробу ставят так же, как опытную, биологическую жидкость добавляют после инкубации вместе с 0,1 н. раствором йода. Измеряют при тех же условиях, что и опытную пробу, против воды.

Макровариант. Ход определения опытной и холодной проб тот же, что и при микроварианте, но объем всех реактивов и исследуемой жидкости увеличивают в 5–10 раз.

Расчет. Активность α -амилазы выражают в миллиграммах или граммах крахмала, гидролизованного 1 л биологической жидкости за 1 с инкубации при 37 °С. Расчет производят по формуле:

активность α -амилазы, $\text{мг}/(\text{с} \cdot \text{л}) =$

$$= \frac{E_1 - E_2}{E_1} \cdot C \cdot t \cdot K,$$

где E_1 — экстинкция холодной пробы; E_2 — экстинкция опытной пробы; C — количество крахмала, введенного в опытную и холодную пробы (0,2 мг в микроварианте); / — коэффициент пересчета на 1 с инкубации; K — коэффициент пересчета на 1 л биологической жидкости с учетом разведения.

Нормальные величины. Сыворотка крови: 3,3–8,9 $\text{мг}/(\text{с} \cdot \text{л})$, или 12–32 $\text{мг}/(\text{ч} \cdot \text{мл})$. Моча: до 44 $\text{мг}/(\text{с} \cdot \text{л})$, или до 120 $\text{мг}/(\text{ч} \cdot \text{мл})$. Дуоденальное содержимое: 1,7–4,4 $\text{г}/(\text{с} \cdot \text{л})$, или 6–16 $\text{г}/(\text{ч} \cdot \text{мл})$. Коэффициент пересчета в единицы СИ — $\text{мг}/(\text{с} \cdot \text{л})$ — равен 0,278.

Воспроизводимость. Коэффициент вариации 5–10 %. Линейность реакции сохраняется в течение 10 мин.

Литература. Caraway W. T. Ateг. J. din. Pathol., 1959, vol. 32, p.97.

Клиническое значение. Гиперамилаземия и гиперамилазурия наблюдаются при многих заболеваниях, но наиболее выражены при остром панкреатите, при котором активность увеличивается в основном (до 90 % и более) за счет панкреатического изофермента. При данном заболевании наибольший подъем содержания амилазы в крови и моче отмечен в первые 1–3 сут. Гиперамилазурию панкреатического происхождения вызывают также такие заболевания, как вирусный гепатит, рак поджелудочной железы. К гиперамилаземии непанкреатического происхождения относят поражение слюнных желез, почечную недостаточность. Причинами повышения α -амилазы в крови являются нарушение секреции желез, содержащих α -амилазу, недостаточность выделения почками амилазы из организма. Имеется ряд заболеваний, при которых трудно объяснить наличие гиперамилаземии: холецистит, перитонит, ожог, острый аппендицит.

Гиперамилаземию вызывают многие фармакологические вещества — кортикостероидные препараты, силицилаты, тетрациклин, фуросемид, гистамин. Для α -амилазы крови характерны широкие внутри- и межиндивидуальные вариации. Наиболее информативным с диагностической точки зрения является определение панкреатической изоамилазы.

5.2.4. γ -Глутамилтрансфераза

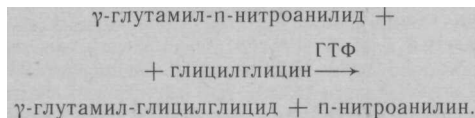
γ -Глутамилтрансфераза [(5-глутамил)-пептид: аминокислота 5-глутамилтрансфераза, γ -глутамилтранспептидаза; К.Ф. 2.3.2.2] открыта в 1950 г.; выделена и очищена в 1963 г. Фермент катализирует реакцию переноса γ -глутамилового остатка глутамиловой кислоты на акцепторный пептид или на L-аминокислоту. γ -ГТФ содержится почти во всех органах человека, наибольшая удельная активность определяется в ткани почек. Фермент не является гомогенным, в зависимости от вида патологии количество фракций может меняться.

Методы определения активности γ -ГТФ различаются по используемому субстрату. В первых методах применялись физиологические суб-

страты, например глутатион. Методы этой группы трудоемки, малочувствительны и имеют лишь историческое значение. Позднее стали применяться методы, в которых использовались следующие субстраты: L-у-глутамилнафтиламид; L-у-глутамил-п-нитроанилид (методы Орловского и др.); L-у-глутамиланилид (метод Гольдберга и др.). Наиболее распространены методы с применением в качестве субстрата B-у-глутамил-п-нитроанилида. Позднее был описан более быстрорастворимый субстрат — производное B-у-глутамил-п-нитроанилида — B-у-глутамил-3-карбоксит-4-нитроанилид. Данный субстрат используется в наборах реактивов фирмы «Boehringer Mannheim» (ФРГ). В качестве буферов могут применяться трис-буфер, глицилглициновый, 2-амино-2-метил-1,3-пропандиоловый. Вид буфера почти не оказывает влияния на активность фермента. Преимущество глицилглицинового буфера состоит в том, что он одновременно является и буфером, и акцептором у-глутамилового остатка.

В СССР в 1979 г. в качестве унифицированного утвержден метод с субстратом L-у-глутамил-п-нитроанилидом и глицилглициновым буфером.

Унифицированный метод с субстратом L-у-глутамил-п-нитроанилидом. Принцип. у-ГТФ катализирует реакцию переноса L-у-глутамилового остатка с L-у-глутамил-п-нитроанилида на глицилглицин. Количество освобожденного в ходе реакции п-нитроанилина измеряется и служит мерой активности у-глутамилтрансферазы:



Р е а к т и в ы . 1. L-у-Глутамил-п-нитроанилид. 2. Натрия хлорид ч.д.а., х.ч. 3. Глицилглицин, 0,55 моль/л, рН 8,3 : 3,63 г глицилглицина помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, доливают до метки водой и растворяют (буферный раствор). 4. Субстратно-буферный раствор: в пробирку наливают 10 мл воды и добавляют 0,028 г L-у-глутамил-п-нитроанилида и 0,082 г хлорида натрия и, не переставая мешать, растворяют содержимое пробирки на кипящей водяной бане в течение 60 с. Затем раствор охлаждают до 37 °С и добавляют 2,5 мл буферного раствора. Приготовленный раствор субстрата во время работы хранят в водяной бане при 37 °С. Неиспользованный раствор субстрата можно хранить в холодильнике в течение недели. Субстрат плохо растворим и при комнатной температуре выпадает в осадок. Поэтому перед употреблением выкристаллизовавшийся субстрат растворяют нагреванием в кипящей водяной бане. Нагревание и растворение субстрата можно повторить не более 2 раз. 5. Уксусная кислота ледяная ч.д.а., х.ч., раствор 100 г/л: 10 мл кислоты доводят водой до 100 мл. 6. Основной калибровочный раствор п-нитроанилина: 0,0829 г п-нитроанилина помещают

в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят до метки водой и растворяют. Для определения активности у-ГТФ можно пользоваться набором реактивов «Лаксма» (ЧССР).

М а т е р и а л для исследования. Сыворотка или плазма крови. Гемолиз не влияет на активность фермента.

Х о д определения. Опытная проба: в пробирку вносят 0,5 мл раствора субстрата и помещают в водяную баню при температуре 37 °С, приливают 0,05 мл сыворотки крови; содержимое перемешивают и инкубируют точно 15 мин при 37 °С. Затем прибавляют 3 мл раствора уксусной кислоты и перемешивают. Холостую пробу ставят так же, как опытную, но сыворотку добавляют после инкубации. Измеряют на спектрофотометре при длине волны 410 нм или на ФЭКе при длине волны 400—500 нм (фиолетовый или синий светофильтр) в кювете с толщиной слоя 1 см против холодной пробы. Окраска стабильна в течение нескольких часов.

Р а с ч е т активности производят по калибровочной кривой. Построение калибровочной кривой: из основного калибровочного раствора готовят рабочие растворы, как указано ниже.

№ калибровочного раствора	Калибровочный раствор п-нитроанилина, мл	Дистиллированная вода, мл	Активность у-ГТФ, нмоль/(с·л)
1	0,25	3,75	417
2	0,50	3,50	833
3	1,00	3,00	1 667
4	1,00	1,00	3334
5	1,50	0,50	5001
6	2,00	—	6668

В каждую из 6 пробирок наливают по 0,05 мл рабочих калибровочных растворов № 1—6, прибавляют по 3,5 мл раствора уксусной кислоты, перемешивают и измеряют экстинкцию против раствора уксусной кислоты при тех же условиях, что и опытную пробу. По полученным значениям экстинкции строят калибровочную кривую. Линейность калибровочного графика сохраняется до активности 5000 нмоль/(с·л).

Н о р м а л ь н ы е величины. Мужчины: 250—1767 нмоль/(с·л), или 15—106 МЕ; женщины: 167—10 нмоль/(с·л), или 10—66 МЕ при 37 °С.

В о с п р о и з в о д и м о с т ь . Коэффициенты вариации 1—4 %.

С п е ц и ф и ч н о с т ь . Расщепление у-глутамиловых пептидов другими пептидами неизвестно.

Л и т е р а т у р а . Инструкция к набору реактивов Био-Ла-Тест для определения активности у-глутамилтранспептидазы в сыворотке крови, «Лаксма» ЧССР.

К л и н и ч е с к о е значение. Несмотря на высокую активность у-ГТФ в почках, опре-

деление активности фермента в сыворотке крови проводят преимущественно для диагностики заболевания печени и желчных путей. Повышение активности у-ГТФ наблюдается при заболеваниях желчных путей с явлениями обтурации, при гепатитах, опухолях и метастазах в печень. Активность у-ГТФ в сыворотке крови увеличивается, как правило, параллельно увеличению активности щелочной фосфатазы, но активность у-ГТФ увеличивается раньше, держится на повышенных цифрах более длительное время и относительное увеличение активности фермента в несколько раз выше, чем щелочной фосфатазы.

Наркотики, седативные средства, этанол индуцируют активность у-ГТФ печени. Поэтому у-ГТФ является чувствительным тестом для диагностики алкогольно-токсических заболеваний печени. Исследование изоферментов у-ГТФ не имеет большого диагностического значения. При острых панкреатитах активность фермента повышена незначительно.

5.2.5. Глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа

Глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа (d-глюкозо-6-фосфат: NADP 1-оксидоредуктаза; К.Ф. 1.1.1.49) впервые была изолирована Варбургом из эритроцитов. Наибольшая активность фермента определяется в эритроцитах, менее богаты Г-6-ФДГ печень, поджелудочная железа, почки, легкие.

Методы определения. Применяют оптический тест, а также качественные методы, основанные на восстановлении NADP и 2,6-дихлорфенолиндофенола в присутствии феназина метасульфата; оптимум pH фермента между 7,4 и 8,6. Определение активности фермента можно проводить в фосфатном, триэтаноламиновом, глицилглициновом буферах и трис-буфере. Ионы магния активируют фермент. Описанный ниже метод утвержден в качестве унифицированного в 1974 г. Активность фермента определяют в эритроцитах.

Проба Бернштейна (унифицированный метод). Принцип. Глюкозо-6-фосфат в присутствии Г-6-ФДГ эритроцитов и NADP окисляется с образованием NADPH. NADPH восстанавливает феназин метасульфат, который в свою очередь восстанавливает 2,6-дихлорфенолиндофенол. Феназина метасульфат действует в этой реакции как активный переносчик электронов от NADP к краске.

Реактивы. 1. Никотинамидадениндинуклеотидфосфат (NADP). 5,75 мг NADP растворяют в 2,5 мл воды. Раствор стабилен в течение 4 нед при хранении в холодильнике. 2. D-Глюкозо-6-фосфорной кислоты динатриевая соль: 38 мг глюкозо-6-фосфата растворяют в 2,5 мл воды. В продаже чаще имеется бариевая соль глюкозо-6-фосфата; перевод ее в динатриевую соль осуществляется следующим образом: 60 мг бариевой соли глюкозо-6-фосфата растворяют в 1 мл воды, добавляют 0,2 мл насыщенного раствора сульфата натрия, центрифугируют. Отбирают весь надосадочный слой и прибавляют к нему 1,3 мл воды. Раствор исполь-

зуют для определения активности фермента. Хранят в холодильнике. 3. Феназина метасульфат, 0,02 г/л. Раствор нестабилен, готовят перед употреблением. 4. HCl, 1 моль/л. 5. Трис-буфер, 0,74 моль/л, pH 8,0: 44,8 г трис-(оксиметил)-аминометана растворяют в 200 мл воды, прибавляют 1 моль/л раствор HCl до получения pH 8,0 и доводят водой до 500 мл. Хранят в холодильнике. 6. Раствор 2,6-дихлорфенолиндофенолята натрия в трис-буфере. К 5,8 мг 2,6-дихлорфенолиндофенолята натрия прибавляют 40 мл 0,7 моль/л трис-буфера pH 8,0. Хранят в холодильнике. 7. Смесь реактивов, состоящая из 1 части раствора NADP, 1 части раствора глюкозо-6-фосфата, 2 частей раствора феназина метасульфата, 16 частей раствора 2,6-дихлорфенолиндофенолята натрия. Смесь реактивов нестабильна, готовят перед употреблением.

Ход определения. Опытная проба: в пробирку наливают 1 мл воды, добавляют 0,02 мл крови и после наступления полного гемолиза (через 6–10 мин) прибавляют 0,5 мл смеси реактивов. При проведении массовых исследований прибавление смеси может быть проведено одновременно в 35–40 пробах. Время от момента взятия крови до прибавления реактивов не должно превышать 45 мин. Через 30 мин производят оценку результатов.

Контрольную пробу ставят так же, как опытную, для исследования берут кровь практически здорового человека.

Оценка результатов. При отрицательной реакции (в норме) происходит полное обесцвечивание краски; при сомнительной — явное обесцвечивание, но по сравнению с контрольной пробой остается зеленоватый оттенок; при положительной реакции обесцвечивания краски не происходит или происходит очень незначительно.

Примечания. 1. При работе в экспедиционных условиях заранее готовят навески реактивов в зависимости от количества исследований, запланированных на один раз. 2. Сомнительные реакции не должны приниматься в расчет при массовом обследовании населения; плохо вымытая пробирка может имитировать сомнительную реакцию. При массовых обследованиях имеют значение резко положительные и положительные реакции. 3. Сомнительные реакции следует принимать во внимание и проверять активность фермента количественным методом у женщин с подозрением на гемолитическую анемию, обусловленную дефицитом активности фермента, особенно после приема лекарств, вызывающих гемолитические кризы у этих больных.

Литература. Идельсон Л. И., Котоман Э. Р. Лаб. дело, 1970, № 7, с. 428; Bernstein R. E. Nature, 1962, vol. 194, p. 192.

Клиническое значение. Дефицит активности Г-6-ФД эритроцитов относится к наиболее распространенным наследственным аномалиям; наследуется дефицит Г-6-ФД доминантно, клинически проявляется как гемолити-

ческая анемия. При массовых обследованиях населения на выявление дефицита Г-6-ФД учитываются резко положительные и положительные результаты анализов.

5.2.6. Креатинкиназа

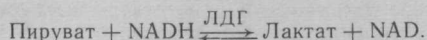
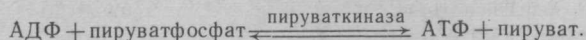
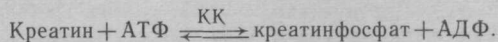
Креатинкиназа (КК) (АТФ: креатин М-фосфотрансфераза; К.Ф. 2.7.3.2) катализирует

обратимую реакцию фосфорилирования креатина.

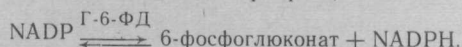
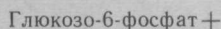
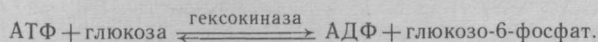
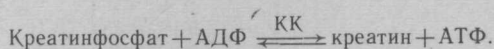
КК человека состоит из двух субъединиц — М, В, которые образуют три формы изоферментов. ММ-фракция — мышечный тип; МВ-фракция — сердечный тип и ВВ-фракция — мозговой тип.

Методы определения активности КК используют оба направления катализируемой реакции с определением образующихся соединений.

Прямая реакция:



В обратной реакции с использованием креатинфосфата в качестве субстрата реакция протекает по следующему уравнению:



Образующийся в данной реакции креатин может быть определен фотометрически по реакции с а-нафтолом, флуорометрически — по реакции с нингидрином, а также может быть использован как субстрат в непрямом оптическом тесте.

Реакция с субстратом креатинфосфатом более чувствительна, чем с креатином, и ее используют чаще для определения активности КК.

Методы, основанные на оптическом тесте, точные, однако без готовых наборов реактивов постановка их трудоемка и требует наличия чистых кристаллических ферментов. Более простыми являются фотометрические методы, основанные на определении неорганического фосфора, освобожденного в результате гидролиза креатинфосфата. Большинство коммерческих наборов реактивов основано на оптическом тесте. Результаты, получаемые с помощью наборов реактивов, выпускаемых различными фирмами, как правило, не дают сопоставимых результатов исследования, что связано с различными условиями определения.

Оптимизация условий определения и унификация методов. В большинстве стран в качестве стандартного предложен метод, основанный на оптическом тесте по обратной реакции. Однако национальные различия касаются вида буфера, активатора, концентрации реактивов, температуры определения. На активность фермента в значительной степени влияют используемые в качестве активаторов различные тиоловые соединения. В качестве унифицированного в нашей стране принят метод по определению фосфора.

Унифицированный метод с использованием креатина в качестве субстрата. Принцип. Активность фермента пропорциональна количеству неорганического фосфора, образующегося в результате кислотного гидролиза синтезированного ферментом креатинфосфата. Неорганический фосфор определяется по цветной реакции с молибдатом аммония.

Р е а к т и в ы. 1. Аденозин-5 -трифосфорной кислоты динатриевая соль. 2. L-Цистеин, 0,024 моль/л; 2,9 г растворяют в 1 мл воды. Готовят раствор перед употреблением. На одну пробу требуется 0,1 мл. 3. Креатин. 4. Магния сульфат 7-водный, ч.д.а. 5. Аммоний молибденовокислый 4-водный х.ч., 0,02 моль/л; 2,5 г молибденовокислого аммония растворяют в мерной колбе в 70—80 мл воды и доводят объем до 100 мл водой. 6. Натрия сульфат безводный ч.д.а. 7. Натрий сернистокислый пиро (метабисульфит натрия) ч.д.а. 8. 1-Амино-2-нафтол-4-сульфоуксусная (эйконоген) ч.д.а. 9. Серная кислота, 2,5 моль/л. 10. HCl, 0,1 моль/л. 11. Трис-(оксиметил)-аминометан (трис), ч.д.а. 12. Трис-буфер, 0,133 моль/л, pH 9,0; 1,61 г трис растворяют в мерной колбе до вместимостью 100 мл в 50—60 мл воды, устанавливают pH буфера 0,1 моль/л раствором HCl и доводят водой до метки. 13. Раствор эйконогена: 15,36 г пироксернистокислого натрия, 0,512 г сернистокислого натрия и 0,128 г эйконогена растворяют в 70—80 мл воды, взбалтывают, доводят объем водой в мерной колбе до 100 мл и дважды фильтруют (через 2 ч и через сутки после приготовления). Раствор следует беречь от яркого света; в случае выпадения осадка вновь фильтруют. Стабилен в течение 1 мес при хра-

нении в холодильнике. 14. Основная смесь реактивов, содержащая 0,02 моль/л сульфата магния, 0,033 моль/л креатина и 0,0067 моль/л АТФ: 0,4920 г сульфата магния, 0,4326 г креатина и 0,3692 г АТФ растворяют в 70—80 мл трис-буфера (для полного растворения креатина смесь нагревают в течение 5—10 мин на водяной бане при 40—45 °С). Затем объем основной смеси реактивов доводят трис-буфером в мерной колбе до 100 мл. 15. Трихлоруксусная кислота ч.д.а., 4,9 моль/л: 80 г ТХУ растворяют в 50—60 мл воды и объем раствора доводят в мерной колбе до 100 мл. 16. Смесь растворов для проведения кислотного гидролиза креатинфосфата. Смесь готовят перед употреблением, учитывая, что на одну пробу расходуют 2 мл. Смесь состоит из 0,25 мл раствора молибдено-вокислого аммония, 0,25 мл раствора серной кислоты и 1,5 мл воды (соотношение 1:1:6). 17. Калия фосфат однозамещенный безводный х.ч. (для приготовления калибровочного раствора): 0,0169 г K_2HPO_4 растворяют в воде и объем раствора доводят в мерной колбе до 100 мл.

Специальное оборудование. Фотоэлектродколориметр.

Материал для исследования. Свежая сыворотка или плазма крови. При хранении в холодильнике и при комнатной температуре активность фермента падает.

Ход определения. Предварительно все растворы реактивов прогревают в течение 5 мин при 37 °С. Опытная проба: в пробирку вносят 1,5 мл основной смеси реактивов, 0,1 мл раствора цистеина и 0,4 мл сыворотки крови. Содержимое пробирки осторожно перемешивают и ставят в термостат при 37 °С на 30 мин. Затем прибавляют 0,2 мл раствора трихлоруксусной кислоты, перемешивают стеклянной палочкой и центрифугируют при 3000 об/мин в течение 5 мин. Холостую пробу ставят так же, как опытную, но сыворотку добавляют после прибавления раствора трихлоруксусной кислоты. Из опытной и холодной проб забирают по 1 мл надсадочной жидкости и переносят в химические пробирки (маркированные соответствующим образом), в которых содержится по 2 мл смеси растворов для проведения специфического гидролиза креатинфосфата. Полученную смесь растворов перемешивают и оставляют при комнатной температуре на 30 мин (время гидролиза креатинфосфата). После этого в пробы добавляют с интервалом 1 мин по 0,25 мл раствора эйконогена и точно через 15 мин опытную пробу измеряют против холодной пробы при длине волны 600—700 нм (красный светофильтр) в кювете с толщиной слоя 0,5 см.

Расчет производят по калибровочному графику. Построение калибровочного графика; готовят калибровочные пробы, как указано ниже.

Из каждого калибровочного раствора берут по 0,4 мл и обрабатывают, как опытные пробы. В холодную пробу вместо калибровочных растворов берут по 0,4 мл воды.

Нормальные величины: до 100 нмоль/л(с · л), или до 6 МЕ.

Активность изоферментов КК в сыворотке крови у здоровых лиц колеблется в значитель-

№ пробирки	Калибровочный раствор,	Дистиллированная вода, мл	Количество фосфора в пробе, мкг	Активность КК, нмоль/(с · л)
1	1,0	14,4	1	45
2	1,0	7,7	2	90
3	1,0	5,13	3	135
4	1,0	2,85	4	180
5	1,0	2,08	5	225

ных пределах, и точных данных установить не удалось. Активность ММ-фракции составляет более 90 %, а КК МВ — менее 2 % от общей активности КК.

Примечание. Если активность КК превышает 500 нмоль/(с · л), то время инкубации сокращают до 15 или 10 мин; полученные величины активности умножают соответственно на 2 или 3. Разбавлять сыворотку не рекомендуется, так как активность фермента при разведении сыворотки изменяется непропорционально.

Воспроизводимость. Коэффициент вариации составляет в среднем 10 %.

Литература. Ертанов И. Д., Борисенко Л. М., Делекторская Л. Н. В кн.: Унификация лабораторных методов исследования / Под ред. В. В. Меньшикова. — М., 1980, с. 16—28; Левин Ф. Б., Березов Т. Т., Куширенко Е. А. Лаб. дело, 1973, № 4, с. 229—231; Kuby S., Noda L., Lardy H. A. J. Biol. Chem., 1954, vol. 209, p. 191.

Метод с использованием креатинфосфата в качестве субстрата. Принцип. Активность фермента пропорциональна количеству креатина, образующегося в результате ферментативной реакции. Креатин определяется по цветной реакции с а-нафтолом.

Реактивы. 1. Трис-(оксиметил)-аминометан (трис) х.ч. 2. Магния сульфат ч.д.а., х.ч. 3. Трис-буфер, 0,1 моль/л, рН 7,4, содержащий 0,015 моль/л Mg^{2+} (в виде MgSO_4): 1,21 г триса и 0,180 г MgSO_4 помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл и доливают водой до метки. Раствор стабилен в течение месяца при хранении в холодильнике. 4. Креатинфосфат, натриевая соль, 0,012 моль/л, рН 7,4: растворяют 0,044 г креатинфосфата в 10 мл воды. Раствор стабилен в течение недели при хранении в холодильнике. 5. Аденозин-5-дифосфорной кислоты натриевая соль, 0,004 моль/л, рН 7,4: 0,017 г аденозиндифосфата натрия (мол. м. 449) растворяют в 10 мл воды. Раствор стабилен в течение недели при хранении в холодильнике. 6. Бария гидроокись 8-водная ч.д.а. или х.ч., 50 г/л: 5 г безводной гидроокиси бария или 8 г 8-водной гидроокиси бария помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл и доливают до метки водой, не содержащей

СО₂. 7. Цинка сульфат ч.д.а., х.ч., раствор 50 г/л: 5 г сульфата цинка помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл и доводят до метки водой, не содержащей СО₂. 8. а-Нафтол (1-нафтол) ч.д.а. 9. Натрия карбонат ч.д.а. 10. Натрия гидроокись ч.д.а. 11. Раствор а-нифтола 10 г/л: 1 г а-нафтола, 16 г карбоната натрия и 6 г гидроокиси натрия помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл и доводят до метки водой. Раствор готовят не ранее чем за 2 ч до использования. 12. Основной раствор диацетила в этиловом спирте: 0,2 мл диацетила растворяют в 20 мл этилового спирта. 13. Рабочий раствор диацетила 0,5 г/л: к 1 мл основного раствора приливают 20 мл воды. Раствор хранят в холодильнике. 14. Основной калибровочный раствор креатина: 0,131 г креатина помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл и доливают водой до метки. 15. Рабочий калибровочный раствор креатина, 150 мкмоль/л: 1,5 мл основного раствора креатина помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл и доводят водой до метки. Раствор хранят в холодильнике.

Специальное оборудование. Спектрофотометр или фотоэлектроколориметр.

Ход определения. Опытная проба: 0,3 мл буфера, 0,3 мл раствора креатинфосфата, 0,1 мл сыворотки нагревают 5 мин при 37 °С. Добавляют 0,3 мл раствора аденозиндифосфата натрия и инкубируют 30 мин при 37 °С. После инкубации добавляют по 0,5 мл растворов гидроокиси бария и сульфата цинка, центрифугируют 15 мин при 3000—4000 об/мин. К 1 мл центрифугата добавляют 1 мл воды, 1 мл раствора а-нафтола, 0,5 мл раствора диацетила. Для развития окраски пробу помещают в термостат на 30 мин. Измеряют при 520 нм (зеленый светофильтр). Холостую пробу ставят так же, как опытную, но вместо раствора аденозиндифосфата натрия добавляют воду.

Калибровочная проба. 0,3 мл буфера, 0,3 мл раствора аденозиндифосфата, 0,4 мл рабочего раствора креатина обрабатывают так же, как опытную пробу. Измеряют против холостой пробы. Холостую пробу ставят, как опытную, но вместо креатина берут воду.

Расчет производят по формуле:

$$\text{активность КК} = \frac{E_{\text{оп}} - E_{\text{хол}}}{E_{\text{к}} - E_{\text{хол}}} \times$$

$$X \text{ 333 нмоль/(с} \cdot \text{л)},$$

где $E_{\text{оп}}$ — экстинкция опытной пробы; $E_{\text{хол}}$ — экстинкция холостой пробы; $E_{\text{к}}$ — экстинкция калибровочной пробы; 333 — коэффициент пересчета на наномоли креатинфосфата, преформированного 1 л сыворотки за 1 с.

Нормальные величины: от 0 до 220 нмоль/(с · л), или от 0 до 13 МЕ.

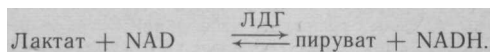
Литература. Токарская З. Б. Лаб. дело, 1971, № 1, с. 24—27; Ennor A. H., Rosenberg H. Biochem. J., 1954, vol. 57, p. 203.

Клиническое значение. В сыворотке крови повышенная активность КК может быть следствием повреждения сердечной или

скелетной мускулатуры. К поражениям сердечной мышцы, которые могут вызвать повышение активности фермента, помимо инфаркта, относятся миокардиты, сердечная недостаточность, сердечные аритмии. При этом активность КК может увеличиться в 20—30 раз по сравнению с нормой. При поражении скелетной мускулатуры уровень активности фермента достигает значительно более высоких цифр. При инфаркте миокарда, как правило, подъем активности КК наступает через 4—8 ч, максимальная активность наблюдается через 16—36 ч и нормальный уровень устанавливается к 3—6-му дню. Повышение активности КК может быть вызвано и рядом других причин — употреблением алкоголя, отравлением снотворными средствами, внутривенным введением ряда лекарственных веществ. МВ-фракция КК является высокоспецифичной для сердечной мышцы, активность ее повышается, как правило, при инфаркте миокарда.

5.2.7. Лактатдегидрогеназа, изоферменты лактатдегидрогеназы

Лактатдегидрогеназа — ЛДГ (L-лактат: NAD-оксидоредуктаза: К.Ф. 1.1.1.27) — гликолитический фермент, открытый Мейергофом в 1918 г., катализирует обратимую реакцию восстановления пировиноградной кислоты в молочную.



В кристаллическом виде впервые получена в 1943 г. ЛДГ состоит из 5 изоферментов, представляющих собой различные комбинации двух типов (М и Н) полипептидных цепей. Изофермент, преобладающий в мышечной ткани, состоит из 4 идентичных М-цепей и его обозначают M_4 (ЛДГ₄); преобладающий в ткани сердца, содержит 4 идентичные Н-цепи, и его обозначают как H_4 ((ЛДГ)). Остальные три изофермента представляют собой различные сочетания М- и Н-цепей, а именно M_3N , M_2N_2 , MN_3 .

ЛДГ: наиболее быстро продвигается к аноду, термостабилен, адсорбируется на ДЕАЕ-сефадексе, тормозится высокой концентрацией пирувата, незначительно инактивируется при действии мочевины и шавелевоуксусной кислоты и обладает одинаковой активностью при применении а-кетобутирата и пирувата в качестве субстрата.

ЛДГ₆ при электрофорезе продвигается медленнее других фракций, термолабилен, почти полностью инактивируется при действии мочевины и шавелевоуксусной кислоты и обладает незначительной активностью при применении а-кетобутирата в качестве субстрата. ЛДГ₂, ЛДГ₃, ЛДГ₄ обладают промежуточными свойствами. При использовании в качестве субстрата а-кетобутирата определяется а-гидроокисбутиратдегидрогеназа, являющаяся не самостоя-

тельным ферментом, а фракцией ЛДГ, ориентировочно соответствующая ЛДГ].

Методы определения. Наиболее аналитически надежными для определения общей ЛДГ являются спектрофотометрические методы, основанные на прямом оптическом тесте Варбурга с использованием в качестве субстрата как L-лактата, так и пирувата. Колориметрические динитрофенилгидразиновые методы более доступные, но менее точные. Редоксиндикаторные методы основаны на превращении бесцветной окисленной формы тетразолиевых солей в окрашенную восстановленную форму за счет окисления NADH.

Для определения изоферментов ЛДГ наиболее распространенными являются электрофоретические методы. Хроматографические методы основаны на разной степени адсорбции изоферментов ЛДГ на сефадексе. Возможно определение изоферментов ЛДГ по выбору оптимальной концентрации субстрата для каждого изофермента. Наиболее простыми и быстро выполняемыми методами определения изоферментов являются методы, основанные на различном отношении ЛДГ₁ и ЛДГ₅ к температуре и действию мочевины.

В методе, основанном на термической инактивации изоферментов ЛДГ, сыворотку, смешанную с буфером, инкубируют при 56; 60; 65 °С 30 мин. Затем определяют активность ЛДГ в неинкубированной и инкубированной сыворотках и рассчитывают процент падения активности при инкубации при различной температуре. Сыворотка крови здоровых людей за 30 мин при 56 °С теряет около 30 % своей активности, при 65 °С — около 80%. При заболеваниях печени при 56 °С сыворотка теряет активность до 50 % и при 65 °С — до 90 %. При сердечных поражениях инактивация при 56 °С дает потерю активности до 10 % и при 65 °С — около 60 %.

Определение изоферментов ЛДГ по ингибированию мочевиной основано на свойстве мочевины как ингибитора. Мочевина тормозит ЛДГ₅ почти на 100 %. В большинстве случаев определяется процент стабильной к мочеvine фракции от общей ЛДГ, который при заболеваниях печени обычно составляет около 20 %. В норме мочевиностабильная фракция составляет около 30% (20—36%). Однако указанные методы недостаточно аналитически надежны.

Оптимизация условий измерения и унификация методов. Вид буфера почти не оказывает влияния на активность фермента при определении общей ЛДГ. Оптимальный pH равен 7,2—7,5. Точные оптимальные концентрации реактивов и оптимума pH зависят от состава изоферментов ЛДГ. В большинстве стран в качестве стандартных предложены методы, основанные на оптическом тесте, различия касаются условий определения. В нашей стране в 1974 г. утвержден в качестве унифицированного колориметрический динитрофенилгидразиновый метод.

Унифицированный метод по оптимизированному оптическому тесту. Принцип и п. Различно спектров поглощения окисленной и восстановленной форм NAD при 340 нм.

Реактивы. 1. Калия фосфат однозаме-

щенный (KH₂PO₄) ч.д.а., х.ч. 2. Калия фосфат двузамещенный 3-водный (K₂HPO₄ · 3H₂O) ч.д.а. 3. Натрия пируват; содержание основного вещества не менее 99 %. 4. б-Никотинамидениндинуклеотид восстановленный, динатриевая соль. Коэффициент молярного поглощения не ниже 5,6 · 10² моль⁻¹ · м² при 340 нм. 5. Фосфатный буфер 0,1 моль/л, pH 7,4, с раствором NADH 0,165 ммоль/л и раствором пирувата натрия 0,00103 моль/л; 0,16 г однозамещенного фосфата калия, 2,07 г двузамещенного фосфата калия, 0,0117 г NADH и 0,0114 г пирувата натрия растворяют в 40—60 мл 0,1 моль/л фосфатном буфере, доводят pH и доливают водой в мерной колбе до 100 мл. Стабилен в течение суток при хранении в холодильнике и 8 ч при хранении при комнатной температуре. 6. Натрия хлорид, 154 ммоль/л.

Специальное оборудование. 1. Спектрофотометр с термостатированной кюветой для микроизмерений. 2. Полуавтоматические пипетки.

Материал для исследования. Свежая сыворотка, свободная от гемолиза.

Ход определения. Перед определением температура растворов и сыворотки должна быть доведена до температуры измерения. Определение проводят по следующей схеме.

В термостатированную кювету (30 °С) приливают	Опытная проба, мкл	Конечные концентрации веществ в пробе
Буфер с NADH и пируватом	650	1. Фосфатный буфер, 0,1 моль/л 2. NADH, 0,16 ммоль/л 3. Пируват, 1 ммоль/л
Сыворотка	20	

Перемешивают, тотчас измеряют экстинкцию и одновременно включают секундомер. Точно через 1 и 2 мин (или через более короткие промежутки времени) измеряют экстинкцию. Измерение опытной пробы проводят против воды при 340 нм в кювете с толщиной слоя жидкости 1 см. Расчет производят по формуле:

$$\text{активность, моль/(с} \cdot \text{м}^3) = \text{нмоль/(с} \cdot \text{л)} \cdot 10^6 =$$

$$= \frac{V_{p.c}}{\varepsilon \cdot l \cdot V_{c_{свб}}} \cdot \left(\frac{\Delta E}{\Delta t} \right),$$

где $V_{p.c}$ — объем реакционной смеси; $K_{свб}$ — объем сыворотки; t — время реакции; $\frac{\Delta E}{\Delta t}$ —

изменение экстинкции за секунду; ε — коэффициент молярной экстинкции NADH, моль⁻¹ · м²; l — толщина слоя жидкости в кювете, м (1x10⁻²).

Нормальные величины: до 3200 нмоль/(с · л), или до 195 МЕ, при 25 °С. До 5330 нмоль/(с · л), или до 320 МЕ при 30 °С.

Воспроизводимость. Коэффициенты вариации составляют 5–6 %.

Литература. *Bergmeyer H. U.* (Hrsg.) *Methoden der enzymatischen Analyse*. Bd. 1.—Weinheim: Verlag Chemie, 1974, S. 607–612.

Унифицированный метод по реакции с 2,4-динитрофенилгидразином (Севела — Товарека). Принцип. L-Лактат под действием фермента сыворотки в присутствии NAD окисляется в пируват, который определяется по цветной реакции с 2,4-динитрофенилгидразином.

Реактивы. 1. Молочная кислота 80% ч.д.а., х.ч. 2. Натрия гидроокись ч.д.а., х.ч., растворы 2 моль/л; 0,4 моль/л. 3. 0,45 моль/л раствор лактата натрия. В мерную колбу вместимостью 100 мл вносят 5 мл 80% молочной кислоты, добавляют 2 моль/л раствора едкого натра до получения pH 7,5 и доводят объем водой до метки. Хранят в посуде из темного стекла в холодильнике. 4. Натрия фосфат пиро ($\text{Na}_2\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$) ч.д.а. 5. HCl 1 моль/л. 6. Натрия пирофосфат 0,03 моль/л, pH 8,8. 6,69 г натрия пирофосфата растворяют в небольшом количестве воды, добавляют 1 моль/л раствор HCl до получения pH 8,8 и доводят объем водой до 500 мл. Стабилен в течение месяца при хранении в холодильнике. 7. NAD окисленная форма. Готовят из расчета 3 мг NAD на 1 мл воды. Раствор стабилен в течение 4 нед при хранении в холодильнике. 8. Раствор 2,4-динитрофенилгидразина: 19,8 мг 2,4-динитрофенилгидразина растворяют в небольшом количестве 1 моль/л раствора HCl при нагревании на водяной бане. После охлаждения доводят объем 1 моль/л раствором HCl до 100 мл. На следующий день реактив фильтруют. Раствор хранят в посуде из темного стекла. Стабилен в течение 1 года. 9. Пируват натрия (для построения калибровочной кривой): 11 мг кристаллического пирувата натрия растворяют в небольшом количестве бидистиллированной воды, переносят в мерную колбу вместимостью 100 мл и доводят водой объем раствора до метки; 1 мл раствора содержит 88 мкг пировиноградной кислоты. Рабочий раствор готовят разведением основного раствора в 10 раз бидистиллированной водой; 1 мл рабочего раствора содержит 8,8 мкг пировиноградной кислоты.

Ход определения. Опытная проба: 0,1 мл сыворотки, разведенной 1 : 2, смешивают с 0,3 мл раствора NAD, прогревают 5 мин при 37 °С. Затем добавляют 0,8 мл 0,03 моль/л раствора пирофосфата натрия и 0,2 мл 0,45 моль/л раствора лактата натрия, предварительно прогретых при 37 °С, и инкубируют смесь при 37 °С в течение 15 мин. Тотчас после инкубации добавляют 0,5 мл раствора 2,4-динитрофенилгидразина, выдерживают 20 мин при комнатной температуре. Затем добавляют 5 мл 0,4 моль/л раствора едкого натра, перемешивают и через 10 мин измеряют на ФЭКе в кювете с толщиной слоя 1 см при длине волны 500–560 нм (зеленый светофильтр) против холостой пробы. Холостую пробу ставят, как опытную, но сыворотку добавляют после инкубации.

Расчет активности производят по калибровочному графику.

Построение калибровочного графика: из рабочего калибровочного раствора пирувата натрия готовят ряд разведений, как указано в таблице. Затем в пробирки приливают по 0,5 мл раствора 2,4-динитрофенилгидразина. Далее калибровочные пробы обрабатывают и измеряют, как опытные. Холостую пробу ставят так же, как калибровочную, но вместо калибровочного раствора добавляют воду.

№ пробирки	Рабочий калибровочный раствор пирувата натрия, мл	0,03 моль/л раствора пирофосфата натрия, мл	Бидистиллированная вода, мл	Содержание пировиноградной кислоты в калибровочной пробе		Активность ЛДГ, нмоль/(с · л)
				мкг	мкмоль	
1	0,1	0,8	0,5	0,88	0,01	334
2	0,2	0,8	0,4	1,76	0,02	668
3	0,4	0,8	0,2	3,52	0,04	1 336
4	0,6	0,8	—	5,28	0,06	2 004
5	0,8	0,6	—	7,04	0,08	2 672

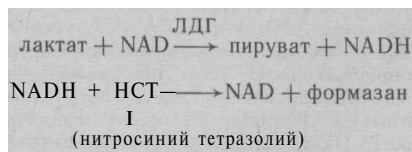
Линейная зависимость между концентрацией пировиноградной кислоты и оптической плотностью сохраняется от 0 до 3000 нмоль/(с · л).

Нормальные величины: 220–1100 нмоль/(с · л), или 0,8–4,0 мкмоль/(ч · мл) при 37 °С.

Воспроизводимость. Коэффициент вариации около 10 %.

Литература. *Seuela M., Tovarek J.* *Cas. Lek Cesk.*, 1959, vol. 98, N 27, p. 844.

Электрофоретическое разделение изоферментов ЛДГ на пленках из ацетата целлюлозы. Принцип. Изоферменты ЛДГ разделяются путем электрофореза на пленке из ацетата целлюлозы при pH 8,6. Затем пленка инкубируется на слое геля, содержащего субстратную смесь; при этом места расположения полос изоферментов окрашиваются в синий цвет формазаном в результате следующей реакции:



Оптимум pH инкубационной среды лежит в области 8,0–8,3. Реакция ускоряется в присутствии фенозина метасульфата.

Реактивы. 1. Буфер для электрофореза: а) 1,84 г 5,5-диэтилбарбитуровой кислоты (веронала) и 10,3 г натриевой соли 5,5-диэтилбарбитуровой кислоты (мединала) растворяют в 1 л воды, pH 8,6; б) 3,025 г трис-(оксиметил)-аминометана растворяют в 700 мл воды в мерной

колбе, концентрированной HCl, доводят до pH 8,6 и доливают водой до метки. Растворы «а» и «б» смешивают в равных пропорциях. 2. Буфер для приготовления агара: 24,2 г трис-(оксиметил)-аминометана растворяют в 700 мл воды, доводят pH до 8,3 прибавлением концентрированной HCl и доливают водой до метки. 3. Буфер для растворения субстратной смеси, pH 8,3: 2,42 г трис-(оксиметил)-аминометана и 1,41 г однозамещенного фосфата калия (KH₂PO₄) растворяют в 100 мл воды, pH 8,3. 4. Агар Дифко. 5. Лития лактат ч.д.а., х.ч. 6. Тетразоловый п-нитросиний (нитросиний тетразолий, НСТ) ч.д.а. 7. Метилфеназоний метасульфат (феназина метасульфат ФМС) ч. 8. Никотинамидадениндинуклеотидокислородный (NAD). 9. Уксусная кислота, 5 % раствор.

Специальное оборудование. 1. Аппарат для электрофореза на пленках из ацетата целлюлозы. Может быть использован аппарат ЭПАУ-20-50 отечественного производства. 2. Ацетатцеллюлозная пленка ТУ-6-05-1696-74 г. 3. Денситометр.

Материал для исследования. Сыворотка крови, свободная от гемолиза.

Ход определения. Приготовление агара: 1 г агара Дифко растворяют при нагревании в 50 мл буфера № 2, затем охлаждают до 65–70 °С. Субстратную смесь 264 мг лактата лития, 4 мг НСТ, 20 мг NAD и 0,4 мг ФМС (4 мг ФМС растворяют в 1 мл субстратного буфера и берут 0,4 мл) растворяют при помешивании в 10 мл субстратного буфера; беречь от света. 10 мл охлажденного до 65 °С раствора агара осторожно смешивают с приготовленной субстратной смесью, избегая образования пузырьков. Полученный гель наливают ровным слоем толщиной около 2 мм на стекло или в какую-либо подходящую емкость. Помещают гель в темное место при комнатной температуре и накрывают крышкой, следя за тем, чтобы капли влаги не оседали на его поверхности.

Проведение электрофореза. Заливают в камеру прибора примерно 90 мл охлажденного до 4 °С буфера для электрофореза. С заранее замоченной в этом буфере ацетатцеллюлозной пленки удаляют избыток влаги фильтровальной бумагой и закрепляют пленку в предназначенной для этого рамке (см. инструкцию к аппарату ЭПАУ-20-50). Наносят на поверхность пленки образцы сыворотки в количестве около 1,5 мкл с помощью аппликатора (2 аппликации). Помещают рамку с пленкой в камеру, закрывают камеру крышкой и включают ток. Электрофорез проводят в течение 25 мин при напряжении 150 В (сила тока 3–5 мА). Выключают ток, снимают пленку с рамки и помещают (предварительно обрезав влажные концы пленки) на слой геля. К гелю должна прилегать поверхность пленки, на которую нанесены образцы. Следует избегать образования воздушных пузырьков. Помещают гель с пленкой в термостат на 30 мин при температуре 37 °С. После окрашивания пленку отмывают в растворе 5 % уксусной кислоты примерно в течение 3 мин и высушивают между листами фильтровальной бумаги в термостате или при

комнатной температуре. Пленка должна быть в расправленном виде. Денситометрируют при длине волны 575–600 нм.

Нормальные величины. Соотношение фракций ЛДГ, по данным различных авторов, составляет: ЛДГ₁ – 19–29 %, ЛДГ₂ – 23–37 %; ЛДГ₃ – 17–25 %; ЛДГ₄ – 8–17 %; ЛДГ₅ – 8–18 %.

Воспроизводимость. Коэффициенты вариации для различных изоферментов от 10 до 15 %.

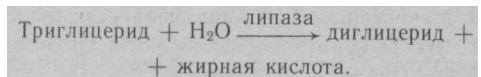
Литература. Михайлов Ю. Е., Шишло Л. А. *Лаб. дело*, 1983, № 10, с. 23–26; Magkert C. L., Moller F. *Proc. nat. Acad. Sci.*, 1959, vol. 45, p. 753–763; Oplier A. «/., Collier C. S., Miller J. M. *Clin. Chem.*, 1966, vol. 12, N 5, p. 308–313.

Клиническое значение. Активность ЛДГ в сыворотке крови повышается при повреждениях миокарда, лейкозах, почечных заболеваниях, тромбоцитопениях, инфекционном мононуклеозе, повреждениях паренхимы печени, опухолях, прогрессирующей мышечной дистрофии. При инфаркте миокарда активность фермента в сыворотке крови достигает максимума через 24–36 ч и приходит к норме медленнее (на 8–10-й день), чем активность КК и АсАТ.

Однако из-за отсутствия органной специфичности диагностическая значимость определения общей активности ЛДГ ниже, чем ее изоферментов. Изофермент ЛДГ, обладающий наибольшей электрофоретической подвижностью (ЛДГ₁), локализуется преимущественно в ткани сердца. Увеличение активности этого изофермента в сыворотке крови характерно главным образом для поражения сердца. При инфаркте миокарда в большей степени увеличивается активность ЛДГ₁ по сравнению с общей ЛДГ. В скелетных мышцах, печени преобладает медленно движущийся изофермент ЛДГ (ЛДГ₅). При остром гепатите резко возрастает активность ЛДГ₃ и ЛДГ₄ и уменьшается активность ЛДГ₁ и ЛДГ₂. При циррозе печени сдвиг в изоферментном спектре ЛДГ также происходит в сторону ЛДГ₂. При холестите активность ЛДГ₃ увеличивается незначительно. При остром лейкозе в сыворотке крови увеличивается активность ЛДГ₂ и ЛДГ₃, причем степень увеличения зависит от количества незрелых клеток. В опухолевых тканях преобладают изоферменты ЛДГ₄ и ЛДГ₅, однако определенной корреляции между ростом опухоли и изменением спектра ЛДГ в сыворотке крови определить не удалось.

5.2.8. Липаза

Панкреатическая липаза (триацилглицерол-ацилгидролаза; К.Ф. 3.1.1.3) относится к группе эстераз, гидролизует в жирах внешние, эфирные связи с освобождением жирных кислот.



Фермент секретируется поджелудочной железой и в большом количестве содержится в дуоденальном содержимом. В сыворотке крови активность фермента низкая. Липаза представляет собой гликопротеид, по данным некоторых авторов, может существовать в виде двух изоформ. Помимо панкреатической липазы, в сыворотке крови содержатся и другие липазы, например липопротеиновая липаза. Липаза является термолabileм ферментом и при 37 °С частично инактивируется.

Методы определения активности липазы отличаются по используемому субстрату, буферу, по технике исполнения и основаны главным образом на определении количества освобожденных под действием фермента жирных кислот. В качестве субстратов наиболее часто применяются: оливковое масло, трибутирин, 2-нафтилмеристат, твин-80, триолеин, а-нафтилаурат, фенилаурат и др. За исключением триглицеридов (оливковое масло, триолеин), другие субстраты подвергаются гидролизу под действием неспецифических эстераз, что снижает специфичность методов, использующих эти субстраты. Оливковое масло способно образовывать тонкодисперсную стабильную эмульсию.

Первый метод определения активности липазы с применением оливкового масла в качестве субстрата был описан в 1932 г. Впоследствии метод подвергался многочисленным модификациям. По способу оценки результатов ферментативной реакции методы могут быть титрометрические, фотометрические, турбидиметрические, сталагмометрические, манометрические. Большинство методов относится к титрометрическим, основанным на титровании жирных кислот, освобождающихся в результате ферментативного гидролиза.

Методы этой группы недостаточно точны, так как очень трудно установить конечную точку титрования в масляной эмульсии. При титровании эмульсия оливкового масла должна быть гомогенной, в противном случае полученные результаты будут неправильными.

Колориметрические методы более точные, но связаны с введением в реакцию ряда дополнительных реактивов. Турбидиметрические методы основаны на измерении величины уменьшения оптической плотности стабильной эмульсии оливкового масла под действием липазы. Стагмометрические методы используют поверхностные свойства жирных кислот, что позволяет только условно судить об активности фермента. Манометрические методы очень сложны и трудоемки. Принцип их основан на измерении объема угольной кислоты, которая вытесняется из бикарбонатного буфера жирными кислотами. Оливковое масло или триолеин как субстраты используются в методах, предлагаемых в качестве стандартных в США, а также в большинстве наборов реактивов для определения активности липазы, в частности, в наборах реактивов фирмы «Harlesco» (США), «Boehringer Mannheim» (ФРГ), амилазно-липазном анализаторе модели «Perkin-Elmer 91» (США) с прилагаемым набором реактивов. Описаны фотометрические методы, основанные на выде-

лении жирных кислот в виде медных солей, которые определяются по реакции с диэтилдитиокарбаминатом.

Оптимизация условий определения и унификация методов. Оптимальный рН для липазы 8,8—9,0. Липаза поджелудочной железы водорастворима, и ее липолитическое действие проявляется на поверхности жировых гранул. Поэтому эмульсия масла должна быть тщательно приготовлена. В качестве эмульгатора чаще применяют дезоксихолат натрия; оптимальная концентрация 3,5 г/л. Липазу активизируют желчные кислоты, ионы кальция, колипаза. Кроме того, желчные кислоты, так же как и дезоксихолат натрия, уменьшают поверхностное натяжение, что приводит к образованию эмульсий и увеличению контакта между жирами и липазой.

Свободные жирные кислоты, образующиеся в результате ферментативной реакции, ингибируют липазу. Связывание жирных кислот ионами кальция с образованием нерастворимых соединений является причиной инактивации липазы в присутствии ионов кальция.

Колипаза, представляющая собой белок, образует с желчными кислотами и липазой комплекс, который обладает большим сродством к субстрату по сравнению со свободной липазой. При применении в качестве субстрата эмульсии оливкового масла реакция нулевого порядка протекает в течение короткого интервала времени (от 4 до 12 мин). В СССР рекомендован в качестве унифицированного турбидиметрический метод с оливковым маслом в качестве субстрата. В методах определения активности липазы сложным является стандартизация единиц активности. Изменение мутности пропорционально освобождению жирных кислот, но оно варьирует при измерении на разных фотометрах. Поэтому абсорбционные единицы нежелательно употреблять для измерения липазной активности. При разрушении 1 мкмольа оливкового масла освобождается 2 мкмольа жирных кислот. Поэтому возможны два способа выражения активности: в микромолях разрушенного под действием липазы сыворотки крови оливкового масла или триолеина или в микромолях освобожденных жирных кислот. Однако калибровать турбидиметрические методы сложно, так как рассеяние света меняется с концентрацией нелинейно.

Унифицированный метод с использованием оливкового масла в качестве субстрата. Принцип. Спектрофотометрическое измерение изменения мутности суспензии оливкового масла под действием липазы. Активность фермента пропорциональна количеству гидролизованного оливкового масла или количеству жирных кислот, образующихся при гидролизе.

Р е а к т и в ы . 1. Оливковое масло, мол. масса 880 (сред.). 2. Алюминия окись хроматографически чистая (для очистки оливкового масла). Очистка оливкового масла: в колбу вместимостью 50 мл помещают 25 мл оливкового масла и добавляют 5 г окиси алюминия, ставят на 1 ч на аппарат для встряхивания жидкости в сосудах. Затем оливковое масло

переливают в центрифужные пробирки и центрифугируют 30 мин при 5000 об/мин. Оливковое масло сливают с осадка и пропускают через плотный бумажный фильтр (с синей полосой) на воронке Бюхнера. 3. Меди сульфат 5-водный ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) для получения абсолютного спирта. 4. Этиловый спирт абсолютный. Для абсолютирования этилового спирта применяют безводный сульфат меди (сульфат меди) белого цвета. Безводный сульфат меди получают просушиванием $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ при температуре 120°C в сушильном шкафу при периодическом перемешивании. Безводный сульфат меди (охлажденный) заливают 96 % этиловым спиртом. Тщательно перемешивают и оставляют стоять 3–4 дня, ежедневно перемешивая. Кристаллы сульфата меди приобретают синий цвет. Затем спирт сливают и засыпают в него новую порцию сульфата меди. Операцию продолжают до тех пор, пока цвет кристаллов не будет меняться. Спирт сливают и фильтруют. 5. Основной раствор оливкового масла, 0,011 моль/л. В колбу с притертой пробкой наливают 100 мл абсолютного спирта, пипетку с 1,1 мл очищенного оливкового масла помещают в колбу так, чтобы конец ее находился близко к поверхности спирта, но не касался ее. Держа пипетку в таком положении, непрерывно вращают колбу круговыми движениями до тех пор, пока оливковое масло не вытечет из пипетки. Затем колбу ставят на 1 ч на аппарат для встряхивания жидкости. Хранят при комнатной температуре. 6. Рабочая эмульсия оливкового масла, 0,00017 моль/л, или 170 мкмоль/л; 1,5 мл основного раствора оливкового масла медленно добавляют к 100 мл буфера pH 8,8. При этом кончик пипетки держат под поверхностью эмульсии. Реактив стабилен при хранении в холодильнике в течение 2 нед. 7. Трис-(оксиметил)-аминометан. 8. Дезоксиголевой кислоты натриевая соль. 9. HCl концентрированная. 10. Буфер, содержащий трис, 0,025 моль/л и натриевую соль дезоксиголевой кислоты, 0,014 моль/л, pH 8,8: 0,3 г триса и 0,6 г дезоксиголета натрия растворяют в 40–60 мл воды, доводят pH до 8,8 концентрированной HCl (3–8 капель) и доливают водой в мерной колбе до 100 мл. Реактив стабилен при хранении в холодильнике в течение 2 нед.

Специальное оборудование. Спектрофотометр с термостатированной кюветой.

Материал для исследования. Сыворотка, свободная от гемолита, или плазма крови. Активность липазы сохраняется в течение 7 дней при хранении сыворотки в холодильнике.

Ход определения. Перед определением сыворотку и реактивы прогревают до температуры измерения. В кювету приливают 3 мл рабочей эмульсии оливкового масла, добавляя 0,1 мл сыворотки, смешивают (без встряхивания) и ставят в термостат при 30 или 37°C , через 2 мин измеряют экстинкцию (E_1) против воды или воздуха при длине волны 340 нм в кювете с толщиной слоя 1 см, затем кювету снова помещают в термостат при той же температуре и через 5 мин измеряют экстинкцию (E_2), рассчитывают ЛЕ за 1 мин.

Расчет активности. Для расчета активности липазы можно использовать контрольную сыворотку с известной активностью липазы. Активность липазы в контрольной сыворотке определяют так же, как в исследуемой. Расчет производят по формуле:

$$\text{активность липазы, ME} = \frac{\Delta E_{\text{оп}} \cdot C_{\text{к}}}{\Delta E_{\text{к}}}$$

где $E_{\text{оп}}$ — изменение величины экстинкции опытной пробы за 1 мин; $\Delta E_{\text{оп}} = E_{1\text{оп}} - E_{2\text{оп}}$ за 1 мин; $\Delta E_{\text{к}}$ — изменение величины экстинкции в контрольной сыворотке за минуту, $\Delta E_{\text{к}} = E_{1\text{к}} - E_{2\text{к}}$ за 1 мин; $C_{\text{к}}$ — активность липазы в контрольной сыворотке, ME. Расчет в мкмольях разрушенного оливкового масла ведут по формуле:

$$\begin{aligned} \text{активность липазы, мкмоль/(мин} \cdot \text{л)} &= \\ &= \frac{\Delta E_{\text{оп}} \cdot 170 \cdot 3 \cdot 1000}{E_{\text{к}} \cdot 1000 \cdot 0,1} \end{aligned}$$

где $\Delta E_{\text{оп}}$ — изменение экстинкции опытной пробы за 1 мин; 170 — концентрация оливкового масла в рабочей эмульсии (мкмоль/л), при которой экстинкция равна приблизительно 1; $E_{\text{к}}$ — экстинкция рабочей эмульсии оливкового

масла (170 мкмоль/л); $\frac{3}{1000}$ — объем рабочей эмульсии оливкового масла в литрах; $\frac{1000}{0,1}$ —

коэффициент пересчета на 1 л сыворотки.

Линейная зависимость сохраняется до 204 мкмоль/л оливкового масла. 16,67 — коэффициент пересчета в нмоль/(с · л).

Нормальные величины: 0–470 нмоль/(с · л), или 0–28 мкмоль/(мин · л).

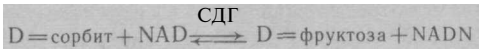
Примечание. Нормальные величины следует проверять в каждой лаборатории. Воспроизводимость. Коэффициенты вариации составляют 10–15 %.

Литература. Делекторская Л. П., Борисенко Л. М., Стародворцева В. Г. В кн.: Унификация лабораторных методов исследования/Под ред. В. В. Меньшикова. — М., 1980, с. 41–49; Огнев Ю. В., Шабанова Т. К. Лаб. дело, 1978, № 7, с. 424–427; Shihabi L. K., Bishop C. Clin. chem., 1971, vol. 17, p. 1150.

Клиническое значение. В сыворотке здоровых людей активность липазы очень низкая, при остром панкреатите активность фермента может увеличиться до 200 раз по сравнению с нормой. Активность липазы в крови быстро увеличивается в течение нескольких часов после приступа панкреатита, достигая максимума через 12–24 ч, и остается повышенной в течение 10–12 дней, т. е. более продолжительное время, чем α -амилаза. В моче активность липазы не обнаруживается. В дуоденальном содержимом липазу рекомендуют определять после стимуляции секретом и панкреозиминном.

5.2.9. Сорбитолдегидрогеназа

Сорбитолдегидрогеназа (L-идитол: NAD⁺ 5-оксидоредуктаза; К. Ф. 1.1.1.14) фермент, катализирующий следующую обратимую реакцию:



В человеческом организме фермент содержится в основном в клетках печени.

Методы определения основаны на прямом оптическом тесте или на образовании окрашенного соединения фруктозы с резорцином — метод Севела — Товарека. В методах определения активности СДГ, основанных на оптическом тесте, используют обратную реакцию. Методы, использующие эту реакцию, более чувствительные.

Оптимизация условий определения и унификации методов. Для определения активности СДГ, основанного на UV-тесте, применяют следующие буферные растворы: фосфатный, триэтаноламинный, трис-буфер. В трис-буфере реакция протекает быстрее, чем в триэтаноламинном, однако в трис-буфере для насыщения фермента требуется более высокая концентрация фруктозы. Оптимум pH для СДГ 7,4—7,6. В качестве унифицированного в 1974 г. утвержден колориметрический метод Севела — Товарека.

Метод по оптическому тесту. Принцип. Различие спектров поглощения окисленной и восстановленной форм NAD при 340 нм.

Реактивы. 1. Триэтаноламина гидрохлорид. 2. Натр едкий, 2 моль/л. 3. Триэтаноламинный буфер, 0,2 моль/л, pH 7,4; 37,2 г гидрохлорида триэтаноламина растворяют в воде, доводят pH до 7,4 2 моль/л раствором NaOH и доливают водой до 1 л. Стабилен при комнатной температуре. 4. Натрия карбонат кислый (NaHCO₃), 10 г/л. 5. Никотинамидадениндинуклеотид восстановленный, динатрипная соль, 12 моль/л: 15 мг NAD-Na, растворяют в 1,5 мл 10 г/л раствора NaHCO₃. Стабилен при 4 °С 1 нед. 6. D-Фруктоза, 4 моль/л: 72,0 г D-фруктозы растворяют в воде и доводят водой до 100 мл. Раствор стабилен при 4 °С 4 нед.

Специальное оборудование. Спектрофотометр с термостатированной кюветой.

Материал для исследования. Свежая сыворотка или плазма крови.

Ход определения. Предварительно все растворы реактивов и сыворотку прогревают до температуры измерения. Определение проводят по следующей схеме:

Смешивают и измеряют экстинкцию при 340 или 365 нм в кювете с толщиной слоя 1 см против воды в течение 5—8 мин через каждую минуту.

Расчет производят по формуле:

$$\begin{aligned} \text{активность, моль/(с} \cdot \text{м}^3) &= \text{нмоль/(с} \cdot \text{л)} \cdot 10^6 = \\ &= \frac{V_{p.c.}}{\varepsilon \cdot V_{\text{сыв}} \cdot l} \cdot \frac{\Delta E}{t} \end{aligned}$$

В термостатированную кювету приливают	Опытная проба, мл	Конечная концентрация в пробе
Триэтаноламинный буфер	1,6	Около 107 ммоль/л
NAD-Na ₂ , раствор	0,1	0,4 ммоль/л
Сыворотка крови	1,0	

Смешивают и 30 мин инкубируют при температуре измерения		
D-фруктоза, раствор	0,3	400 ммоль/л

где $V_{p.c.}$ — объем реакционной смеси; $V_{\text{сыв}}$ — объем сыворотки; t — время реакции, с; ΔE — изменение экстинкции за 1 с; ε — коэффициент молярной экстинкции NADH в м²·моль⁻¹; l — толщина слоя жидкости в кювете, м ($1 \cdot 10^{-2}$).

Нормальные величины. Активность в сыворотке крови здоровых людей низкая — до 25 нмоль/(с·л), или до 1,5 МЕ.

Воспроизводимость. Коэффициент вариации около 5 %. Если при 365 нм $L\Delta > 0,03$, то сыворотку следует развести или уменьшить интервалы измерения.

Литература. *Bergmeyer H. U.* (Hrsg.) Methoden der enzymatischen Analyse. Weinheim: Verlag Chemie, 1974, S. 601—606.

Унифицированный метод по реакции с резорцином (метод/Севела — Товарека). Принцип. Сорбитол под действием фермента сыворотки в присутствии NAD превращается во фруктозу, при реакции фруктозы с резорцином образуется розово-красное окрашивание, интенсивность которого пропорциональна количеству образовавшейся фруктозы.

Реактивы. 1. Трис-(оксиметил)-аминометан. 2. HCl, 0,2 моль/л. 3. Трис-буфер, 0,05 моль/л, pH 8,8; 70,5 мг триса растворяют в 2,5 мл воды, прибавляют 0,4 мл 0,2 моль/л раствора HCl. Доводят pH, доливают водой до 10 мл. Раствор стабилен при хранении при комнатной температуре. 4. D-сорбитол, 0,5 моль/л раствор в 0,05 моль/л трис-буфере: 0,225 г D-сорбитола растворяют в 2,5 мл 0,05 моль/л раствора трис-буфера. Раствор стабилен в течение 4 нед при хранении в холодильнике. 5. NAD, 0,006 моль/л: 25 мг NAD растворяют в 4,5 мл трис-буфера. Раствор стабилен в течение 4 нед при хранении в холодильнике. 6. Трихлоруксусная кислота, раствор 100 г/л. 7. Резорцин, 1 г/л раствор в 96 % этаноле. 8. HCl, 30 % раствор. 9. HCl, 0,2 моль/л раствор. 10. Натрия хлорид, 154 ммоль/л. 11. D-фруктоза, калибровочный раствор: 27 мг D-фруктозы растворяют в небольшом количестве 154 ммоль/л раствора хлорида натрия, переносят в мерную колбу вместимостью 100 мл и доводят объем до метки 154 ммоль/л раствором хлорида натрия.

Ход определения. Опытная проба: в центрифужную пробирку вносят 0,1 мл 0,5 моль/л раствора D-сорбитола и 0,3 мл сыворотки, прогревают 5 мин при 37 °С, затем добавляют 0,2 мл 0,006 моль/л раствора NAD, предварительно прогретого при 37 °С, и инкубируют 30 мин при 37 °С. Инкубацию прерывают добавлением 0,4 мл 100 г/л раствора трихлоруксусной кислоты. Центрифугируют. В чистую пробирку вносят 0,5 мл надосадочной жидкости, 0,5 мл раствора резорцина, 1,5 мл 30 % раствора HCl,

перемешивают и помещают в водяную баню при 80 °С точно на 8 мин, охлаждают. Возникающее розово-красное окрашивание измеряют на ФЭКе при длине волны 500–560 нм (зеленый светофильтр) в кювете с толщиной слоя 0,5 см против холостой пробы. Холостую пробу ставят так же, как опытную, но раствор трихлоруксусной кислоты добавляют до инкубации.

Расчет активности по калибровочному графику.

№ пробирки	Калибровочный раствор D-фруктозы, мл	154 ммоль/л раствор NaCl, мл	Раствор сорбитола, мл	Трис-буфер, мл	Раствор трихлоруксусной кислоты, мл	Раствор резорцина, мл	30% раствор HCl, мл	Активность СДГ, ммоль/(с-л)
1	0,2 калибровочного раствора, разведенного в 10 раз	0,1	0,1	0,2	0,4	1,0	3,0	55,6
2	0,05	0,25	0,1	0,2	0,4	1,0	3,0	139
3	0,1	0,2	0,1	0,2	0,4	1,0	3,0	278
4	0,2	0,2	0,1	0,2	0,4	1,0	3,0	556
5	0,3	—	0,1	0,2	0,4	1,0	3,0	834

Построение калибровочного графика. Из калибровочного раствора D-фруктозы готовят ряд разведений с добавлением реактивов, как указано ниже. Далее калибровочные пробы помещают в водяную баню при 80 °С на 8 мин, охлаждают и измеряют при тех

же условиях, что и опытные пробы, против холостой пробы. В холостую пробу вместо калибровочного раствора добавляют 154 ммоль/л раствор хлорида натрия. Пересчет активности СДГ на микромоли фруктозы на 1 л сыворотки за 1 с инкубации при 37 °С производят по формуле:

$$\text{активность СДГ, ммоль/(с-л)} = \frac{C-1000-3300-2}{180-3600}$$

где C-1000 количество D-фруктозы в калибровочной пробе, нг; 3300— коэффициент пересчета на 1 л сыворотки; $\frac{2}{3600}$ — коэффициент

пересчета на 1 с инкубации; 180— масса 1 микромоля D-фруктозы, мкг.

Линейная зависимость сохраняется от 0 до 830 ммоль/(с-л).

Нормальные величины: до 5,6 ммоль/(с-л), или до 0,02 ммоль/(ч • мл).

Воспроизводимость. Коэффициенты вариации до 10 %.

Литература. *Sevela M., Tovarek J. Vnitriiiek, 1961, vol. 7, p. 1392.*

Клиническое значение. СДГ содержится главным образом в печени, поэтому повышение активности в сыворотке крови специфично для ее поражения. Однако из-за низкой активности СДГ в сыворотке крови и недостаточной чувствительности метода определения СДГ нормальное значение активности фермента в сыворотке крови еще не говорит об отсутствии поражения печени. Наиболее высокая актив-

ность фермента в сыворотке крови наблюдается в первые дни острого гепатита и при обострении хронического гепатита.

5.2.10. Уроканиназа

У человека уроканиназа содержится главным образом в печени. Для определения ее активности в сыворотке крови пользуются спектрофотометрическим методом, основанным на спектрофотометрическом определении концентрации уроканиновой кислоты. В описанном методе условия определения оптимизированы, метод унифицирован.

Унифицированный спектрофотометрический метод. Принцип. Субстрат уроканиназы — уроканиновая кислота — в щелочной среде имеет максимум поглощения при 277—280 нм. Активность фермента определяют по убыли субстрата в процессе ферментативной реакции.

Реактивы. 1. Калия фосфат однозамещенный безводный х. ч., 0,01 моль/л: 1,36 г KHzPO_4 растворяют в мерной колбе вместимостью 1 л и доводят до метки водой. 2. Калия фосфат двузамещенный, безводный х.ч.,

0,01 моль/л; 1,74 г K_2HPO_4 растворяют в мерной колбе вместимостью 1 л и доводят до метки водой. 3. Фосфатный буфер, 0,01 моль/л, рН 7,2: к 0,01 моль/л раствору K_2HPO_4 приливают порциями 0,01 моль/л раствор KH_2PO_4 до получения рН 7,2. 4. Натр едкий, 0,05 моль/л. 5. Уроканиновая кислота 2-водная, имп. 6. Основной калибровочный раствор уроканиновой кислоты; 0,001 моль/л: 0,0087 г уроканиновой кислоты растворяют в мерной колбе вместимостью 50 мл в 0,01 моль/л фосфатном буфере. 7. Рабочий калибровочный раствор уроканиновой кислоты. Готовят разведением основного раствора в 20 раз раствором 0,05 моль/л NaOH; 1 мл рабочего калибровочного раствора содержит 0,05 мкмоль уроканиновой кислоты. В буфер и в раствор уроканиновой кислоты в целях консервации добавляют 3—4 капли хлороформа, после чего буферный раствор можно хранить при комнатной температуре. Раствор уроканата при хранении в холодильнике без замораживания стабилен в течение нескольких месяцев.

Специальное оборудование. Спектрофотометр с длиной волны 280 нм.

Материал для исследования. Сыворотка крови. Фермент стабилен в течение 2—3 дней при 4 °С.

Ход определения. Опытная проба: 0,35 мл фосфатного буфера смешивают с 0,1 мл основного калибровочного раствора уроканиновой кислоты, затем добавляют 0,05 мл сыворотки крови и инкубируют смесь 4 ч при 37 °С. После инкубации в пробу сразу добавляют 2,5 мл 0,05 моля/л раствора NaOH для остановки реакции. Холостую пробу № 1 ставят так же, как опытную, но вместо 0,1 мл основного раствора уроканиновой кислоты добавляют 0,1 мл фосфатного буфера. Холостую пробу № 2 ставят так же, как опытную, но 0,1 мл основного раствора уроканиновой кислоты добавляют после инкубации и сразу останавливают реакцию 0,05 моль/л раствором NaOH. После остановки реакции измеряют оптическую плотность опытной пробы и холостой № 2 против холостой пробы № 1 на спектрофотометре при длине волны 280 нм в кювете с толщиной слоя 1 см.

Расчет активности производят по калибровочному графику. При этом из величины экстинкции холостой пробы № 2 вычитают величину молярной экстинкции опытной пробы.

Построение калибровочного графика. Из рабочего калибровочного раствора уроканиновой кислоты готовят ряд разведений, как указано ниже.

Оптическую плотность проб измеряют против холостой пробы тем же способом, что и при определении активности фермента в сыворотке.

Пересчет активности уроканиназы на микромоли разложившейся уроканиновой кислоты на 1 л сыворотки за 1 мин производят по формуле:

активность уроканиназы, нмоль/(с·л) =

$$= \frac{C}{5 \cdot 10^{-5} \cdot 14400},$$

№ пробирки	Рабочий калибровочный раствор уроканата, мл	0,05 моль/л раствора NaOH, мл	Содержание уроканата в пробе, нмоль	Активность уроканиназы, нмоль/(с·л)
1	0,5	2,5	25	34,7
2	1,0	2,0	50	69,4
3	1,5	1,5	75	104,1
4	2,0	1,0	100	138,9
5	2,5	0,5	125	173,6
6	3,0	0	150	208,3
Холодная проба	0	3,0	—	—

где C — количество разложившейся уроканиновой кислоты, нмоль (по калибровочному графику); $5 \cdot 10^{-5}$ — коэффициент пересчета на 1 л сыворотки крови; 14400 — коэффициент пересчета на 1 с инкубации.

Нормальные величины. У практически здоровых людей активность уроканиназы в крови отсутствует.

Воспроизводимость. Коэффициенты вариации в среднем составляют 7—8 %.

Специфичность метода. Уроканат является единственным субстратом для уроканиназы, обладающей абсолютной субстратной специфичностью.

Литература. Бурбин В. А., Лихачева Н. В. В кн.: Унификация лабораторных методов исследования/Под ред. В. В. Меньшикова. — М., 1980, с. 35—40; Бурбин В. А., Лихачева Н. В., Абгафорова Г. Е. Лаб. дело, 1978, № 11, с. 650—653; Tabor H., Mehler A. H. Acad. Press. Soc., 1955, vol. 11, p. 228—233.

Клиническое значение. Уроканиназа является органоспецифическим ферментом печени. В 1963 г. С. Р. Мардашевым и В. А. Бурбиным впервые было обнаружено, что при токсическом гепатите уроканиназа определяется в крови. В дальнейшем многие исследователи показали, что активность фермента обнаруживается в крови при циррозе печени, хронических гепатитах. Активность фермента в крови при токсическом или вирусном гепатите достигает величин 5—13 нмоль/(с·л), или 0,3—0,8 мкмоль/(мин·л).

5.2.11. Щелочная фосфатаза, изоферменты щелочной фосфатазы

Фосфатазы — ферменты, гидролизующие эфиры фосфорной кислоты. В зависимости от значения рН, при котором действует фермент, различают щелочную и кислую фосфатазу.

Щелочная фосфатаза —ЩФ (фосфогидролаза моноэфиров ортофосфорной кислоты; К. Ф. 3.1.3.1) содержится практически во всех живот-

ных тканях; наиболее богаты ферментом печень, костная ткань, кишечник, плацента. Щелочная фосфатаза — неомогенный фермент; различают 5 тканево-специфических изоферментов щелочной фосфатазы: плацентарный, костный, печеночный, кишечный, почечный. Множественные формы щелочной фосфатазы обусловлены как генетическими факторами, так и посттрансляционной модификацией. Для плацентарной формы существуют отдельный генетический locus и аллельные варианты, которые не обнаруживаются для других изоформ. Фракции щелочной фосфатазы различаются по своим каталитическим свойствам, электрофоретической подвижности, устойчивости к тепловой инактивации. Исследованием термоустойчивости (56 °C 10 мин или 65 °C 5 мин) изоферментов ЩФ из различных тканей установлено, что при указанных условиях плацентарная ЩФ устойчива к нагреванию, костная фракция очень чувствительна к теплу (85—90% инактивации); менее чувствительна к теплу кишечная фракция (50—65% инактивации) и печеночная (50—75% инактивации).

Однако только по методу тепловой инактивации судить об органной принадлежности ЩФ невозможно. В норме при электрофорезе выявляется 1—2 фракции ЩФ в зоне α₂-глобулинов. При патологии количество изоферментов и их расположение при электрофорезе могут меняться. ЩФ образует комплексы с белками и липидами.

Методы определения фосфатаз различаются по используемому субстрату: p-глицерофосфат натрия — метод Боданского; фенилфосфат натрия — метод Кинга — Армстронга; p-нитрофенилфосфат натрия — метод Бессея — Лоури — Брока; кроме того, применяются субстраты — нафтилсульфат, фенолфталеиндифосфат, фенолфталеин монофосфат, тимолфталеинмонофосфат. Наиболее специфичным и простым является метод Бессея — Лоури — Брока, основанный на ферментативном гидролизе p-нитрофенилфосфата, однако для получения правильных результатов важным в данном методе является оптимизация условий определения. Во всех методах субстратами служат однозамещенные ортофосфата, дву- и трехзамещенные производные гидролизу щелочной фосфатазой не подвергаются. Определение ЩФ с субстратом p-нитрофенилфосфатом проводится на биохимических автоанализаторах различного принципа действия.

Оптимизация условий определения и унификации методов. Во всех странах, где занимаются стандартизацией методов, стандартизован метод с субстратом p-нитрофенилфосфатом, однако условия измерения предложены различные. p-Нитрофенилфосфат легко гидролизует, дает минимальные различия для изоферментов ЩФ в оптимизированной концентрации и с образованием хромогена при гидролизе субстрата, что дает возможность осуществлять кинетическое измерение. Высокое значение молярного поглощения p-нитрофенилфосфата делает этот метод достаточно чувствительным. Для оптимизации методов определения ЩФ большое значение

имело применение так называемых трансформирующих буферов.

Наиболее приемлемыми являются два трансформирующих буфера: 2-амино-2-метил-1-пропаноловый и диэтанолоаминовый. В пропаноловом буфере различия по отношению к изоферментам менее выражены и степень чистоты его более приемлемая, чем для диэтанол-аминового буфера. В пропаноловом буфере p-нитрофенилфосфат более стабилен. Диэтанолоаминовый буфер требует высокой степени очистки, так как содержит ингибиторы ЩФ. В наборах реактивов «Лахема» (ЧССР) предложен новый буфер D-N-метилглюкамин. К трансформирующим буферам относится M-(2-оксизтил)-этилендиаминтетрауксусная кислота (НЭДТА). Этот буфер содержит ионы цинка и магния, которые необходимы для работы фермента. Данный буфер и субстрат p-нитрофенилфосфат используются в оптимизированном референтном методе определения активности ЩФ, разработанном Международной Федерацией клинической химии. За последние годы за счет оптимизации условий измерения достигнуты значительные улучшения аналитических качеств методов определения активности ЩФ. В СССР в качестве унифицированных в 1972 г. утверждены два метода с субстратом — (3-глицерофосфатом и p-нитрофенилфосфатом).

Унифицированный метод по гидролизу p-нитрофенилфосфата. П р и н ц и п. Субстрат p-нитрофенилфосфат натрия гидролизует с образованием p-нитрофенола, дающего в щелочной среде желтое окрашивание.

Р е а к т и в ы. 1. p-Нитрофениловый эфир фосфорной кислоты динатриевая соль ч. д. а. 2. HCl, 0,001 моль/л. 3. p-Нитрофенилфосфат натрия, 4 г/л раствор в 0,001 моль/л раствора HCl; 0,4 г p-нитрофенилфосфата помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл и доливают до метки 0,001 моль/л раствором HCl. В связи с тем, что в продаже чаще имеется бариевая соль p-нитрофенилфосфата, то перевод ее в натриевую соль осуществляется следующим способом: к навеске p-нитрофенилфосфата бария, соответствующей получению 9 г/л раствора и помещенной в фарфоровую ступку, добавляют небольшими количествами 0,001 моль/л раствор HCl в процессе растирания соли в ступке в течение 10 мин. Добавлением насыщенного раствора сульфата натрия (1 мл на 100 мл раствора) бариевую соль переводят в натриевую. Через 5 мин полученный раствор p-нитрофенилфосфата натрия фильтруют в делительную воронку, где затем взбалтывают с равным объемом водонасыщенного бутилового спирта. После разделения слоев жидкости в делительной воронке (вверху — бутанол, внизу — постепенно обесцвечивающийся субстратный раствор) бутанол выливают, а субстратный раствор подвергают описанной выше процедуре очистки еще 2—3 раза, пока он не станет совершенно бесцветным. После бутанола производят экстракцию водонасыщенным эфиром 1—2 раза. Реактив не должен содержать свободного p-нитрофенола, отсутствие которого в субстратном растворе проверяется следующей пробой: к 1 мл субстратного

раствора прибавляют 10 мл-0,02 моль/л раствора едкого натра и измеряют на ФЭКе при длине волны 400—420 нм (фиолетовый свею фильтр). Экстинкция должна быть меньше 0,08; если экстинкция больше 0,08, необходимо удалить свободный п-нитрофенол. Для этого реактив экстрагируют 2 или 3 раза равными объемами бутилового спирта и один раз — эфиром. Затем удаляют следы эфира выдерживанием на воздухе. Бутиловый спирт и эфир должны иметь нейтральную реакцию. Если реактив не выдерживает указанный выше тест, то экстрагирование повторяют. Хранят раствор в холодильнике в замороженном состоянии R течение 2—3 нед. 4. Аминокислотная кислота (гликокол, глицин) ч. д. а. или х. ч. 5. Магния хлорида 6-водный ч. д. а. или х. ч. 6. Натр едкий ч. д. а. или х. ч.; растворы 0,1 моль/л, 0,02 моль/л, не содержащие углекислого газа. 7. Буферный раствор — 0,05 моль/л глициновый буфер с добавлением катализатора хлорида магния — 95 мг/л: 375 мг глицина и 10 мг $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ растворяют в 42 мл 0,1 моль/л раствора едкого натра и доводят объем водой до 100 мл. 8. Субстратно-буферный раствор готовят смешиванием равных частей растворов 3 и 7, pH раствора 10,5. При смешивании 2 мл раствора с 10 мл 0,02 моль/л раствора едкого натра реактив не должен давать экстинкцию на ФЭКе более 0,1 (толщина слоя 1 см, длина волны 400—420 нм). В противном случае раствор негоден или подлежит реэкстрагированию бутанолом или эфиром. После экстракции необходимо снова установить pH. Хранят в холодильнике в течение 2—3 дней. 9. n-Нитрофенол — калибровочный раствор 5-10⁻³ моль/л: 696 мг п-нитрофенола х. ч. растворяют в 0,02 моль/л растворе едкого натра и доводят этим же раствором объем до 1 л; 1 мл раствора содержит 5 мкмоль п-нитрофенола.

Материал для исследования. Свежая, свободная от гемолита сыворотка или плазма крови. Цитрат, оксалат, ЭДТА, гепарин вызывают интерференцию. При хранении активность фермента возрастает.

Ход определения. Опытная проба: в пробирки вносят по 1 мл субстратно-буферного раствора, прогревают при 37 °С в течение 5 мин, затем добавляют по 0,1 мл сыворотки. Содержимое пробирок перемешивают и инкубируют в течение 30 мин при 37 °С. После инкубации пробирки переносят в водяную баню со льдом, а затем добавляют по 10 мл 0,02 моль/л раствора едкого натра и тщательно перемешивают. Через 5 мин пробы измеряют на ФЭКе при длине волны 400—420 нм (фиолетовый светофильтр) в кювете с толщиной слоя 1 см против холостой пробы. Холостую пробу ставят так же, как опытную, но сыворотку добавляют после инкубации.

Расчет производят по калибровочному графику.

Построение калибровочного графика. Из рабочего калибровочного раствора готовят ряд разведений, как указано ниже, и измеряют оптическую плотность растворов при условиях, аналогичных опытным, против 0,02 моль/л раствора едкого натра.

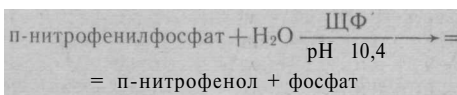
№ пробирки	Рабочий калибровочный раствор, мл	Содержание п-нитрофенола, мкмоль	0,02 моль/л раствор NaOH, мл	Активность ЩФ, нмоль/(с·л)
1	1	0,05	10,1	278
2	2	0,1	9,1	556
3	3	0,15	8,1	834
4	5	0,25	6,1	1390
5	7	0,35	4,1	1946

Нормальные величины: 278—830 нмоль/(с·л), или 1—3 мкмоль п-нитрофенола, освобожденного 1 мл сыворотки за 1 ч инкубации — единицы Бессея — Лоури — Брока. Нормальные величины ЩФ в значительной степени зависят от возраста.

Воспроизводимость. Коэффициенты вариации равны в среднем 5—9 %.

Литература. *Bessey O. A., Lowry O. H., Brock M.* J. Biol. Chem., 1940, vol. 164, p. 321.

Оптимизированный метод по гидролизу п-нитрофенилфосфата. Принцип. Измерение поглощения при 405 нм при образовании п-нитрофенола из п-нитрофенилфосфата. Реакция протекает по следующему уравнению:



Реактивы. 1. 2-Амино-2-метил-1-пропанол (2А2М1П). 2. HCl, 1 моль/л. 3. 2-Амино-2-метил-1-пропаноловый буфер, 0,393 моль/л, pH 10,4: 2А2М1П нагревают при температуре 30—35 °С до получения жидкости. 17,52 г 2А2М1П растворяют в 400 мл воды, доводят pH до 10,4 раствором HCl 1 моль/л и доводят объем водой в мерной колбе до 500 мл. Раствор необходимо предохранять от CO₂ воздуха; стабилен при комнатной температуре в течение месяца. 4. Магния хлорид 6-водный (MgCl₂ · 6H₂O), 6,38 ммоль/л: растворяют 0,131 г хлорида магния в 60—70 мл воды в мерной колбе вместимостью 100 мл и доводят водой до метки. Раствор стабилен. 5. П-Нитрофениловый эфир фосфорной кислоты динатриевая соль, имп. (п-НФФ), 204 ммоль/л: растворяют 0,757 г п-НФФ в 10 мл 6,38 ммоль/л раствора хлорида магния. При хранении в посуде из темного стекла раствор стабилен в течение 5—6 ч, поэтому раствор готовят в необходимом количестве перед употреблением.

Специальное оборудование. Спектрофотометр с термостатированной кюветой или биохимический анализатор, позволяющий проводить кинетическое измерение.

Ход определения. Перед определением температура растворов и исследуемой сыворотки должна быть доведена до температуры измерения. Определение проводят по следующей схеме.

В термостатированную кювету приливают (30 °С)	Опытная проба (мкл)	Конечная концентрация веществ в пробе
2А2М1П-буфер	920,0	2А2М1П-0,345 моль/л
Сыворотка крови	20,0	
Перемешивают, оставляют на 5 мин		
Раствор п-НФФ	80,0	п-НФФ - 16 ммоль/л MgCl ₂ — 0,5 ммоль/л

Осторожно перемешивают и точно через 1, 2, 3 мин (или через другие, но равные промежутки времени) измеряют экстинкцию при длине волны 405 нм в кювете с толщиной слоя 1 см против воды.

Расчет активности фермента проводят по формуле:

$$\text{активность, моль}/(\text{с} \cdot \text{м}^3) = \text{нмоль}/(\text{с} \cdot \text{л}) \cdot 10^6 =$$

$$= \frac{V_{p.c.}}{e \cdot t \cdot V_{сыв}} \cdot \left(\frac{\Delta E}{\Delta t} \right)_{\text{скор.}}$$

где $V_{p.c.}$ — объем реакционной смеси, мл; $V_{сыв}$ — объем сыворотки, мл; t — время реак-

ции, с; $\frac{\Delta E}{\Delta t}$ — изменение экстинкции за 1 с;

e — коэффициент молярной экстинкции п-НФ в растворе 2А2М1П при 30 °С, $\text{м}^2 \cdot \text{моль}^{-1}$ ($18,8 \cdot 10^3$). Коэффициент молярной экстинкции п-НФ может меняться в зависимости от качества реактива и условий определения; l — толщина слоя жидкости в кювете, м ($1 \cdot 10^{-2}$). $1 \text{ ME} = 1 \text{ мкмоль}/(\text{мин} \cdot \text{л}) = 16,67 \text{ нмоль}/(\text{с} \cdot \text{л})$.

Нормальные величины; 500—1417 нмоль/(с·л), или 30—85 ME.

Оценка аналитической надежности. Коэффициенты вариации составляют 3,2—4,8 %. При сравнении данного метода с референтным методом МФКХ $r = 0,99$. По аналитическим качествам его можно использовать в качестве временного референтного метода.

Литература. IFCC. Expert Panel on Enzymes. Part 5 IFCC method for alkaline phosphatase (ortho-phosphoric-monoester phosphohydrolase, alkaline optimum EC 3.1.3.1).— Clin. chim. Acta, 1983, vol. 135, p. 339F—367F *Bowers G. N., McComb R. B.* Clin. Chem., 1975, vol. 21, № 13, p. 1988—1995; *Bowers G. N., McComb R. B., Upreti A.* Clin. Chem., 1981, vol. 27, № 1, p. 135—143; *A reference method for measurement of alkaline phosphatase activity in human serum.*— Clin. Chem., 1983, vol. 29, № 5, p. 751—761.

Электрофоретическое разделение изоферментов на пленках из ацетата целлюлозы. Принцип. Фракции ЩФ разделяются путем электрофореза на пленках из ацетата целлюлозы при рН 8,6. Затем пленки инкубируются на геле, содержащем субстратную смесь.

Реактивы. 1. Буфер барбиталовый для электрофореза, 0,075 моль/л, рН 9,2: 5,5-диэтилбарбитуровая кислота (веронал) — 2,01 г, 5,5-диэтилбарбитуровой кислоты натриевая соль (мединал) — 15,4 г. Навески реактивов помещают в мерную колбу вместимостью 1 л, растворяют и доводят до метки водой. 2. Буфер боратный для приготовления субстрата, рН 10,5: борная кислота — 0,309 г, калия хлорид — 0,373 г, натрия гидроокись — 0,176 г, магния хлорид 6-водный — 0,0005 г. Навески реактивов помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют и доводят до метки водой. 3. Субстратно-буферная смесь для инкубации пленок: а-нафтилфосфат натрия — 0,04 г, фиолетовый быстрый Б (Fast violet B. salt) — 0,04 г. Навески реактивов растворяют в 20 мл боратного буфера. 4. Агароза: 0,32 г на 40 мл субстратного буфера. 5. Агароза: 0,32 г на 40 мл субстратного буфера. 6. Агароза: 0,32 г на 40 мл субстратного буфера. Заливают сначала половинным количеством буфера, доводят до кипения, после чего прибавляют остаток буфера. Смесь второй раз доводят до кипения. Охлаждают до 60 °С и смешивают с буферно-субстратной смесью 1:1. 5. Раствор для промывания — 50 г/л раствор уксусной кислоты.

Специальное оборудование.

1. Аппарат для электрофореза на пленках из ацетата целлюлозы. Можно использовать ЭПАУ-20-50 отечественного производства. 2. Ацетатцеллюлозная пленка ТУ 6-05-1696-74.

Ход определения. Нанесение сыворотки: способ нанесения (аппликация) сыворотки имеет немаловажное значение при электрофорезе на ацетатцеллюлозных пленках. Желательно, чтобы аппликатор был фиксирован и позволял наносить микроколичества сыворотки. Для определения изоферментов ЩФ требуется 1—5 мкл сыворотки (двойная аппликация). Для облегчения трактовки результатов электрофореграммы на ацетатцеллюлозную пленку можно наносить равные количества обычной и предварительно инактивированной теплом сыворотки.

Проведение электрофореза. Ацетатцеллюлозную пленку замачивают в электрофоретическом буфере в течение 20—30 мин. Высушивают фильтровальной бумагой, наносят 1—5 мкл сыворотки и подключают камеру к источнику напряжения. Электрофоретическое разделение проводят в течение 50 мин при напряжении 270 В и силе тока 15—25 мА. После электрофореза пленки кладут рабочей стороной на поверхность геля, содержащего субстратно-буферную смесь (1:1), и выдерживают в термостате при 37 °С до развития окраски.

Оценка результатов. Непросветленные высушенные пленки оценивают с помощью денситометра.

Нормальные значения. В норме выявляются 1—2 фракции ЩФ в зоне a_2 -глобулинов.

Клиническое значение. Значительное увеличение активности ЩФ в сыворотке крови наблюдается при костных заболеваниях, связанных с увеличением количества остеобластов, или с более интенсивным синтезом ЩФ в остеобластах. Наиболее высокая активность (выше нормы в 20 раз и более) наблюдается при болезни Педжета (деформирующий остит), менее высокая — определяется при рахите. Злокачественные новообразования, поражающие кости, также вызывают повышение активности ЩФ в сыворотке крови. При гиперпаратиреозе уровень ЩФ повышается незначительно. Изменения активности ЩФ в сыворотке крови, помимо костной патологии, характерны при заболеваниях печени и желчных путей.

Резкое увеличение активности фермента наблюдается при заболеваниях, сопровождающихся, с механической желтухой. В меньшей степени активность ЩФ увеличивается при гепатите и циррозе печени. Повышение активности фермента в сыворотке крови при заболеваниях печени и желчных путей связано с высвобождением ЩФ из поврежденных печеночных клеток или задержкой экскреции ЩФ из желчи, в результате чего фермент вновь поступает в кровоток, а также с индуктивным ее синтезом в желчных канальцах. При заболеваниях костей ЩФ в сыворотке по своим свойствам аналогична костному ферменту, при болезнях печени — ферменту, который выделяется из печени. Если при электрофорезе в норме выявляются 1—2 фракции ЩФ, то при патологии количество фракций и их расположение при электрофорезе могут меняться. Наиболее быстро мигрирующей фракцией (от катода к аноду) является печеночный изофермент. При заболеваниях печени возможно появление второй печеночной полосы ЩФ. Несколько более медленно по сравнению с печеночной фракцией движется костная фракция ЩФ. Еще более медленно движется плацентная термостабильная фракция ЩФ. Фракция ЩФ с очень высокой термостабильностью названа изоферментом «Реган» по имени больного раком легкого, у которого он был обнаружен впервые. Ее появление может быть связано с наличием злокачественного новообразования. Наиболее медленно мигрирующей фракцией является кишечная ЩФ.

5.2.12. Кислая фосфатаза, фракция кислой фосфатазы

Кислая фосфатаза — КФ (фосфогидролаза моноэфиров ортофосфорной кислоты, кислый оптимум pH; К. Ф. 3.1.3.2) — содержится почти во всех органах и тканях человека, особенно богаты КФ клетки крови, предстательная железа, печень, почки, кости. Активность КФ в предстательной железе в 100 раз выше, чем в других тканях. КФ не является гомогенным ферментом. Большинство тканей содержат два или более изоферментов, отличающихся по своим свойствам.

Ткань предстательной железы содержит два основных изофермента, которые имеют одинако-

вый оптимум pH, но различаются по действию на них ряда веществ (ингибиторов), в частности тартрата (солей винной кислоты). Активность простатической фракции фермента ингибируют тартрат, ионы фтора и железа. При использовании 0,02 моль/л раствора тартрата и п-нитрофенилфосфата в качестве субстрата ингибирование составляет 95 %, т. е. простатическая КФ является тартратлабильной. Специфичностью к КФ предстательной железы обладают субстраты п-нафтилфосфат и тимолфталеинфосфат.

Методы определения КФ те же, что и для ЩФ, но различаются по используемым буферным системам и значению pH.

Оптимизация условий определения и унификация методов. В методах определения активности общей простатической КФ чаще всего применяется цитратный буфер, обладающий способностью активировать кислую фосфатазу предстательной железы. В большинстве стандартных методов, рекомендуемых в различных странах, и в наборах реактивов в качестве субстрата используется п-нитрофенилфосфат. «Ляхема» (ЧССР) выпускает набор реактивов для определения общей и простатической КФ.

Метод по гидролизу п-нитрофенилфосфата для определения активности общей и простатической фракций. Принцип. КФ гидролизует п-нитрофенилфосфат в кислой среде с образованием п-нитрофенола, дающего в щелочной среде желтое окрашивание. Активность КФ предстательной железы ингибируется L-тартратом.

Реактивы. 1. п-Нитрофенилфосфат динатриевая соль (п-нитрофенилфосфат не должен содержать примеси п-нитрофенола); п-нитрофенилфосфат отечественного производства требует перекристаллизации (см. 5.2.11). 2. Натрия хлорид ч. д. а. или х. ч. 3. Натрия цитрат трехзамещенный, 1 моль/л, pH 5,5. 4. Калий-натрий виннокислый ч. д. а. или х. ч. (раствор ингибитора), 0,12 моль/л раствор в 1 моль/л растворе цитрата. 5. Раствор А: 80 мл концентрированного буферного раствора разбавляют 32 мл воды и в 37 мл этого раствора растворяют 0,09 г п-нитрофенилфосфата и 0,31 г хлорида натрия. Определение можно проводить по набору реактивов «Ляхема» (ЧССР). 6. Раствор Б: 40 мл концентрированного раствора ингибитора разбавляют 16 мл воды и в 18,5 мл этой смеси растворяют 0,045 г п-нитрофенилфосфата и 0,155 г хлорида натрия. Растворы А и Б стабильны при хранении в холодильнике в посуде из темного стекла в течение нескольких недель. 7. п-Нитрофенол ч. д. а. 8. Основной калибровочный раствор п-нитрофенола: 16,68 мг п-нитрофенола помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл и доливают до метки водой. 9. Натр едкий ч. д. а. или х. ч., 0,1 моль/л.

Материал для исследования. Свежая сыворотка или плазма крови, свободные от гемолита.

Ход определения. Опытная проба: в одну пробирку вносят 0,5 мл раствора А (общая активность), в другую пробирку — 0,5 мл раствора Б (тартратстабильная фракция) и нагревают до 37 °С в течение 5 мин. Добавляют в обе пробирки по 0,1 мл сыворотки или плазмы

и инкубируют 30 мин при 37 °С. Затем в обе пробирки добавляют по 2 мл 0,1 моль/л раствора гидроксида натрия. Холодная проба: в пробирку вносят 0,5 мл раствора А, далее обрабатывают так же, как опытную, но сыворотку или плазму добавляют после инкубации. Измеряют экстинкцию опытной и холодной пробы при длине волны 405 нм в кювете с толщиной слоя 1 см против воды.

Построение калибровочного графика. Из основного калибровочного раствора готовят рабочие растворы, как указано ниже.

№ пробирки	Основной калибровочный раствор п-нитрофенола, мл	Вода дистиллированная, мл	Активность КФ	
			мкмоль/(мин-л)	нмоль/(с-л)
1	0,1	1,9	2,5	41,7
2	0,2	1,6	5	83,3
3	0,5	2,0	10	166,7
4	1,0	1,0	25	416,7
5	1,0	—	50	833,5

В каждую из 5 пробирок наливают по 0,1 мл соответствующего рабочего калибровочного раствора, прибавляют по 2,5 мл раствора NaOH, перемешивают и измеряют экстинкцию против воды при тех же условиях, что и экстинкцию опытной пробы. По полученным значениям экстинкции строят калибровочный график зависимости экстинкции от активности фермента.

Расчет активности производят по калибровочному графику. Из экстинкции опытной пробы (раствор А) вычитают экстинкцию холодной пробы; разность экстинкции соответствует экстинкции общей КФ. Из экстинкции опытной пробы (раствор Б) вычитают экстинкцию холодной пробы; разность экстинкции соответствует экстинкции тартратстабильной фракции. Для обеих разностей находят соответствующую активность по калибровочному графику. Из величины активности общей КФ вычитают величину активности тартратстабильной фракции, получают активность тартратлабильной фракции КФ (КФ предстательной железы).

Нормальные величины. Общая активность 67—167 нмоль/(с-л), или 4—10 МЕ; тартратлабильная фракция 0—16,7 нмоль/(с-л), или 0—1 МЕ.

Воспроизводимость. Коэффициенты вариации колеблются от 6 до 10 %. Если полученная величина активности общей КФ превышает 830 нмоль/(с-л), то исследование повторяют при инкубации 10 мин и полученный результат умножают на 3.

Л и т е р а т у р а . Bessey O. A., Lowry O. H., Brock M. I. J. biol. Chem., 1946, vol. 164, p. 321—329; *Кислая фосфатаза*. Инструкция

к набору реактивов для определения активности кислой фосфатазы в сыворотке крови. Био-Ла-Тест, «Лахема» (ЧССР).

Клиническое значение. Определение активности КФ обычно проводится для диагноза карциномы предстательной железы. При этом простатическая фракция КФ имеет большее диагностическое значение, чем общая КФ. Определение активности КФ может быть использовано для дифференциальной диагностики метастазов рака предстательной железы в кости и заболеваний костной ткани, в частности остеодистрофии, при которых обычно повышен уровень только щелочной фосфатазы, в то время как при костных метастазах рака предстательной железы повышается, как правило, активность в крови как ЩФ, так и КФ. Массаж предстательной железы, катетеризация, цистоскопия, ректальные исследования приводят к повышению активности КФ, поэтому кровь для определения активности КФ рекомендуется брать не раньше чем через 48 ч после указанных процедур.

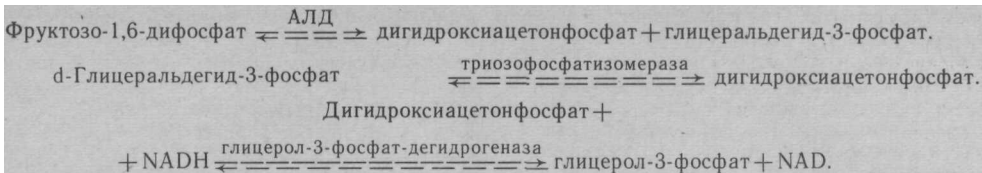
5.2.13. Фруктозо-1,6-дифосфат-альдолаза

Альдолаза — АЛД (В-фруктозо-1,6-бисфосфат D-глицеральдегид-3-фосфат-лиаза; К. Ф. 4.1.2.13) относится к классу лиаз. АЛД является ферментом гликолиза. О. Warburg, W. Christian выделили впервые фермент в 1943 г. из скелетных мышц крыс. АЛД состоит из трех изоформ: мышечной, печеночной, мозговой, различающихся по субстратной специфичности.

Мышечный фермент (фруктозе-1,6-дифосфатальдолаза) катализирует гидролиз фруктозо-1,6-дифосфата значительно быстрее, чем фруктозо-1-монофосфата; он отличается малой органной специфичностью, наибольшая активность его обнаруживается в скелетной мускулатуре, в сердечной мышце и печени. Печеночный тип (фруктозо-1-фосфатальдолаза) катализирует реакцию расщепления фруктозе-1-монофосфата на глицериновый альдегид и диоксиацетонфосфат, содержится исключительно в печени.

В норме в сыворотке крови активность фруктозо-1-фосфат-альдолазы не определяется. Для целей диагностики чаще определяют фруктозо-1,6-дифосфат-альдол азу.

Методы определения. Для определения активности АЛД в сыворотке крови применяют спектрофотометрические методы по непрямому оптическому тесту Варбурга; фотометрические методы, основанные на определении фосфора фосфотриоз по реакции с параоксидифенилом; динитрофенилгидразиновые методы (Сибли-Ленингер, 1949). Шапиро (1960) был предложен динитрофенилгидразиновый метод для определения активности фруктозе-1-фосфатальдолазы в сыворотке крови. Определение АЛД по непрямому оптическому тесту протекает по следующим реакциям.



Метод, основанный на указанных реакциях, трудно выполнять в практических лабораториях без наличия готовых наборов реактивов, к тому же глицерол-3-фосфат-дегидрогеназа отличается низкой стабильностью. Из-за трудоемкости методы, основанные на определении фосфотриоз также не нашли широкого применения.

Наиболее простыми и распространенными являются динитрофенилгидразиновые методы, основанные на гидролизе фруктозодифосфата с образованием триоз, которые дают с 2,4-динитрофенилгидразином окрашенные гидразоны. Первый динитрофенилгидразиновый метод для определения активности альдолазы в сыворотке крови был описан J. Sibley, A. Lehninger в 1949 г. В дальнейшем были предложены различные модификации метода. В методах определения АЛД сложным является вопрос относительного выбора калибровочного материала. В качестве калибровочного материала можно использовать фруктозодифосфат и триозы: глицеральдегид или диоксиацетон. Возможность использования глицеральдегида и диоксиацетона обусловлена тем, что в ходе ферментативной реакции образуется равное количество триоз. Диоксиацетон — более стойкое вещество, чем глицеральдегид, поэтому его предпочтительнее использовать в качестве калибровочного материала.

Колориметрический динитрофенилгидразиновый метод (Товарницкого — Волуйской). П р и н ц и п. Альдолаза расщепляет фруктозо-1,6-дифосфат на фосфоглицериновый альдегид и фосфодиоксиацетон. При отщеплении лабильного фосфора альдегидные и кетонные группы триоз фиксируются гидразином по мере их образования. Для предупреждения вовлечения фосфотриоз в дальнейшие реакции к раствору фруктозодифосфата прибавляется моноiodуксусная кислота, которая блокирует ферменты, разрушающие фосфотриозы. Свободные триозы с 2,4-динитрофенилгидразином образуют гидразоны, окрашенные в щелочной среде.

Р е а к т и в ы. 1. 0-фруктозо-1,6-дифосфата натриевая соль, 0,06 моль/л; 2 мл 10 % раствора натриевой соли 0-фруктозо-1,6-дифосфата (расфасованного в ампулах) разводят в колбе вместимостью 25 мл водой и доводят объем раствора до метки. Разведенный раствор фруктозо-1,6-дифосфата стабилен при хранении в холодильнике. 2. HCl, 2 моль/л. Готовят разведением 17 мл концентрированной кислоты (отн. плотность 1,19) в 100 мл воды. 3. 2,4-Динитрофенилгидразин, 1 г/л раствор: 100 мг сухого вещества растворяют в 100 мл 2 моль/л раствора HCl. 4. Натрия карбонат кислый, 5 г/л: 500 мг MaHCO_3 растворяют в 100 мл воды. 5. Гидразина сульфат, 0,56 моль/л: растворяют 7,3 г гидразина сульфата в небольшом количестве воды

(от 30 до 40 мл), доводят pH до 7,4—7,6 и доливают водой до 100 мл. 6. Моноiodуксусная кислота, 0,4 г/л водный раствор: 40 мг моноiodуксусной кислоты растворяют в 80 мл воды, доводят pH раствором едкого натра до 7,4 и доливают водой до 100 мл. 7. Трихlorоуксусная кислота, 100 г/л. 8. Едкий натр, 30 г/л. 9. Бромтимоловый синий (индикатор), 0,4 г/л: растворяют 10 мг индикатора в 3,2 мл 2 г/л раствора едкого натра. Объем раствора доводят водой до 25 мл. Этим раствором пользуются для установления pH. При pH 7,4—7,7 индикатор приобретает синий цвет. 10. Калибровочный раствор диоксиацетона.

М а т е р и а л д л я и с с л е д о в а н и я ! Сыворотка, свободная от гемолиза.

Ход определения. Опытная проба: в пробирку вносят: 0,5 мл исследуемой сыворотки; 0,5 мл 5 г/л раствора NaHCO_3 , 0,12 мл раствора гидразина сульфата, 0,12 мл раствора моноiodуксусной кислоты, 0,12 мл воды, 0,12 мл фруктозодифосфата. Перемешивают, инкубируют 1 ч при 37 °С. После инкубации в пробу добавляют 1,5 мл 100 г/л раствора трихlorоуксусной кислоты, содержащий пробирок перемешивают и центрифугируют.

В другую пробирку вносят 0,5 мл центрифугата, 0,5 мл 30 г/л раствора NaOH и оставляют на 10 мин при комнатной температуре. Затем добавляют 0,5 мл раствора 2,4-динитрофенилгидразина, перемешивают, смесь нагревают 10 мин при 37 °С, добавляют по 3 мл 30 г/л раствора NaOH и через 10—20 мин определяют оптическую плотность раствора на ФЭКе в кювете с толщиной слоя 0,5 см с зеленым светофильтром (540 нм) против холостой пробы. При стоянии проб больше 20 мин окраска бледнеет.

В о с п р о и з в о д и м о с т ь. Коэффициент вариации около 10 %.

Р а с ч е т проводят по калибровочной кривой.

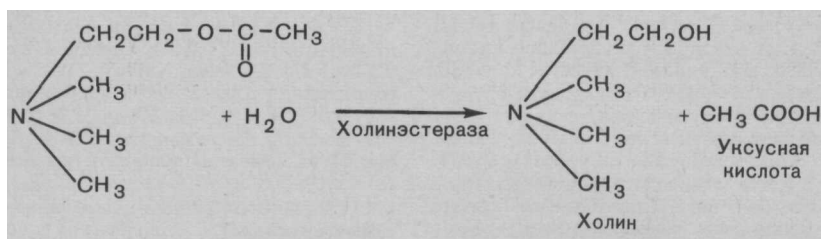
П о с т р о е н и е к а л и б р о в о ч н о й кривой. 22,5 мг диоксиацетона при нагревании растворяют в 25 мл воды; 1 мл такого раствора содержит 10 мкмоль диоксиацетона. В ряд пробирок (см. ниже) разливают калибровочный раствор диоксиацетона, доливают водой и далее проводят реакцию так же, как и при определении активности фермента.

Л и т е р а т у р а. *Sibfey J. A., Lehninger A. L. J. biol. diem., 1949, vol. 177, p. 859.*

К л и н и ч е с к о е з н а ч е н и е. Повышенные активности АЛД наблюдается при многих патологических состояниях: остром гепатите, инфаркте миокарда, прогрессивной мышечной дистрофии, дерматомиозите, гемолитических состояниях, активном ревматизме, раке различной локализации.

№ пробы	Калибровочный раствор диоксиацетона, мл	Дистиллированная вода, мл	Диоксиацетон в пробе, мкмоль	Фруктозо-1,6-дифосфат в пробе, мкмоль
1	0,05	0,45	0,5	0,25
2	0,1	0,4	1	0,5
3	0,2	0,3	2	1
4	0,3	0,2	3	1,5
5	0,4	0,1	4	2

Повышение активности фруктозомонофосфат-альдозазы наблюдается при острых гепатитах. При хронических гепатитах и циррозах печени активность фермента повышается у большинства больных, но это повышение менее выражено, чем при остром гепатите.



Методы определения. Манометрические методы основаны на измерении в аппарате Варбурга количества CO_2 , образовавшегося из карбонатного буфера под влиянием уксусной кислоты, освободившейся во время ферментной реакции; титрометрические методы — на измерении количества щелочи, пошедшей на титрование уксусной кислоты; фотометрические методы — на изменении цвета раствора под влиянием уксусной кислоты в присутствии индикатора. К этой группе относится метод Моландера — Фридмана (1954), гидроксиламиновый метод Хестрина (1949). Электрометрические методы основаны на измерении pH реакционной смеси до и после опыта. Принцип кондуктометрических методов состоит в изменении электропроводности инкубационной среды в результате ферментативной реакции.

Применение кондуктометрических и манометрических методов на практике ограничено, так как требуется дорогостоящая аппаратура. Наиболее простыми являются фотометрические методы, основанные на гидролизе ацетилхолина с образованием уксусной кислоты и изменением цвета реакционной смеси в присутствии индикатора. Эти методы различаются по концентрации субстрата, виду буфера и индикатора. Широко применяются также методы с использованием в качестве субстрата ацетилтиохолина или бутилтиохолина. В результате гидролиза этих эфи-

5.2.14. Псевдохолинэстераза

Различают два типа холинэстераз — ацетилхолинэстеразу, или истинную холинэстеразу — АХЭ (ацетилхолин-ацетилгидролаза; К. Ф. 3.1.1.7) и псевдохолинэстеразу — ХЭ (ацилхолин-ацетилгидролаза; К.Ф. 3.1.1.8). Истинная холинэстераза содержится преимущественно в эритроцитах, нервной и мышечной тканях; Псевдохолинэстераза — в сыворотке крови, печени, поджелудочной железе. АХЭ и ХЭ различаются по ряду свойств и прежде всего по субстратной специфичности. Наиболее специфичным субстратом для истинной холинэстеразы является ацетилхолин, для псевдохолинэстеразы — бутирилхолин. Псевдохолинэстераза не отличается строгой субстратной специфичностью и гидролизует такие субстраты, как ацетилхолин, бензоилхолин, сукцинилхолин и другие эфиры холина.

При гидролизе ацетилхолина реакция протекает следующим образом:

ров под действием фермента образуется тиохоллин, который посредством своей SH-группы реагирует с 5,5'-дитио-бис-2-нитробензойной кислотой с образованием 2-нитро-5-меркапто-бензоата, имеющего желтую окраску с максимумом абсорбции 410 нм. Эти методы могут быть использованы для кинетического измерения активности фермента. При использовании в качестве субстрата бензоилхолина применяют спектрофотометрический метод, принцип которого основан на различии абсорбции бензоилхолина и образующейся в процессе реакции бензойной кислоты.

В 1974 г. в качестве унифицированного утверджен фотометрический метод с субстратом ацетилхолинхлоридом. Все параметры реакции в методе оптимизированы.

Унифицированный метод по гидролизу ацетилхолинхлорида. П р и н ц и п. Под действием холинэстеразы происходит гидролиз ацетилхолинхлорида с образованием уксусной кислоты и холина. Уксусная кислота сдвигает pH раствора, что устанавливается с помощью индикатора.

Реактивы. 1. Ацетилхолина хлорид, 0,9 моль/л; 1,63 г ацетилхолина хлорида растворяют в 10 мл воды. При использовании фармакопейного ампулированного препарата содержащее одной ампулы (0,2 г) растворяют в 1,2 мл воды. 2. 5,5'-Диэтилбарбитуровой кислоты нат-

риевая соль (натриевая соль веронала), фарм. 3. HCl, 0,1 моль/л. 4. Натр едкий х. ч., 0,05 моль/л. 5. Феноловый красный, индикатор, раствор 0,1 г/л, область действия рН 6,8—8,4. Изменение окраски от желтой к красной. В фарфоровой ступке с 5,7 мл 0,05 моль/л раствора едкого натра растворяют 0,1 г сухого индикатора, переносят в мерный цилиндр и доводят до 25 мл водой. Из полученного 4 г/л раствора перед употреблением готовят 0,1 г/л раствор разведением водой в 40 раз. 6. Вероналовый буфер, 0,0075 моль/л, рН 8,4: 1,5450 г натриевой соли веронала растворяют в 500 мл воды, добавляют 9 мл 0,1 моль/л раствора HCl и 150 мл 0,1 г/л раствора индикатора, измеряют рН. Доливают водой до 1 л. При хранении в холодильнике в посуде из темного стекла реактив стабилен в течение 1 мес. 7. Прозерин, фарм., 7 г/л: 0,7 г прозерина помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл и доводят до метки водой. Хранят в посуде из темного стекла. 8. Калибровочный раствор уксусной кислоты, 0,1 моль/л: 0,57 мл ледяной уксусной кислоты (х. ч.) помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл и доводят до метки водой.

Материал для исследования. Сыворотка, свободная от гемолиза. Цитратную и оксалатную плазму употреблять нельзя, так как соли лимонной и щавелевоуксусной кислот ингибируют активность фермента.

Ход определения. Опытная проба: смешивают 5 мл вероналового буфера, 0,2 мл воды и 0,1 мл сыворотки. Смесь прогревают при 37 °С в течение 5 мин. Затем добавляют 0,2 мл раствора ацетилхолинхлорида и инкубируют в течение 30 мин при 37 °С. После инкубации добавляют 0,2 мл раствора прозерина. Охлаждают и измеряют на ФЭКе в кювете с толщиной слоя 0,5 см при длине волны 500–560 нм (зеленый светофильтр) против воды. Окраска устойчива в течение 1 ч. Холодную пробу ставят так же, как опытную, но раствор прозерина добавляют до инкубации. Из экстинкции холостой пробы вычитают экстинкцию опытной пробы.

Расчет ведут по калибровочному графику.

Построение калибровочного графика. Из 0,1 моль/л раствора уксусной кислоты готовят разведения, как указано ниже.

№ пробирки	0,1 моль/л раствор уксусной кислоты, мл	Вода дистиллированная, мл	Содержание уксусной кислоты в калибровочной пробе, мкмоль	Активность ХЭ, мкмоль/(с · л)
1	2,0	8,0	4	22,2
2	4,0	6,0	8	44,5
3	6,0	4,0	12	66,7
4	8,0	2,0	16	89
5	9,0	1,0	18	100

Из каждого разведенного раствора берут по 0,2 мл, смешивают с 5 мл вероналового буфера, 0,1 мл сыворотки, прогревают 5 мин при 37 °С, затем добавляют 0,2 мл прозерина, 0,2 мл ацетилхолинхлорида, инкубируют 30 мин при 37 °С и охлаждают. Измерение проводят при тех же условиях, что и опытные пробы. Холодную пробу ставят так же, как калибровочную, но вместо растворов уксусной кислоты добавляют воду. Из экстинкции холостой пробы вычитают экстинкцию калибровочной пробы. Линейная зависимость калибровочного графика сохраняется в пределах от 0 до ПО мкмоль/(с · л).

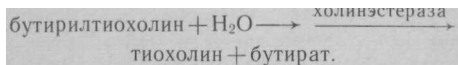
Нормальные величины: 45—95 мкмоль/(с · л), или 160—340 мкмоль/(ч · мл).

Воспроизводимость. Коэффициенты вариации 5—9 %.

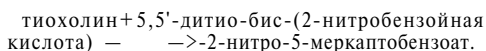
Литература. Делекторская Л. Н., Добрянская Л. Д. В кн.: Унифицированные методы клинических лабораторных исследований/Под ред. В. В. Меньшикова.— М., 1974, вып. VI, с. 5—18; Molander D., Friedman M., La Due J. Ann. Int. Med., 1954, vol. 41, № 6, p. 1139—1151; Schafer C. W., Dopke K. H., Gall, Gothe W. Arzn. standard, 1967, Bd 3, S. 84.

Метод с субстратом бутирилтиохолина йодидом. Принцип. Холинэстераза гидролизует субстрат бутирилтиохолина йодид с образованием кислоты и тиохолина. Тиохолин взаимодействует с 5,5'-дитио-бис-(2-нитро-бензойной кислотой) с образованием 2-нитро-5-меркаптобензоата, окрашенного в желтый цвет.

Основная реакция:



Индикаторная реакция:



Активность холинэстеразы сыворотки крови пропорциональна скорости изменения поглощения 2-нитро-5-меркаптобензоатом в индикаторной реакции.

Реактивы. 1. Калия фосфат однозамещенный ч. д. а. или х. ч. 2. Натр едкий х. ч. или ч. д. а. 3. Фосфатный буфер, 52 ммоль/л, рН 7,7: в мерной колбе вместимостью 1000 мл последовательно растворяют приблизительно в 900 мл воды 7,075 г однозамещенного фосфата калия и 1,496 г едкого натра. Проверяют рН и доводят объем до метки водой. 4. 5,5'-Дитио-бис-(2-нитробензойная кислота) кристаллическая, 0,26 ммоль/л раствор в фосфатном буфере, рН 7,7: 0,103 г 5,5'-дитио-бис-(2-нитробензойной кислоты) растворяют в 500 мл фосфатного буфера рН 7,7 в мерной колбе вместимостью 1 л. Объем доводят буфером до метки. Раствор стабилен в течение 6 нед при хранении в холодильнике в посуде из темного стекла. 5. S-Бутирилтиохолина йодид кристаллический, 218 ммоль/л: 0,0792 г бутирилтиохолина йодида растворяют в мерной колбе, вместимостью 10 мл в воде. Объем доводят до метки. Раствор стабилен в течение 6 нед при хранении в холодильнике в посуде из темного стекла. 6. L-Цистеина гидрохло-

рид, мол. м. 175,6, х. ч. Пригоден L-цистеина гидрохлорид производства ВНР. Хранят в холодильнике. 7. Основной калибровочный раствор L-цистеина гидрохлорид, 5 ммоль/л. Готовят в ледяной бане: 0,0878 г цистеина гидрохлорида растворяют в 50 мл воды в колбе вместимостью 100 мл, объем доводят до метки водой. Раствор стабилен в течение 2 ч при хранении в холодильнике. 8. Рабочий калибровочный раствор цистеина гидрохлорида 2 ммоль/л соответствует активности холинэстеразы 4000 МЕ/л, или 66,68 мкмоль/(с · л). Готовят путем разведения основного калибровочного раствора водой в 2,5 раза. Стабилен в течение 2 ч при хранении в холодильнике.

Специальное оборудование. 1. Спектрофотометр или колориметр с термостатированной кюветой (25; 30; 37 °С) для микроизмерений. Колебания температуры не должны превышать ±0,1 °С. 2. Полуавтоматические микропипетки.

Материал для исследования. Сыворотка или плазма крови. Холинэстераза сыворотки крови стабильна в течение 5 дней при хранении при комнатной температуре или в холодильнике.

Ход определения. Перед определением температура рабочих растворов и сыворотки должна быть доведена до температуры измерения. Определяют по следующей схеме.

В термостатированную кювету (25; 30; 37 °С) приливают	Опытная проба (25; 30; 37 °С), мкл	Холостая проба (ставится только при 37 °С), мкл	Конечные концентрации веществ в пробе
Раствор 5,5'-дитио-бис-(2-нитробензойной кислоты) в фосфатном буфере, рН 7,7	750	750	Фосфатный буфер 50 ммоль/л, рН 7,7; 0,25 ммоль/л 5,5'-дитио-бис-(2-нитробензойная кислота)
Сыворотка	5	—	
Вода дистиллированная	—	5	
Раствор субстрата	25	25	Бутирилтиохолина йодид, 7 ммоль/л

Смешивают и тотчас измеряют оптическую плотность против воды при длине волны 400-440 (405) нм в кювете с толщиной слоя 1 см и одновременно включают секундомер. Далее еще 3 раза измеряют экстинкцию точно через 30; 60; 90 с.

Расчет. Для расчета $\Delta E/30$ с-из каждого последующего результата измерения (при 25 или 30 °С для опытной пробы и при 37 °С — для опытной и холостой проб) вычитают предыдущий. Из полученных величин $E/30$ с

рассчитывают среднюю арифметическую $\frac{\Delta E}{\Delta t}$, кото-

рую используют в последующих расчетах. В случае измерения при 37 °С делают поправку на холостую пробу (за счет спонтанного гидролиза субстрата).

Активность холинэстеразы в сыворотке крови может быть рассчитана по формуле с применением коэффициента молярной экстинкции 2-нитро-5-меркаптобензоата, по калибровочной кривой и с использованием величин экстинкции рабочего калибровочного раствора L-цистеина.

Расчет с применением коэффициента молярной экстинкции производят по следующей формуле:

каталитическая активность, моль/(с · м³) =

$$= \text{мкмоль}/(\text{с} \cdot \text{л}) \cdot 10^3 = \frac{V_{p.c.} \cdot \Delta E}{\varepsilon \cdot l \cdot V_{сыв} \cdot t},$$

где $V_{p.c.}$ — объем реакционной смеси; $V_{сыв}$ — объем сыворотки; t — время реакции, с; ΔE —

изменение экстинкции в 1 с; l — толщина слоя жидкости в кювете, м ($1 \cdot 10^{-2}$); ε — коэффициент молярной экстинкции 2-нитро-5-меркаптобензоата в условиях проведения определения ($\text{м}^2 \cdot \text{моль}^{-1}$).

Величина коэффициента молярной экстинкции зависит от условий проведения определения: рН, температуры, длины волны измерения и др. Коэффициент молярной экстинкции при температуре 25 °С, длине волны 405 нм, толщине слоя кюветы 1 см равен $13,3 \cdot 10^2 \text{ м}^2/\text{моль}$, при измерении на фотоколориметре со светофильтром с длиной волны 405 нм при 30 °С — $14,3 \text{ м}^2/\text{моль}$, при 37 °С — $14,66 \text{ м}^2/\text{моль}$.

Построение калибровочной кривой. Из основного раствора L-цистеина приготавливают серию рабочих калибровочных растворов как указано ниже.

№ пробирки	Основной раствор L-цистеина, мл	Вода дистиллированная, мл	Активность холинэстеразы	
			МЕ	мкмоль/(с · л)
1	1	9	1 000	16,67
2	2	8	2000	33,34
3	4	6	4000	66,68
4	6	4	6000	100,02
5	8	2	8000	133,76
6	10	—	10000	166,7

К 5 мкл каждого рабочего калибровочного раствора добавляют 750 мкл 5,5'-дитио-бис-(2-нитробензойной кислоты) в фосфатном буфере и 25 мкл воды. Экстинкцию измеряют при 405 нм в кювете с толщиной слоя 1 см против холостой пробы.

Холостая проба включает 750 мкл раствора 5,5'-дитио-бис-(2-нитробензойной кислоты) в фосфатном буфере и 30 мкл воды.

Линейность калибровочной кривой сохраняется до 166,7 мкмоль/(с·л) или 10000 МЕ.

Расчет. При расчете по рабочему калибровочному раствору L-цистеина используют формулу:

$$\text{активность, мкмоль/(с·л)} = \frac{\Delta E_{\text{оп}}}{\Delta t} \cdot \frac{66,68}{E_{\text{кал}}}$$

где $\frac{\Delta E_{\text{оп}}}{\Delta t}$ — средняя арифметическая измене-

ния абсорбции опытной пробы за 30 с; $E_{\text{кал}}$ — экстинкция рабочего калибровочного раствора L-цистеина; 66,68 — активность холинэстеразы для рабочего калибровочного раствора L-цистеина, мкмоль/(с·л), за 30 с.

Нормальные величины: при 25 °С — 50—155 мкмоль/(с·л), или 3000—9300 МЕ; при 30 °С — 62—191 мкмоль/(с·л), или 3714—11513 МЕ; при 37 °С — 88—240 мкмоль/(с·л), или 4659—14443 МЕ.

Воспроизводимость 7—10%.

Примечание. Определение и расчет коэффициента молярной абсорбции для 2-нитро-меркаптобензоата проводят по формуле:

$$E = \frac{\epsilon}{c \cdot l} \cdot M^2 \cdot \gamma \cdot \text{моль}$$

где c — концентрация L-цистеина в реакционной смеси, моль/м³; l — толщина слоя кюветы, м; ϵ — экстинкция 2-нитро-5-меркаптобензоата для данной концентрации L-цистеина в условиях опыта.

Литература. *Knedel M., Bottger R. Clin. Wschr., 1967, Bd 45, S. 325; Szasz G. Clin. chim. Acta, 1968, vol. 19, p. 191; Test-Combination Cholinesterase. Cat. № 124133, Boehringer Mannheim GmbH. Diagnostica.*

Клиническое значение. При поражении печени активность фермента в сыворотке крови понижается, так как нарушается синтез фермента клетками печени. Определение активности холинэстеразы не имеет большого значения при остром гепатите, но очень ценно для наблюдения за течением болезни и для определения прогноза при хронических заболеваниях печени. Активность фермента уменьшается при отравлении фосфорорганическими соединениями.

5.3. НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫЕ АЗОТИСТЫЕ ВЕЩЕСТВА

Низкомолекулярные азотистые вещества или небелковые азотистые компоненты крови состоят главным образом из конечных продуктов обмена белков и нуклеиновых кислот. Эти вещества остаются в сыворотке крови после осаждения белка.

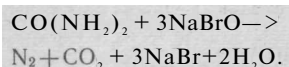
В состав фракций небелкового азота крови или сыворотки крови входит азот мочевины ~50 %, аминокислот ~25 %, мочевой кислоты ~4 %, креатина и креатинина ~7,5 %, аммиака и индикана ~0,5 %, полипептидов, нуклеотидов и других азотистых соединений ~5 %. Содержание небелковых компонентов сыворотки крови может меняться в зависимости от способа осаждения белков. Основной фракцией остаточного азота является мочевины, определение которой может применяться в диагностических целях вместо остаточного азота.

5.3.1. Мочевина

Синтез мочевины происходит в печени главным образом из аммиака, который образуется при дезаминировании аминокислот, распада пуриновых и пиримидиновых нуклеотидов.

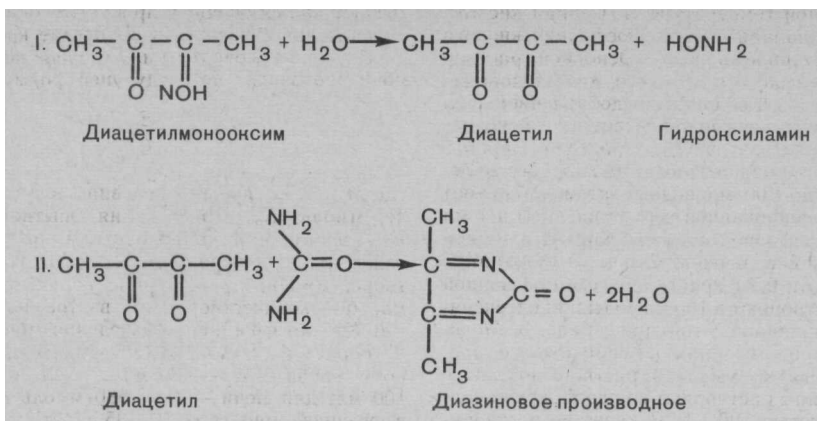
Методы определения мочевины. Мочевину в биологических жидкостях можно определить газометрическими, гипобромитными методами; прямыми фотометрическими методами, основанными на реакции мочевины с различными ве-

ществами с образованием окрашенных соединений; ферментативными методами с последующим определением аммиака или углекислоты как продуктов действия уреазы на мочевины. Принцип газометрических методов основан на окислении мочевины гипобромитом натрия в щелочной среде. Мочевина подвергается окислению соответственно следующему уравнению:



Углекислота поглощается раствором, объем газообразного азота измеряется с помощью специального аппарата. Наиболее удобно для практических целей проводить определение мочевины в аппарате Бородина. Недостатком этой реакции являются ее низкие специфичность и точность, так как гипобромит натрия реагирует не только с мочевиной, но и с другими соединениями, содержащими аминогруппы. Методы этой группы неточны, плохо воспроизводимы и неудобны при серийной работе, чувствительность их низкая. Бром характеризуется высокой токсичностью.

Среди фотометрических методов наиболее распространенными являются методы, основанные на реакции мочевины с диацетилмонооксидом — реакции Ферона, протекающей в два этапа.



Для окисления гидросиламина могут применяться следующие вещества: персульфат калия, мышьяковая кислота, хлорная кислота, катионы, фенозон. Для интенсификации окраски и повышения ее стабильности применяются: тиосемикарбазид, фенилантраниловая кислота, глюкуронолактон, катионы, триптофан и нитриты. Методы этой группы отличаются хорошей воспроизводимостью, высокой чувствительностью, большей специфичностью, чем гипобромитные. В некоторых методах используется 20–50 мкл сыворотки, что позволяет применять их без депротеинизации сыворотки.

Ферментативные методы основаны на гидролизе мочевины уреазой. Для уреазы мочеви́на является единственным физиологическим субстратом, поэтому уреазные методы высокоспецифичны. Оптимум действия уреазы pH 6,0–8,0 зависит от вида буфера. Наиболее употребительные буферные растворы в уреазных методах: ЭДТА-буфер, оптимум pH 6,0–6,5, и фосфатный буфер, оптимум pH 6,9–7,0. Коммерческие препараты уреазы характеризуются различной активностью и степенью чистоты. Образовавшийся в ходе ферментативной реакции аммиак можно определить с помощью различных реакций. Фенолгипохлоритная реакция высокочувствительна и специфична на аммиак. В реакции используются катализаторы, наиболее эффективным из применяемых катализаторов является нитропруссид натрия. Интенсивность окраски образующегося соединения не зависит строго от концентрации реактивов. Изменение концентрации фенола и гипохлорита натрия на 20 % и гипохлорита натрия на 25–50 % не влияет на интенсивность окраски. Соотношение концентраций фенола, едкого натра и гипохлорита натрия в реакции приблизительно должно быть равно 1:1:0,1. Салицилатно-гипохлоритная реакция, описанная R. Richterich, является чувствительной и специфичной на аммиак. Реакция Несслера не является специфичной, приблизительно в 10 раз менее чувствительна на аммиак, чем фенолгипохлоритная. Недостатком реакции является частое образование помутнения. Дихлоризоциануратная реакция

достаточно чувствительна, но определению аммиака мешает наличие в пробах белка.

Ферментные методы определения аммиака по оптическому тесту Варбурга с применением глутаматдегидрогеназы позволяют определить наиболее правильно содержание аммиака и приемлемы для ручного и автоматического определения мочевины.

Ксантгидроловые методы в клинических лабораториях применяются редко, так как трудоемки и неспецифичны, многие амины и амиды дают с ксантгидролом такую же реакцию, как и мочеви́на. Кроме перечисленных выше веществ, мочеви́на образует окрашенные соединения с п-диметиламинобензальдегидом (реакция Эрлиха), изо-нитрозопропиофеноном, N-бромсукцинидом. Однако перечисленные реакции не являются специфичными на мочеви́ну. Уреазный и диацетилмонооксимный методы применяются на автоанализаторах различного принципа действия.

Унификация методов. В качестве унифицированных утверждены диацетилмонооксимный метод в 1972 г. и уреазный метод, фенолгипохлоритная реакция в 1974 г. «Лахема» (ЧССР) выпускает наборы реактивов для определения мочевины диацетилмонооксимным и уреазным методами. На уреазном принципе основано определение мочевины во многих коммерческих наборах реактивов, например фирмы «Boehringer Mannheim» (ФРГ), «Reanal» (ВНР).

Унифицированный метод по цветной реакции с диацетилмонооксимом. П р и н ц и п. Мочеви́на образует с диацетилмонооксимом в присутствии тиосемикарбазида и солей железа в кислой среде окрашенное соединение.

Реактивы. 1. Трихлоруксусная кислота, 100 г/л. 2. Диацетилмонооксим, 25 г/л водный раствор. Реактив стабилен. 3. Тиосемикарбазид, 2,5 г/л водный раствор. Для приготовления реактива можно пользоваться также тиосемикарбазида гидрохлоридом; последний применяется в виде 3,2 г/л водного раствора. Оба реактива стабильны при хранении в темной посуде

при комнатной температуре. 4. Серная кислота концентрированная. 5. Ортофосфорная кислота 85 %. 6. Хлорное железо. Основной раствор хлорного железа: 5 г хлорного железа доводят до 100 мл водой и подкисляют добавлением 1 мл концентрированной серной кислоты. Из основного раствора готовят рабочий раствор хлорного железа: 1 мл основного раствора хлорного железа доводят до 100 мл водой, затем добавляют 8 мл концентрированной серной кислоты и 1 мл 85 % ортофосфорной кислоты. Хранят в темной посуде. Годен в течение 2 нед. 7. Бензойная кислота, 2 г/л; 0,2 г кристаллической бензойной кислоты растворяют в 100 мл воды при интенсивном перемешивании на водяной бане. 8. Мочевина для приготовления калибровочного раствора. Готовят 7 ммоль/л раствор мочевины: 42 мг мочевины растворяют в воде в мерной колбе вместимостью 100 мл. В качестве растворителя можно использовать 2 г/л раствор бензойной кислоты. Калибровочный раствор, приготовленный на растворе бензойной кислоты, стабильнее, чем водный; 1 мл калибровочного раствора содержит 0,007 ммоль мочевины. 9. Цветной реактив: к 30 мл рабочего раствора хлорного железа добавляют 20 мл воды, 1 мл 25 г/л раствора диацетилмонооксида и 0,25 мл 2,5 г/л раствора тиосемикарбазида. Цветной реактив готовят каждый раз перед употреблением.

Материал для исследования. Сыворотка крови, моча. Перед определением профильтрованную мочу (из суточного количества) разводят изотоническим раствором натрия хлорида в соотношении 1:25 или 1:50.

Ход определения мочевины в сыворотке крови. Опытная проба: в центрифужную пробирку наливают 0,8 мл воды, 0,2 мл сыворотки и 1 мл 100 г/л раствора трихлоруксусной кислоты, смешивают. Через 15—20 мин центрифугируют. В чистую пробирку вносят 0,5 мл надосадочной жидкости и 5 мл цветного реактива. Пробирку выдерживают на кипящей водяной бане в течение 20 мин, затем охлаждают в течение 2—3 мин под проточной водой. Измерение проводят на фотометре при длине волны 530—560 нм (зеленый светофильтр) против холостой пробы в кювете с толщиной слоя 1 см. Холодную пробу ставят так же, как опытную, но вместо надосадочной жидкости берут 0,5 мл воды.

Расчет проводят по формуле путем сравнения с калибровочной пробой. Калибровочную пробу ставят аналогично опытной, но вместо сыворотки берут 0,2 мл калибровочного раствора.

$$\text{Концентрация мочевины, ммоль/л} = \frac{E_{\text{оп}}}{E_{\text{к}}} \cdot C_{\text{к}}$$

где $E_{\text{оп}}$ — экстинкция опытной пробы; $E_{\text{к}}$ — экстинкция калибровочной пробы; $C_{\text{к}}$ — концентрация мочевины в калибровочном растворе, 7 ммоль/л.

Определение мочевины в моче проводят аналогично определению мочевины в сыворотке крови, но вместо сыворотки берут 0,2 мл разведенной мочи. Параллельно обраба-

тывают калибровочную пробу, как описано для определения мочевины в сыворотке крови.

Расчет мочевины на суточное количество мочи производят по следующей формуле:

$$M_{\text{сут}} = \frac{C_{\text{к}} \cdot E_{\text{оп}} \cdot a \cdot K}{E_{\text{к}} \cdot b}$$

где $M_{\text{сут}}$ — количество мочевины в суточной моче, ммоль; $E_{\text{оп}}$ — экстинкция опытной пробы; $E_{\text{к}}$ — экстинкция калибровочной пробы; $C_{\text{к}}$ — содержание мочевины в калибровочном растворе, ммоль; a — суточное количество мочи, мл; b — количество мочи, взятое на анализ, мл; K — коэффициент разведения мочи.

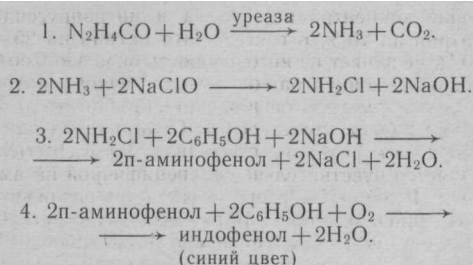
Нормальные величины. Для сыворотки крови — 2,5—8,3 ммоль/л, или 15—50 мг/100 мл; для мочи — 330—580 ммоль мочевины в суточной моче, т. е. 20—35 г/сут.

Примечания. 1. Измерение проводят не позже чем через 15 мин после охлаждения проб ввиду неустойчивости окраски. 2. Из-за неустойчивости окрашенного комплекса мочевины с диацетилмонооксидом и зависимости окраски от условий нагревания калибровочную пробу определяют параллельно каждой серии опыта. 3. При содержании мочевины в сыворотке крови выше 17 ммоль/л сыворотку разводят изотоническим раствором хлорида натрия, а результаты умножают на коэффициент разведения. 4. Для пересчета на азот мочевины результаты следует разделить на 2,14.

Оценка аналитической надежности метода. Воспроизводимость: коэффициенты вариации составляют 3—6 %. Правильность: результаты исследования, полученные диацетилмонооксидным методом, хорошо коррелируют с уреазным методом; $r = 0,93—0,97$.

Литература. Marsh W., Fingerhut B., Miller H. Clin. Chem., 1965, vol. 11, p. 624.

Уреазный метод по реакции с фенол-гипохлоритом. Принцип. Мочевина под действием уреазы разлагается с образованием аммиака и углекислого газа. Выделившийся аммиак образует с гипохлоритом натрия и фенолом окрашенный продукт — индофенол (синего цвета). Реакция катализируется нитропруссидом натрия. Интенсивность окраски пропорциональна содержанию мочевины. Стадии реакции:



Реактивы. 1. Уреаза. Для определения пригодна уреазы с активностью > 5 МЕ/мг. 2. Этилендиамин-N, N, N', N'-тетрауксусной кислоты динатриевая соль (трилон Б), ч. д. а. 3. ЭДТА — буфер, 0,0269 моль/л, рН 6,5:0,50 г трилона Б растворяют в 30—40 мл воды, доводят рН до 6,5 1 моль/л раствором едкого натра и доливают водой в мерной колбе до 50 мл. 4. Основной раствор уреазы в буфере, 10 МЕ/мл: 20 мг уреазы (активность 5 МЕ/мг) растворяют в 10 мл буфера. Навеску уреазы берут в зависимости от активности фермента. Раствор стабилен в течение месяца при хранении в холодильнике. 5. Рабочий раствор уреазы. Перед началом определения берут необходимое количество основного раствора уреазы и разводят бидистиллированной водой в отношении 1:4. 6. Фенол ч. д. а. 7. Натрия нитропруссид 2-водный ч. д. а. 8. Цветной реактив: фенол — 0,11 моль/л, нитропруссид натрия — 0,18 моль/л; 0,0263 г нитропруссид натрия помещают в мерную колбу вместимостью 500 мл, приливают примерно 300 мл воды, растворяют при перемешивании. Затем добавляют 5,18 г фенола и доливают водой до метки. Реактив стабилен в течение месяца при хранении в холодильнике в посуде из темного стекла. 9. Натр едкий ч. д. а., х. ч., 1 моль/л; 0,26 моль/л. 10. Гипохлорит натрия. Приготовление основного раствора гипохлорита: 100 г хлорной извести размешивают в течение 15 мин с 170 мл воды, после чего прибавляют при непрерывном помешивании раствор, состоящий из 170 мл воды и 70 г карбоната натрия. Масса сначала густеет, затем разжижается. Оставляют стоять до следующего дня. Надосадочную жидкость (гипохлорит натрия) сливают и фильтруют через промытый водой фильтр. Хранят в холодильнике в посуде из темного стекла. Определение активности хлора: 1 мл основного раствора гипохлорита натрия смешивают с 100 мл воды. К 50 мл этого раствора добавляют 5 мл свежеприготовленного 50 г/л раствора йодида калия и 10 мл 6 моль/л раствора HCl. Титруют 0,1 н. раствором тиосульфата натрия (готовят из фиксанала). Как только раствор приобретает слабожелтую окраску, добавляют 10 капель 1 % раствора крахмала и титруют до обесцвечивания. Концентрация гипохлорита натрия рассчитывают по хлору:

$$K = a \cdot 0,709,$$

где K — концентрация активного хлора, г/100 мл гипохлорита натрия; a — количество тиосульфата, пошедшего на титрование, мл; 0,709 — коэффициент пересчета 1 мл тиосульфата натрия в концентрацию хлора, г/100 мл. 11. Рабочий раствор гипохлорита натрия. После установления концентрации активного хлора основной раствор гипохлорита натрия разводят водой так, чтобы концентрация хлора составляла 0,78 г/л. Раствор гипохлорита с содержанием хлора 0,78 г/л смешивают с равным объемом 0,26 моль/л раствором едкого натра (100 мл + 100 мл). Активность хлора проверяют не реже одного раза в 2 нед. Рабочий раствор

содержит 0,011 моль/л гипохлорита и 0,13 моль/л едкого натра. Раствор хранят в холодильнике в посуде из темного стекла. 12. Мочевина ч. д. а. 13. Бензойная кислота, 2 г/л (кислоту растворяют при нагревании). 14. Калибровочный раствор мочевины, 0,5 ммоль/л: 15 мг мочевины растворяют в мерной колбе вместимостью 500 мл в 2 г/л растворе бензойной кислоты. Раствор стабилен при хранении в холодильнике. 15. Натрия хлорид, 0,154 моль/л.

Специальное оборудование. Спектрофотометр или колориметр с кюветой для микроизмерений. 2. Полуавтоматические микропипетки.

Материал для исследования. Сыворотка крови или плазма.

Ход определения. Перед определением сыворотку разводят 0,154 моль/л раствором хлорида натрия в отношении 1:9.

Опытная проба: 100 мкл рабочего раствора уреазы вносят в пробирку, добавляют 20 мкл разведенной сыворотки. Закрывают пробкой, перемешивают и инкубируют в течение 15 мин при 37 °С. После инкубации добавляют 300 мкл цветного реактива и 300 мкл рабочего раствора гипохлорита натрия. Перемешивают и инкубируют в течение 20—30 мин при 37 °С. Измеряют экстинкцию в кювете с толщиной слоя 1 см при длине волны 500—560 нм (зеленый светофильтр) против холостой пробы. Окраска стабильна в течение нескольких часов.

Холостую пробу обрабатывают так же, как опытную, но вместо сыворотки берут 0,154 моль/л раствор NaCl.

Калибровочную пробу обрабатывают так же, как опытную, но вместо сыворотки берут калибровочный раствор мочевины. Измеряют при тех же условиях против холостой пробы.

Расчет ведут по формуле:

$$\text{количество мочевины, ммоль/л} = \frac{E_{\text{оп}}}{E_{\text{к}}} \cdot 0,5 \cdot 10,$$

где $E_{\text{оп}}$ — экстинкция опытной пробы; $E_{\text{к}}$ — экстинкция калибровочной пробы; 0,5 — концентрация мочевины в калибровочном растворе, ммоль/л; 10 — коэффициент разведения.

Линейная зависимость между оптической плотностью и концентрацией мочевины сохраняется до 33 ммоль/л.

Нормальные величины. Сыворотка крови — 2,5—8,3 ммоль/л, или 20—50 мг/100 мл.

Оценка аналитической надежности метода. Коэффициенты вариации находятся в пределах 3—8 %. Уреазная реакция высокоспецифична. Фенолгипохлоритная реакция в условиях проведения метода при рН > 7,0 также специфична.

Примечание. Объемы сыворотки и реактивов можно пропорционально увеличивать.

Литература. Chaney A. L., Marbach E. P. Clin. Chem., 1962, vol. 8, p. 131; Gutmann I., Bergmeyer H. U. In: Methods of enzymatic analysis/Ed. H. U. Bergmeyer 2 ed. New York — London, 1974, vol. 4, p. 1791—1794; Kaplan A. In: Standard methods in clinical chemistry.— New York, 1965, vol. 5, p. 245.

Уреазный метод по салицилатно-гипохлорит-ной реакции. Принцип. Тот же. Вместо фенола применяют салицилат натрия.

Реактивы. 1. Этилендиаминтетрауксусная кислота, динатриевая соль ЭДТА. 2. Азид натрия. 3. Натр едкий, 5 моль/л; 1 моль/л. 4. Гипохлорит натрия. 5. Йодид калия, 50 г/л. 6. HCl, 6 моль/л. 7. Нитропруссид натрия, 2,69 ммоль/л. 8. Буферный раствор: ЭДТА — 26,9 ммоль/л; HCl — 20 ммоль/л; азид натрия — 15,4 ммоль/л, pH 6,5. 10 г ЭДТА, 1 г азид натрия растворяют в 800 мл воды с 20 мл 1 моль/л раствора едкого натра. Доводят pH до 6,5 и доливают водой до 1 л. Раствор стабилен, хранят в закрытом виде. 9. Салицилат натрия, 1060 ммоль/л: 170 г салицилата натрия растворяют в воде и доводят объем до 1 л. Раствор стабилен, хранят в закрытом виде. 10. Гипохлорит натрия, раствор: 70 ммоль/л гипохлорита натрия и 2500 ммоль/л натра едкого. Приготовление раствора гипохлорита и определение активности хлора см. предыдущую методику. 11. Уреазный реактив: 200 мг препарата уреазы с активностью 5000 Сигма ед.* растворяют в 1 л буферного раствора. Хорошо перемешивают, профильтровывают. Раствор стабилен в течение недели при хранении в холодильнике. 12. Салицилатный реактив — 1060 ммоль/л салицилата натрия и 2,69 ммоль/л нитропруссид натрия: 800 мг нитропруссид натрия растворяют в 1 л раствора салицилата натрия, фильтруют. Стабилен в течение недели.

Материал для исследования. Плазма, сыворотка крови.

Ход определения. Реакцию проводят при 37 °С. Опытная проба: к 10 мкл сыворотки добавляют 0,1 мл воды или 154 ммоль/л раствора хлорида натрия, 0,5 мл уреазного реактива. Смесь инкубируют в течение 3—3½ мин (время инкубации должно быть постоянным!) при температуре 37 °С, затем добавляют 2 мл салицилатного реактива, перемешивают. Через 48 с инкубации при 37 °С добавляют 2 мл гипохлоритного реактива. Через 5—6 мин инкубации при 37 °С измеряют оптическую плотность раствора на ФЭКе в кювете с толщиной слоя 10 мм при длине волны 500—560 нм (зеленый светофильтр) против холостой пробы на реактивы. Окраска стабильна в течение нескольких часов. Холостую пробу на реактивы ставят так же, как опытную, но вместо сыворотки берут воду. Холостую пробу на сыворотку ставят так же, как опытную, но уреазный реактив добавляют после салицилатного реактива перед гипохлоритом. Измеряют против холостой пробы на реактивы.

Калибровочную пробу обрабатывают так же, как опытную, но вместо сыворотки берут калибровочный раствор мочевины. Измеряют в тех же условиях, что и опытную, против холостой пробы на реактивы.

* Сигма ед. соответствует активности уреазы, катализирующей образование 1 мг азота аммиака в течение 5 мин при 20 °С.

Расчет производят по следующей формуле:

концентрация мочевины, ммоль/л =

$$= \frac{(E_{оп} - E_{хол, сыв})}{E_K} \cdot C_K,$$

где $E_{оп}$ — экстинкция опытной пробы, измеренная против холостой пробы на реактивы; $E_{хол, сыв}$ — экстинкция холостой пробы на сыворотку, измеренная против холостой пробы на реактивы; C_K — концентрация мочевины в калибровочном растворе, ммоль/л.

Линейность калибровочной кривой до 75 ммоль/л.

Нормальные величины те же, что и в предыдущем методе.

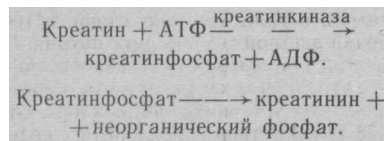
Литература. *Richterich R.* KНnische Chomie. Theorie und Praxis. 3 Aufl. — Basel etc.: S. Karger, 1971, S. 286—289.

Автоматический селективный анализатор GSA-II фирмы «Greiner» (Швейцария). Методы исследования с. 1—5.

Клиническое значение. Отклонения от нормального содержания мочевины в сыворотке крови зависят от скорости процессов синтеза мочевины и ее выделения. Увеличение содержания мочевины в сыворотке крови является одним из главных признаков нарушения функции почек. Из фракций остаточного азота раньше всего повышается уровень мочевины, причем уровень мочевины достигает более высоких цифр по сравнению с другими фракциями остаточного азота. При почечной недостаточности азот мочевины может составлять до 90 % фракций остаточного азота. Повышение уровня мочевины сыворотки крови может носить и внепочечный характер: при потере жидкости (обезвоживание, рвота, понос), при усиленном распаде белков (острая желтая атрофия печени, тяжелые заболевания). Уменьшение содержания мочевины в сыворотке крови может наблюдаться при заболеваниях печени (паренхиматозная желтуха, цирроз печени) из-за нарушения синтеза мочевины в печени.

5.3.2. Креатинин

В синтезе эндогенного креатина принимают участие аминокислоты — аргинин, глицин, метионин. Креатин при фосфорилировании превращается в креатинфосфат, из которого образуется креатинин (ангидрид креатина). Этот процесс в живом организме необратимый.



Креатин и креатинфосфат являются важными азотистыми веществами мышц, участвующими в химических процессах, связанных

с мышечными сокращениями. В сыворотке крови содержится в основном креатинин. Суточное выделение креатинина для каждого человека — величина относительно постоянная, которая зависит главным образом от массы мышечной ткани и мало зависит в отличие от мочевины от питания. Содержание креатинина в сыворотке крови уменьшается с возрастом.

Методы определения. Большинство методов определения креатинина основаны на реакции Яффе, описанной в 1886 г., в основе которой лежит реакция ароматических нитровеществ (например, пикриновой кислоты) с веществами, содержащими активную метиленовую ($=\text{CH}_2$) или метиновую ($=\text{CH}$) группы. В крови многие хромогены, производные креатинина — глюкозамид, 5-метилглюкозамид, 5-метилкреатинин, а также аскорбиновая кислота, пировиноградная кислота, ацетон, глюкоза и другие вещества — реагируют с пикриновой кислотой аналогично креатинину, что обуславливает низкую специфичность методов, основанных на реакции Яффе. По скорости образования окрашенных соединений в реакции Яффе различают три группы веществ: группу очень быстро реагирующих хромогенов (30—40 с), креатинин и группу медленно реагирующих веществ (после 15—20 мин).

Совершенствование методов, основанных на реакции Яффе, направлено главным образом на повышение их специфичности. Для повышения специфичности рекомендуется применение устранения мешающих хромогенов; отделение креатинина от остальных хромогенов с помощью бумажной хроматографии, электрофореза; экстракцию креатинина тетрафенилборатом натрия; сорбенты — бентонит, сефадекс, реактив Ллойда.

В автоанализаторах различного типа действия возможно кинетическое измерение креатинина в сыворотке крови без предварительного осаждения белков с разделением на три перечисленные выше группы веществ, дающих положительную реакцию Яффе. Депротеинизации в таких методах можно избежать путем добавления детергентов — тритона X-100 или додецилсульфата натрия.

На аналитические качества реакции Яффе, повышение ее специфичности, чувствительности влияет ряд факторов: температура реакции рекомендуется не ниже 30 °C, разница температур в опытной и калибровочных пробах не должна превышать 3—5 °C. Оптимальное время реакции 15—20 мин, тем самым удается избежать влияния медленно реагирующих хромогенов. Оптимальной является величина pH в интервале 12,3—12,5, что в значительной степени повышает специфичность реакции и правильность метода. К проблеме, окончательно еще не решенной, относится выбор способа депротеинизации и его влияние на правильность метода. Способами выбора являются осаждение белков трихлоруксусной и пикриновой кислотами.

Для определения креатинина значительно реже применяется реакция с 3,5-динитробензойной кислотой. Образующаяся в ходе реакции окраска мало стабильна. Методы с примени-

ем о-нитробензальдегида и реакции Сакагучи трудоемки. Ферментативные методы определения креатинина с применением ферментов — аминогидролазы, креатинкиназы, пируваткиназы, лактатдегидрогеназы — дорогостоящие и неабсолютно специфичные.

Наиболее правильные результаты дает метод масс-фрагментографии, сочетающий газовую хроматографию и масс-спектрометрию; данный принцип может быть положен в основу референтного метода.

Унификация методов. В качестве унифицированного в 1972 г. утвержден метод, основанный на реакции Яффе (метод Поппера).

В основу набора Био-Ла-Тест «Креатинин» (народное предприятие «Лаксма», ЧССР) положена реакция Яффе с осаждением белков сыворотки трихлоруксусной кислотой. Концентрация реактивов дана в таком соотношении, которое дает возможность получить величину pH реакционной смеси 12,4.

Унифицированный метод по цветной реакции Яффе (метод Поппера). Принцип. Креатинин реагирует с пикриновой кислотой в щелочной среде с образованием окрашенных соединений.

Р е а к т и в ы . 1. Пикриновая кислота, насыщенный раствор. Товарная пикриновая кислота содержит 15—20 % влажности; кислоту не сушить! Взрывоопасно! В 100 мл воды растворяют 2 г пикриновой кислоты при нагревании в горячей бане. После этого раствор оставляют стоять на 24 ч, периодически перемешивая. Затем раствор фильтруют. Реактив стабилен. Хранят в темной посуде. 2. HCl, 0,1 моль/л. 3. Основной калибровочный раствор креатинина, 10 ммоль/л: 113,1 мг креатинина доводят до 100 мл 0,1 моль/л раствором HCl. Хранят в холодильнике в посуде с притертой пробкой. Для определения креатинина в сыворотке крови рабочий калибровочный раствор получают разведением основного раствора водой в 100 раз; 1 мл раствора содержит 0,1 ммоль креатинина. 4. Натр едкий, 2,5 моль/л.

М а т е р и а л для исследования. Сыворотка крови, моча. В качестве консервантов для мочи можно использовать тимол и толуол.

Ход определения. Определение креатинина в сыворотке крови: 2 мл сыворотки смешивают с 6 мл насыщенного раствора пикриновой кислоты. Через 5 мин пробирку помещают на 15—20 с в кипящую водяную баню, затем центрифугируют. К 4 мл центрифугата добавляют 0,2 мл 2,5 моль/л раствора едкого натра и тщательно смешивают. Иногда после подщелачивания раствор мутнеет вследствие выпадения фосфатов. В этом случае раствор еще раз центрифугируют. Затем раствор доводят до объема 10 мл водой. Через 10 мин (не позже 20 мин) измеряют в кювете с толщиной слоя 2 см при длине волны 500—560 нм (зеленый светофильтр) против холостой пробы.

Холостая проба: 3 мл насыщенного раствора пикриновой кислоты и 0,2 мл 2,5 моль/л раствора едкого натра доводят до объема 10 мл водой.

Р а с ч е т производят по калибровочному графику.

Построение калибровочного графика: из рабочего калибровочного раствора креатинина готовят разведения, как указано ниже.

№ пробирки	Рабочий калибровочный раствор креатинина, мл	Раствор пириновой кислоты, мл	2,5 моль/л раствор едкого натра, мл	Дистиллированная вода, мл	Концентрация креатинина в пробе, мкмоль/л
1	0,4	3,0	0,2	До объема 10 мл	40
2	0,8	3,0	0,2		80
3	1,6	3,0	0,2		160
4	2,4	3,0	0,2		240
5	3,2	3,0	0,2		320

Через 10 мин производят измерения при тех же условиях, что и опытные пробы. Калибровочная кривая линейна до 260 мкмоль/л креатинина.

Определение креатинина в моче. В мерной колбе или цилиндре вместимостью 100 мл смешивают 0,5 мл мочи (из суточного количества) с 3 мл раствора пириновой кислоты. Смесь тщательно встряхивают и добавляют 0,2 мл 2,5 моль/л раствора едкого натра. Выдерживают при комнатной температуре в течение 10 мин. Доводят объем до 100 мл водой. Измеряют на фотометре в кювете с толщиной слоя 1 см при длине волны 500—600 нм (зеленый светофильтр) против холостой пробы.

Холостая проба: 3 мл раствора пириновой кислоты и 0,2 мл 2,5 моль/л раствора едкого натра доводят водой до объема 100 мл.

Расчет производят по формуле при сравнении с калибровочной пробой.

Калибровочная проба. К 0,5 мл основного калибровочного раствора прибавляют 3 мл раствора пириновой кислоты и 0,2 мл 2,5 моль/л раствора едкого натра. Далее пробы обрабатывают так же, как опытные.

$$K = \frac{C_k \cdot E_{оп} \cdot a}{E_k \cdot b}$$

где K — количество креатинина в суточной моче, мкмоль, C_k — количество креатинина в калибровочной пробе, 50 мкмоль; $E_{оп}$ — экстинкция опытной пробы; E_k — экстинкция калибровочной пробы; a — суточное количество мочи; b — количество мочи, взятой для анализа.

Нормальные величины. В сыворотке крови: у женщин 0,044—0,088 ммоль/л, или 44—88 мкмоль/л (0,5—1 мг/100 мл); у мужчин 0,044—0,1 ммоль/л, или 44—100 мкмоль/л. Содержание креатинина в суточной моче 4,4—17,7 ммоль/сут, или 0,5—2 г/сут.

Воспроизводимость. Коэффициенты вариации составляют 5—6 %.

Литература. Popper H., Mandel F., Mayer H.— Biochem. Z., 1937, vol., 291, p. 354.

Клиническое значение. Определение креатинина проводят для исследования функции почек. Содержание его в сыворотке крови увеличивается при значительном ухудшении функции почек. Концентрация креатинина в сыворотке крови здоровых людей относительно постоянна, мало зависит от пола, возраста, диеты, и связано это с тем, что образование креатинина как конечного продукта метаболизма креатина в мышцах относительно постоянно. Это является важным условием для исследования клиренса эндогенного креатинина как меры клубочковой фильтрации.

5.3.3. Мочевая кислота

Мочевая кислота является конечным продуктом распада пуриновых оснований. Образовавшаяся мочевая кислота выделяется почками.

Методы определения. Первый метод определения мочевой кислоты был предложен O. Folin, W. Denis в 1912 г. Он основан на способности мочевой кислоты восстанавливать фосфорновольфрамную кислоту с образованием окрашенных соединений. Впоследствии метод подвергался многочисленным модификациям и до настоящего времени остается одним из наиболее распространенных. К другим веществам, которые восстанавливаются мочевой кислотой и применяются для ее определения, относятся мышьяковомолибденовая кислота, железосинеродистый калий. Однако эти методы не являются специфичными. Ряд веществ (цистеин, триптофан, тирозин) вызывают интерференцию в данном методе. Повысить специфичность методов можно предварительным применением ионообменной хроматографии.

Наиболее специфичными являются ферментативные, уриказные методы. Они основаны на расщеплении мочевой кислоты уриказой до аллантаина, CO_2 и H_2O , с последующей индикаторной реакцией. Результаты реакции можно измерить следующими способами: измерением потребления кислорода, что требует специальной аппаратуры; измерением абсорбции мочевой кислоты при 293 нм (образовавшийся в результате реакции аллантаин не поглощает света при 293 нм); измерением образовавшейся перекиси водорода. На ферментативном принципе основан флуориметрический метод определения мочевой кислоты, а также потенциометрический метод с иммобилизованной уриказой.

Прямое спектрофотометрическое определение мочевой кислоты в сыворотке крови основано на измерении поглощения, обусловленного мочевой кислотой при 282—295 нм. Максимум поглощения зависит от pH среды. Наиболее распространенным методом определения мочевой кислоты в практических лабораториях является фосфорновольфрамовый метод, который утвержден в 1979 г. в качестве унифицированного.

Унифицированный метод по реакции с фосфорновольфрамовым реактивом. Принцип. Мочевая кислота восстанавливает фосфорно-

вольфрамовый реактив с образованием соединения голубого цвета.

Р е а к т и в ы . 1. Серная кислота, 0,35 моль/л: к 200 мл воды добавляют 10 мл концентрированной серной кислоты отн. плотности 1,84 и доводят объем водой до 500 мл. 2. Натрий вольфрамвоокислый двухводный ($\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) ч.д.а., 100 г/л: растворяют 50 г вольфрамвоокислого натрия в небольшом количестве воды и доводят объем до 500 мл. 3. Натрия карбонат ч.д.а., 103 г/л: растворяют 51,5 г натрия карбоната в небольшом количестве воды и доводят объем до 500 мл. 4. Ортофосфорная кислота, 85 %, ч.д.а. 5. Лития сульфат ($\text{Li}_2\text{SO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) ч.д.а. 6. Лития карбонат (Li_2CO_3) ч.д.а. 7. Фосфорновольфрамовый реактив; в круглодонную колбу вместимостью 1,5 л вносят 40 г вольфрамвоокислого натрия и 300 мл воды. Добавляют 32 мл 85 % ортофосфорной кислоты и несколько стеклянных бусинок. Осторожно кипятят в течение 2 ч на песочной или глицериновой бане с обратным холодильником. Охлаждают до комнатной температуры и доливают водой до 1 л. Добавляют 32 г сульфата лития. Раствор стабилен при хранении в холодильнике. 8. Мочевая кислота, имп. 9. Формалин, не менее 37,5 %, фарм. 10. Основной калибровочный раствор мочевой кислоты, 6 ммоль/л: растворяют 0,6 г карбоната лития в 150 мл воды, фильтруют и нагревают до 60 °С. Взвешивают 1,017 г мочевой кислоты, вносят в предварительно нагретую колбу вместимостью 1 л, вливают теплый раствор карбоната лития и быстро встряхивают. После растворения мочевой кислоты колбу охлаждают до комнатной температуры, добавляют 20 мл раствора формалина, наливают 300—350 мл воды. Добавляют несколько капель раствора метилового оранжевого, затем встряхивают, медленно добавляют 20—22 мл 0,35 моль/л серной кислоты до изменения цвета в розовый. Доливают колбу до метки водой. Раствор стабилен при хранении в холодильнике в посуде из темного стекла; 1 мл раствора содержит 0,006 ммоль мочевой кислоты. 11. Рабочий калибровочный раствор мочевой кислоты, 0,03 ммоль/л: 1 мл основного калибровочного раствора доводят до 200 мл водой. Стабилен в течение 2 нед при хранении в холодильнике.

М а т е р и а л для исследования. Сыворотка, свободная от гемолиза.

Х о д определения. Опытная проба: к 8 мл воды добавляют 1 мл сыворотки, 0,5 мл 0,35 моль/л серной кислоты и перемешивают. Затем добавляют 0,5 мл раствора вольфрамвоокислого натрия и тщательно перемешивают. Через 5—10 мин фильтруют. К 3 мл фильтрата добавляют 1,5 мл раствора натрия карбоната, перемешивают. Затем добавляют 1 мл фосфорновольфрамового реактива, перемешивают, переворачивая пробирку. Через 30 мин измеряют в кювете с толщиной слоя 1 см при длине волны 590—700 нм (красный светофильтр) против холостой пробы. Холостую пробу ставят так же, как опытную, но вместо фильтрата берут 3 мл воды.

Р а с ч е т ведут по формуле при сравнении с калибровочной пробой.

Калибровочную пробу ставят и измеряют так же, как опытную, но вместо фильтрата берут 3 мл рабочего калибровочного раствора.

Концентрация мочевой кислоты, ммоль/л =

$$= \frac{E_{\text{оп}}}{E_{\text{к}}} C_{\text{к}} \cdot 10,$$

где $E_{\text{оп}}$ — экстинкция опытной пробы; $E_{\text{к}}$ — экстинкция калибровочной пробы; $C_{\text{к}}$ — концентрация рабочего калибровочного раствора, 0,03 ммоль/л; 10 — пересчет на объем сыворотки (в опытную пробу берут 0,3 мл, т.е. в 10 раз меньше, чем в калибровочную пробу).

Н о р м а л ь н ы е величины. Мужчины: 0,24—0,50 ммоль/л, или 4,0—8,5 мг/100 мл; женщины: 0,16—0,4 ммоль/л, или 2,8—7,5 мг/100 мл.

В о с п р о и з в о д и м о с т ь. Коэффициенты вариации находятся в пределах 3—5 %.

Л и т е р а т у р а. Henry R. J., Sobel C., Kim J. Amer. J. din. Pathol., 1957, vol. 28, p. 152.

К л и н и ч е с к о е значение. Повышение содержания мочевой кислоты в крови наблюдается при нарушении ее выделения из организма (заболевания почек, ацидоз, токсикоз беременности); повышенном образовании пуринов (некоторые гематологические заболевания, прием пищи, богатой пуринами).

5.3.4. Аминокислоты и пептиды

В крови содержатся свободные аминокислоты экзогенного и эндогенного происхождения. Концентрация их в сыворотке крови невелика. С диагностической целью определяют как отдельные аминокислоты, так и общий аминный азот. Наибольшее клиническое значение имеет определение таких аминокислот, как фенилаланин, оксипролин, цитруллин. Для определения свободных аминокислот применяют: хроматографию на бумаге, ионообменную хроматографию и фотометрические методы. Чаще всего определение аминокислот проводят на аминокислотных анализаторах в соответствии с прилагаемой к прибору инструкцией.

Кровь содержит также в небольшом количестве полипептиды, которые поступают из кишечника при переваривании белков и образуются эндогенно как продукты распада белков тканей.

Многие из полипептидов, циркулирующие в биологических жидкостях, относятся к биологически активным веществам, и их определение имеет большое клиническое значение. Методы их определения будут описаны соответственно в других главах.

Хроматографическое разделение на бумаге по Бодэ—Гири. **П р и н ц и п**. В основе разделения лежат различия в степени адсорбции аминокислот и растворимости их в соответствующем растворителе. После разделения аминокислоты с нингидрином в слабокислой среде дают синее окрашивание с последующим прев-

рашением полученного синего производного в стабильное медное производное оранжево-красного цвета, имеющее максимум поглощения при 530 нм. Метод позволяет определить все аминокислоты, за исключением пролина и оксипролина.

Реактивы. 1. н-Бутиловый спирт. 2. Уксусная кислота ледяная. 3. Смесь бутилового спирта, уксусной кислоты и воды (в объемных соотношениях 4 : 1 : 5): смешивают в мерном цилиндре 40 мл бутилового спирта, 10 мл ледяной уксусной кислоты и 50 мл воды. Смесь переносят в делительную воронку. После расслаивания берут верхний слой и используют его в качестве подвижного растворителя. Нижний слой используют для насыщения хроматографической камеры. 4. Смесь бутилового спирта, уксусной кислоты и воды (в объемных соотношениях 40: 15:5). Смесь используют в качестве подвижного растворителя. 5. Ацетон. 6. Нингидрин, раствор 5 г/л в ацетоне. Хранят в темной склянке. Перед определением смешивают 95 частью 5 г/л раствора нингидрина в ацетоне с 1 частью ледяной уксусной кислоты и 4 частями воды. 7. Этиловый спирт 96 %. 8. Меди сульфат 5-водный, насыщенный раствор в 75 % этиловом спирте. Перед употреблением раствор фильтруют. 9. Набор аминокислот, растворы 0,01 моль/л. 10. HCl концентрированная. 11. Солянокислый ацетон: 1 мл концентрированной HCl смешивают с 99 мл ацетона. 12. Диэтиловый эфир.

Специальное оборудование. 1. Хроматографические камеры. В качестве хроматографической камеры могут быть использованы высокие стеклянные банки с пришлифованной стеклянной крышкой диаметром 25 см и больше, высотой 50—60 см. 2. Хроматографические кюветы. Для получения нисходящих хроматограмм растворитель наливают в хроматографическую кювету, представляющую собой трубку диаметром 2—4 см и имеющую по длине щель шириной 3—6 мм. Трубка имеет оправу из стеклянных палочек, через которые перекидывается бумага. 3. Бумага. Для разделения аминокислот используют хроматографическую фильтровальную бумагу марки «быстрая» (Б). Для количественного определения аминокислот может быть использована только бумага, освобожденная от катионов металлов, мешающих точному количественному определению аминокислот на хроматограммах. Для удаления катионов металлов из бумаги последнюю обрабатывают раствором 8-оксихинолина или трилона Б (динатриевая соль этилендиаминтетрауксусной кислоты).

Материал для исследования.
Получение концентрированного безбелкового экстракта сыворотки крови: предварительная подготовка сыворотки крови для количественного определения аминокислот сводится к получению экстракта сыворотки крови, свободного от белков и солей, мешающих хроматографическому разделению аминокислот, и сгущению безбелкового экстракта. Для этого порошок, полученный из 2 мл сыворотки, высушенной лиофилизацией или в вакуумном эксикаторе над безводным хлоридом кальция, помещают в цент-

рифужную пробирку с притертой пробкой и экстрагируют 3 раза (каждый раз в течение 1 ч) 8 мл солянокислого ацетона. Нерастворимый осадок отделяют центрифугированием. Надосадочную жидкость (всего 24 мл) выпаривают досуха в фарфоровой чашке на водяной бане при 40 °С. Сухой остаток растворяют в 1 мл воды и и обрабатывают 2 мл эфира для удаления липидов. После отделения эфира водный раствор помещают в фарфоровую чашку и сгущают досуха. Сухой остаток растворяют в 0,2 мл воды. На хроматограмму наносят 40 мкл экстракта порциями по 5 мкл.

Получение одномерных хроматограмм сыворотки крови. На лист бумаги, промытой раствором 8-оксихинолина, наносят в 2 точках по 40 мкл полученного экстракта сыворотки крови. В третью точку наносят 5 мкл 0,01 моль/л раствора аминокислот «свидетелей». В качестве растворителя используются смеси: н-бутанол, уксусная кислота, вода (в соотношении 4:1:5) и н-бутанол, уксусная кислота, вода (40: 15:5). Наиболее четкое и полное разделение аминокислот сыворотки крови достигается при трехкратном пропускании обеих смесей (в этом случае после каждого пропускания растворителя бумагу высушивают на воздухе и снова помещают в хроматографическую камеру). После последнего пропускания растворителя хроматограмму высушивают при комнатной температуре в течение 2 ч. Следует придерживаться одного и того же времени сушки хроматограмм, что обеспечивает лучшее совпадение результатов отдельных определений.

Ход исследования. Хроматограмму, освобожденную путем высушивания от избытка растворителя, погружают на несколько секунд в 5 г/л раствор нингидрина в ацетоне, просушивают в течение нескольких минут на воздухе и прогревают в течение 10 мин при 50 °С в сушильном шкафу для развития окраски. Далее хроматограммы высушивают в течение суток на воздухе. Затем вырезают участки хроматограмм с фиолетовыми пятнами аминокислот, разрезают их на мелкие кусочки и помещают в пробирки с притертыми пробками. В пробирку добавляют 2,5 мл насыщенного раствора сульфата меди в этиловом спирте. При этом фиолетовая окраска аминокислот переходит в оранжево-красную в результате образования комплексного соединения с медью, которое растворяется в 75 % этаноле и экстрагируется из бумаги. Пробирки закрывают пробками и содержимое их тщательно перемешивают для полноты экстракции окрашенного продукта. Экстракцию продолжают в течение часа в темноте при комнатной температуре. Одновременно с пятнами аминокислот вырезают из бумаги контрольные участки, равные по площади опытным, и обрабатывают их точно таким же образом. Интенсивность окраски измеряют на фотоколориметре при 500—530 нм (зеленый светофильтр) в кюветах с толщиной слоя 5 мм против контрольной пробы.

Расчет аминокислот проводят по калибровочным графикам, которые строят по калибро-

вечным растворам аминокислот. Дальнейший расчет проводят по формуле:

$$A = \frac{a \cdot c \cdot 1000}{b \cdot d},$$

где A — количество аминокислоты, мгк/л сыворотки; a — количество аминокислоты в пробе, найденное по калибровочному графику, мкг; b — количество экстракта, взятое для хроматографирования, мкл; c — общее количество экстракта, мкл; d — количество сыворотки (мл), соответствующее общему количеству экстракта.

Построение калибровочных графиков. Для построения калибровочных графиков готовят растворы аминокислот 0,01 моль/л, содержащие в 1 мкл 0,01 мкмоль каждой аминокислоты. На бумагу наносят 5; 10; 15 и 20 мкл калибровочного раствора аминокислот порциями по 5 мкл. Каждая точка графика будет соответствовать 0,05; 0,10; 0,15; 0,20 мкмоль аминокислоты. Линейная зависимость между концентрацией вещества и интенсивностью окраски сохраняется при концентрациях от 0,025 до 0,2 мкмоль для каждой аминокислоты.

Разделение смеси калибровочных растворов аминокислот проводят при строгом соблюдении всех условий хроматографирования и определения описанных выше. На основании найденной величины оптической плотности и взятых концентраций аминокислот строят калибровочные графики.

Большинство аминокислот, за исключением фенилаланина, аспарагиновой кислоты, тирозина, имеют очень близкие величины молярной оптической плотности, поэтому для их количественного определения можно пользоваться общим графиком.

Нормальные величины в сыворотке крови по данным различных авторов (даны пределы колебаний в мг/л): лейцин — 12—19; фенил-аланин — 10—28; валин — 13—29; тирозин — 4—20; аланин — 18—50; глутаминовая кислота — 7—49; глицин — 10—39; серин — 4—18; аспарагиновая кислота — 0,3—9,8; цистин — цистеин — 15—38; метионин — 3,8; триптофан — 11,1; гистидин — 11—30; орнитин — 7,2; лизин — 8—30; аргинин — 8—15; цитруллин — 5.

5.4. ПИГМЕНТЫ

Пигменты, или окрашенные соединения небелкового характера, могут находиться в организме человека в свободном и связанном состоянии.

Основными структурными компонентами пигментов являются пиррольные кольца, связанные между собой метиновыми группами (= $\text{C}=\text{N}$). С диагностической целью в биологических жидкостях определяют пигменты красного цвета — порфирины и желчные пигменты. Биосинтез иорпоринов происходит практически в каждой клетке живого организма, однако в свободном состоянии находится очень

Клиническое значение. Содержание аминокислот в крови увеличивается при экссудативном диатезе, заболеваниях печени, фенилкетонурии, опухолях.

5.3.5. Индикан

Индикан представляет собой калиевую соль индоксилсерной кислоты.

Методы определения. В практических лабораториях чаще применяют качественное исследование (обнаружение) индикана в моче. Наиболее распространенной является проба Обермейера, основанная на образовании синего и красного индиго. Среди других исследований применяют пробы с тимолом, а-нафтолом.

Проба Обермейера. Принцип. Индикан превращают в индоксил, в результате окисления которого образуется синее индиго (индиготин) и красное индиго (индигорубин).

Реактивы. 1. Свинца ацетат, 100 г/л. 2. Железо хлорное. 3. HCl концентрированная, отн. плотность 1,19. 4. Реактив Обермейера: 0,2—0,4 г хлорного железа и 100 мл HCl концентрированной. 5. Хлороформ.

Ход обнаружения. Несколько миллилитров мочи смешивают с раствором ацетата свинца в соотношении по объему 1 : 10, фильтруют. Смешивают 1—2 мл фильтрата с реактивом Обермейера в соотношении 1:1, прибавляют 0,5—1 мл хлороформа.

Оценка результатов. Если слой хлороформа окрашивается в синий или красный цвет, проба положительная.

Норма. Индикан содержится в моче в незначительном количестве и не обнаруживается качественными пробами.

Примечание. При наличии солей йода в моче образуется красно-фиолетовая окраска хлороформа, которая исчезает после прибавления раствора тиосульфата натрия.

Клиническое значение. Увеличение содержания индикана в моче происходит при заболеваниях, связанных с усилением распада белка, или при интенсивном гниении белковых веществ в кишечнике.

незначительное их количество. Основное содержание порфиринов приходится на долю гемопротеидов. Гем представляет собой протопорфирин, связанный с двухвалентным железом. Желчными пигментами называют продукты распада гемоглобина и других хромопротеидов. К желчным пигментам относятся билирубины и уробилиноиды. При распаде гемоглобина разрывается порфириновое кольцо тема, связь между ним, железом и белковой частью молекулы гемоглобина нарушается, образуется биливердин, который восстанавливается до основного желчного пигмента — билирубина.

5.4.1. Билирубин

Билирубин — желто-красный пигмент; представляет собой линейный тетрапиррол. Большая часть его в организме образуется в ретикулоэндотелиальной системе печени и селезенки при распаде гемоглобина, миоглобина, цитохромов. Образовавшийся в клетках ретикулоэндотелия билирубин плохо растворим в воде, является токсическим веществом, медленно реагирует с диазореактивом, что требует добавления акселератора, поэтому он называется непрямореагирующим. При поступлении его с током крови в печень в гепатоцитах происходит его обезвреживание путем присоединения глюкуроновой кислоты. Диглюкуронид билирубина в отличие от свободного билирубина — вещество индифферентное, растворим в воде и быстро реагирует с диазореактивом, т. е. является прямореагирующим. Конъюгирование билирубина в гепатоците с образованием диглюкуронида и небольшого количества моноглюкуронида протекает с помощью фермента уридиндифосфоглюкуронилтрансферазы (УДФГА). Гепатоциты обладают также способностью удалять связанный с глюкуроновой кислотой билирубин. Это обусловлено главным образом свойствами мембраны гепатоцита и наличием в цитоплазме гепатоцита специального белка (лигандина). Выделение билирубина происходит с желчью, вместе с желчью билирубин попадает в пищеварительный тракт, где происходит его дальнейшее превращение. В сыворотке крови содержится билирубин, связанный с глюкуроновой кислотой, или прямореагирующий (диглюкуронид или моноглюкуронид); и билирубин, не связанный с глюкуроновой кислотой, или непрямореагирующий. Обе фракции билирубина в сыворотке крови могут находиться в свободной форме или в виде комплексов, соединенных с фосфолипидами или альбумином (связывающая способность альбумина сыворотки составляет 2 моля билирубина на 1 моль альбумина).

Комплексы связанного билирубина с фосфолипидами могут встречаться в сыворотке крови при длительной закупорке желчных путей. Их можно экстрагировать из сыворотки эфиром (эфирорастворимый билирубин). Свойства связанного билирубина обуславливают появление желтухи при значительно более низких цифрах его в крови по сравнению с концентрацией несвязанного билирубина. У новорожденного активность фермента УДФГА во много раз ниже, чем у взрослых, ниже и уровень белка лигандина, что является причиной физиологической желтухи новорожденных.

Методы определения билирубина. Для исследования общего билирубина и его фракций применяются прямые спектрофотометрические методы, фотометрические методы после окисления, диазометоды, электрохимические методы с использованием платинового и ртутного электродов, хроматографическое разделение отдельных фракций билирубина. Прямые спектрофотометрические методы основаны на измерении абсорбции билирубина при 440—460 нм. Главным источником ошибок в них является интер-

ференция желтых небилирубиновых пигментов. Определение билирубина после окисления основано на образовании пигментов, имеющих различную окраску. Методы этой группы отличаются низкой чувствительностью, низкой точностью и позволяют определить лишь общий билирубин.

Диазометоды основаны на взаимодействии билирубина с диазотированной сульфаниловой кислотой с образованием азопигментов, этими методами определяются количественно две основные фракции билирубина. Связанный билирубин дает быструю (прямую) реакцию азосочетания. Реакция несвязанного билирубина значительно медленнее. Ее ускоряют вещества-акселераторы: гидроокись натрия, желчные кислоты и их соли, некоторые органические кислоты и их соли, мочевины, кофеин, ацетамид, смесь HCl и диметилсульфоксида, смесь антипирина, мочевины и ацетата натрия, этиленгликоль и другие вещества. Акселераторы освобождают билирубин из белковых комплексов и тем самым ускоряют реакцию азосочетания. Связанный билирубин соединен с альбумином значительно менее прочно, чем несвязанный, что обуславливает характер реакции.

Азокраситель, образовавшийся при азосочетании билирубина с диазотированной сульфаниловой кислотой, ведет себя как кислотно-основной индикатор с несколькими цветными переходами. В сильно кислой среде раствор азокрасителя окрашен в фиолетовый цвет, в слабокислой и слабощелочной среде — в розовый, в сильно щелочной среде — в синий. Определение билирубина в сильно щелочной среде значительно повышает чувствительность метода. Азобилирубин обладает свойствами комплексобразования, что повышает интенсивность окраски. На практике для определения билирубина можно пользоваться азокомплексами с медью и цинком.

Первый азобилирубиновый метод предложен Van den Berg в 1916 г. В оригинальном методе Ван ден Берга не применяются акселераторы; содержание фракций билирубина количественно этим методом не определяется. Наиболее распространенными и приемлемыми являются диазометоды с применением в качестве акселераторных веществ смеси кофеина с бензоатом натрия и ацетатом натрия, а также метанола. Принцип первого способа положен в основу метода Ендрассика—Грофа, принцип второго — в основу метода Маллоя—Евелина. В настоящее время в автоанализаторах применяется кинетическое определение билирубина, основанное на различных кинетических свойствах связанного и несвязанного билирубина.

Оптимизация условий определения и унификация методов. Метод Ендрассика—Грофа утвержден приказом Министерства здравоохранения СССР в 1972 г. в качестве унифицированного. Данный принцип положен в основу большинства коммерческих наборов реактивов, в частности набора реактивов, выпускаемого «Лаксма» (ЧССР). Концентрация сульфаниловой кислоты не оказывает заметного влияния на скорость реакции диазосочетания и на чувстви-

тельность метода. Однако молярное соотношение сульфаниловой кислоты к нитриту в реакционной смеси не должно быть менее 3 : 1. В наборе реактивов Био-Ла-Тест («Лахема», ЧССР) такое соотношение равно 5 : 1; в унифицированном методе 14 : 1. Избыток сульфаниловой кислоты не влияет на азокраситель. Наибольшая чувствительность достигается при pH 5,4. Снижение концентрации кофеина в 10 раз не оказывает существенного влияния на результаты.

Унифицированный метод по диазореакции в присутствии акселератора (метод Ендрасика—Клеггорна—Грофа). П р и н ц и п. Под воздействием HCl разрывается тетрапирроловая связь билирубина и образуются два дипиррола, которые диазотируются диазобензосульфоновой кислотой с образованием розово-фиолетового азобилирубина. Связанный билирубин реагирует быстро, несвязанный билирубин реагирует после добавления кофеинового реактива.

Р е а к т и в ы. 1. Кофеин, фарм. 2. Натрия бензоат ч. 3. Натрия ацетат 3-водный ч.д.а. или х.ч. 4. Кофеиновый реактив: 5 г кофеина, 7,5 г бензоата натрия, 12,5 г ацетата натрия растворяют в 90 мл воды, нагревают до 50—60 °С, хорошо перемешивают. После охлаждения доводят водой до 100 мл. Раствор стабилен в течение 2 нед. 5. Натрия хлорид ч.д.а. или х.ч., 154 ммоль/л (изотонический раствор): 0,9 г хлорида натрия помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл и доводят до метки водой. 6. HCl концентрированная ч.д.а. или х.ч. 7. Сульфаниловая кислота ч.д.а. 8. Диазосмесь. Диазореактив I: 5 г сульфаниловой кислоты растворяют при нагревании в 300—400 мл воды, прибавляют 15 мл концентрированной HCl. Если сульфаниловая кислота полностью не растворяется, колбу помещают в теплую воду и помешивают. Только после растворения и охлаждения раствор доливают водой до 1 л. Реактив стабилен при хранении в посуде из темного стекла. Диазореактив II: натрия нитрит ч.д.а. или х.ч., 5 г/л (0,07 моль/л): 0,5 г нитрита натрия помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл и доводят водой до метки. Реактив стабилен в течение 2—3 нед при хранении в посуде из темного стекла. Перед работой смешивают 10 мл диазореактива I и 0,3 мл диазореактива II. 9. Билирубин для построения калибровочного графика, 800 мг/л, или 1368 мкмоль/л. Коммерческие препараты кристаллического билирубина содержат разные примеси, которые могут мешать реакции азосочетания. Рекомендуется использовать набор Био-Ла-Тест «Билирубин-эталон» (ЧССР), содержащий билирубин высокой степени чистоты с коэффициентом молярной экстинкции не менее $6,05 \cdot 10^4$ л·моль⁻¹·см при 453 нм и растворении в хлороформе. Растворы билирубина нестойкие, поэтому их готовят с добавлением белка в качестве стабилизатора. Коммерческие препараты билирубина не связаны с глюкуроновой кислотой. 10. Натрия карбонат, 0,1 моль/л: 10,6 г безводного Na₂CO₃ растворяют и доводят до 1 л водой. 11. Уксусная кислота, 4 моль/л: 25 мл ледяной уксусной кислоты доводят до 100 мл водой.

М а т е р и а л д л я и с с л е д о в а н и я .

Сыворотка крови, свободная от гемолиза. Сыворотку хранят в холодном темном месте не более 12 ч.

Ход определения. В 3 пробирки (2 опытные пробы и холостая) вводят реактивы, как указано в схеме.

Ингредиенты	Опытная проба, мл		Холостая проба, мл
	общий билирубин	связанный билирубин	
Сыворотка	0,5	0,5	0,5
Кофеиновый реактив	1,75	—	1,75
Раствор хлорида натрия	—	1,75	0,25
Диазосмесь	0,25	0,25	♦♦

Для определения связанного билирубина измерение проводят спустя 5—10 мин после добавления диазосмеси, так как при длительном стоянии в реакцию вступает несвязанный билирубин. Для определения общего билирубина пробу для развития окраски оставляют стоять 20 мин, после чего измеряют на фотометре. При дальнейшем стоянии окраска не изменяется.

Измерение проводят при длине волны 500—560 нм (зеленый светофильтр) в кювете с толстойной слоя 0,5 см против воды. Из показателей, полученных при измерении общего и связанного билирубина, вычитают показатель холостой пробы.

Расчет производят по калибровочному графику. Находят содержание общего и связанного билирубина.

П о с т р о е н и е к а л и б р о в о ч н о г о г р а ф и к а . *Способ 1 — Шелонга—Венде* с использованием стабилизирующего свойства белка сыворотки крови. Основной раствор билирубина: в колбе вместимостью 50 мл растворяют 40 мг билирубина в 30—35 мл 0,1 моль/л раствора карбоната натрия Na₂CO₃. Хорошо взбалтывают, не допуская образования пузырьков. Доводят до 50 мл 0,1 моль/л раствором Na₂CO₃ и несколько раз перемешивают. Раствор стоек только в течение 10 мин от начала приготовления. В дальнейшем происходит окисление билирубина.

Рабочий раствор билирубина: к 13,9 мл свежей негемоллизированной сыворотки здорового человека добавляют 2 мл свежеприготовленного основного раствора билирубина и 0,1 мл 4 моль/л раствора уксусной кислоты. Хорошо перемешивают. При этом выделяются пузырьки углекислого газа. Рабочий раствор стоек в течение нескольких дней. Этот раствор содержит точно на 100 мг/л, или 171 мкмоль/л, билирубина больше, чем сыворотка, взятая для приготовления раствора. Чтобы исключить при расчетах количество билирубина, содержащегося в этой сыворотке, при измерении на фотометре из величин экстинкции калибровочных проб вычитают величины экстинкции соответствующих разведений компенсационной жидкости.

Для приготовления компенсационной жидкости смешивают 13,9 мл той же сыворотки, которая использовалась для приготовления калибровочного раствора билирубина, 2 мл 0,1 моль/л раствора карбоната натрия и 0,1 мл 4 моль/л раствора уксусной кислоты. Для построения калибровочного графика готовят ряд разведенных с различным содержанием билирубина.

К полученным разведениям прибавляют по 1,75 мл кофейного реактива и по 0,25 мл диазосмеси. При появлении помутнения можно добавить по 3 капли 30 % раствора едкого натра. Измерение проводят при тех же условиях, что и в опытных пробах, через 20 мин.

Из компенсационной жидкости готовят разведения, аналогичные калибровочным (как указано ниже) и далее обрабатывают их так же, как калибровочные пробы.

№ пробирки	Рабочий раствор билирубина, мл	Изотонический раствор хлорида натрия, мл	Количество билирубина в пробе		Концентрация билирубина в сыворотке крови, мкмоль/л
			мг	мкмоль	
1	0,05	0,45	0,005	0,00855	17,1
2	0,1	0,4	0,01	0,0171	34,2
3	0,15	0,35	0,015	0,02565	51,3
4	0,2	0,3	0,02	0,0342	68,4
5	0,25	0,25	0,025	0,04275	85,5

Способ II. Калибровочный график строится по готовому набору реактивов «Билирубин-эталон» («Лахема», ЧССР).

Набор Био-Ла-Тест «Билирубин-эталон» включает: 1) билирубин лиофилизированный (точная концентрация билирубина приведена на этикетке флакона); 2) альбумин лиофилизированный. Способ приготовления растворов билирубина указан в инструкции к набору.

Калибровочная кривая линейка до 170 мкмоль/л.

Нормальные величины. В сыворотке крови содержится 8,5–20,5 мкмоль/л общего билирубина (0,5–1,2 мг/100 мл), из которого 75 % приходится на долю свободного (непрямо реагирующего) билирубина. На правильность метода влияет способ построения калибровочной кривой. Ряд веществ — гидрокортизон, андрогены, эритромицин, глюкокортикоиды, фенобарбитал, аскорбиновая кислота — вызывают интерференцию.

Литература. *Jendrassik L., Cleghorn R. Biochem'J., 1936, vol. 289, p. 1.*

Спектрофотометрический метод определения общего билирубина и его фракций (метод Эберлейна). **П р и н ц и п.** Измерение характерного для билирубина максимума абсорбции при 450 нм после фракционирования билирубина в фосфатном буфере, этилацетате и бутиловом спирте.

Р е а к т и в ы. 1. Однозамещенный фосфат натрия (NaH_2PO_4), 0,2 моль/л. 2. Натр едкий, 5 моль/л. 3. Фосфатный буфер pH 5,0; 0,2 моль/л раствор NaH_2PO_4 доводят до необходимого pH раствором едкого натра 5 моль/л. 4. Этилацетат. 5. п-Бутиловый спирт. 6. Билирубин-эталон лиофилизированный.

М а т е р и а л для исследования. Сыворотка крови, свободная от гемолита.

Ход определения. В 2 центрифужные пробирки вносят по 0,2 мл сыворотки. В первую приливают 1,8 мл фосфатного буфера и 3 мл этилацетата, во вторую — 2,2 мл фосфатного буфера и 3 мл бутанола. Пробирки закрывают, энергично встряхивают и центрифугируют 5–10 мин, после чего все три образовавшихся слоя переносят осторожно в кюветы спектрофотометра для измерения. Этилацетатный экстракт содержит свободный билирубин, бутаноловый экстракт — свободный билирубин и моноглокуронид, буферный водный слой — диглюкуронид. Каждую пробу измеряют при 450 и 575 нм (измерение при 575 нм проводят для исключения поглощения за счет гемоглобина).

Из значения экстинкции при 450 нм вычитают значение экстинкции при 575 нм. Дальнейший расчет производят по калибровочной кривой. Для построения калибровочной кривой можно использовать «Билирубин-эталон лиофилизированный» («Лахема», ЧССР), из которого готовят рабочие калибровочные растворы разной концентрации согласно инструкции. Из каждого раствора берут по 0,2 мл и добавляют соответствующий растворитель (этилацетат, п-бутанол, фосфатный буфер). Калибровочные пробы обрабатывают и измеряют при тех же условиях, что опытные пробы.

О ц е н к а р е з у л ь т а т о в. Непрямо реагирующий билирубин и моноглокуронид билирубина определяют в бутаноловом экстракте; в этилацетатном экстракте определяют прямо реагирующий билирубин; в фосфорно-буферном слое — диглюкуронид билирубина; моноглокуронид билирубина определяют по разнице содержания билирубина в бутаноловом и этилацетатном экстрактах.

Н о р м а л ь н ы е в е л и ч и н ы те же, что в унифицированном методе.

Л и т е р а т у р а. *Eberlein W. R. Pediatrics, 1960, vol. 25, p. 878.*

К л и н и ч е с к о е з н а ч е н и е. Причины, вызывающие гипербилирубинемия, различны. Желтуха появляется, когда уровень билирубина в крови превышает 43 мкмоль/л (2,5 мг/100 мл). Предложены различные классификации патологических желтух, при которых в зависимости от механизма их возникновения повышаются различные фракции билирубина.

Заболевания, вызывающие повышение связанного прямо реагирующего билирубина: вирусный гепатит, цирроз печени, опухоль печени и метастазы, жировая дистрофия, синдром Дубина—Джонсона.

Заболевания, вызывающие повышение несвязанного прямо реагирующего билирубина: гемолитическая анемия, пернициозная анемия; несвязанный билирубин бывает также повышен

при желтухе новорожденных, болезни Жильбера, синдроме Криглера—Найяра, синдроме Ротора.

При механической желтухе связанный с глюкуроновой кислотой билирубин увеличивается в основном за счет билирубиндиглюкуронида, при паренхиматозной желтухе — билирубинмоноглюкуронида. Прямо реагирующей билирубин при гемолитической желтухе новорожденных состоит главным образом из билирубинмоноглюкуронида.

5.4.2. Порфирины

Порфирины представляют собой азотистые пигменты пиррольного ряда, обладающие общей основной структурой — порфином, который состоит из 4 пиррольных колец. В зависимости от того, какими радикалами замещены атомы водорода в порфине, образуются различные типы порфиринов — уропорфирины, копропорфирины, протопорфирины. Названия «уропорфирины» и «копропорфирины» были даны по источнику их первоначального выделения. Все соединения, имеющие в основе молекулы кольцо порфирина, флуоресцируют и характеризуются интенсивным поглощением на границе видимой и ультрафиолетовой областей спектра. Восстановленные формы порфиринов называют порфириногенами. Они являются бесцветными предшественниками порфиринов. Дельта-аминолевулиновая кислота является предшественником порфобилиногена, который в свою очередь является предшественником уропорфиногена и копропорфиногена. Для порфиринов характерно наличие изомерии, что обусловлено различным расположением радикалов.

Порфирины входят в состав ряда сложных белков: гемоглобина, миоглобина, цитохромов, каталазы.

Определение порфиринов в биологическом материале имеет диагностическое значение при ряде патологических состояний — анемиях, гепатите, отравлении свинцом и особенно при порфириях. Повышение содержания порфиринов может быть связано с увеличением их синтеза в различных клетках организма или недостаточностью ферментов, участвующих в их обмене. Порфирии представляют собой заболевания, чаще всего обусловленные генетическим нарушением функций различных ферментных систем. Существуют различные формы порфирии — печеночная, эритропоэтическая и др.

Методы определения порфиринов. Исследование порфиринов в биологическом материале представляет определенные трудности, так как содержание их невелико, существуют разные типы порфиринов, их изомеры, определение которых требует применения специфических и высокочувствительных методов. Количественные методы определения порфиринов сложны и требуют наличия дорогостоящей аппаратуры — спектрометров, флуорометров. Качественные пробы существуют лишь для немногих видов порфиринов. Пурпурно-красная окраска мочи, а также обнаружение оранжевой или красной

флуоресценции в ультрафиолетовом свете характерны для наличия порфиринов. В норме с мочой выделяется их немного — до 30 мкг/сут.

5.4.3. Порфобилиноген

Методы определения порфобилиногена (ПБГ) и дельта-аминолевулиновой кислоты в моче основаны на их разделении с помощью адсорбции на колонках с ионообменной смолой, окисью алюминия, каменным углем и др. После разделения для определения дельта-аминолевулиновой кислоты применяют метод, основанный на реакции с реактивом Эрлиха — п-диметиламинобензальдегидом или на модифицированной реакции Яффе с щелочным пикратом.

Для определения порфобилиногена в моче применяют прямой метод с реактивом Эрлиха и непрямой метод после выделения порфобилиногена при помощи адсорбции на колонке с окисью алюминия. В качественной пробе Ватсона—Шварца с реактивом Эрлиха вызывают интерференцию — уробилиноген, производные индола, скатола и других веществ. Для повышения специфичности пробы добавляют ацетат натрия и проводят экстракцию хлороформом и бутанолом. При добавлении ацетата натрия образуется *слабая* уксусная кислота, в то время как для реакции индола и скатола с реактивом Эрлиха необходимо присутствие сильных минеральных кислот. После экстракции хлороформом в водной фазе, помимо порфобилиногена, могут остаться и другие вещества (меланоген, оксопирролдикарбоксильная кислота и др.). Для их удаления применяют экстракцию бутанолом, в котором растворяются вещества, интерферирующие реакцию. Порфобилиноген-альдегид - соединение, образующееся при взаимодействии порфобилиногена и реактива Эрлиха, не растворяется ни в хлороформе, ни в бутаноле. Предложены и другие способы экстракции, например смесью амилбензила. Метод обнаружения порфобилиногена в моче реакцией с п-диметиламинобензальдегидом утвержден в качестве унифицированного в 1979 г.

Унифицированный метод по реакции с п-диметиламинобензальдегидом. П р и н ц и п . Порфобилиноген (ПБГ) реагирует с п-диметиламинобензальдегидом с образованием окрашенного в красный цвет соединения.

Р е а к т и в ы . 1. п-Диметиламинобензальдегид. 2. HCl концентрированная х.ч. 3. Реактив Эрлиха: 0,7 г п-диметиламинобензальдегида растворяют в 150 мл концентрированной HCl, приливают к 100 мл воды и смешивают. Раствор должен быть бесцветным или слегка желтым. Хранят в посуде из темного стекла. Реактив стабилен. 4. Натрия ацетат 3-водный х.ч., ч.д.а., насыщенный раствор: 375 г ацетата натрия 3-водного (или 226 г безводной соли) растворяют в 250 мл теплой воды, охлаждают до комнатной температуры. Хранят при комнатной температуре. Раствор должен быть бесцветным и прозрачным. 5. Хлороформ. 6. Бутиловый спирт. 7. Бумага индикаторная для измерения pH (в интервале 4,0—5,0).

Материал для исследования. Моча в первые 2—3 ч после мочеиспускания.

Ход обнаружения и оценка результатов. Смешивают в пробирке 2,5 мл реактива Эрлиха и 2,5 мл мочи. Добавляют 5 мл насыщенного раствора ацетата натрия и перемешивают. Измеряют рН индикаторной бумагой; значение рН должно быть в интервале 4,5—5,0; если рН меньше 4,0 добавляют раствор ацетата натрия для установления нужного рН. Если окраски не образуется — результат отрицательный. При образовании розовой или красной окраски добавляют 5 мл хлороформа и встряхивают. Если окраска переходит в слой хлороформа, а верхний водный слой становится бесцветным или желтым — результат отрицательный. При сохранении окрашивания водной фазы переносят 6—8 мл водного слоя в другую пробирку, добавляют бутиловый спирт в соотношении 2 : 1 и встряхивают. Обычно фазы разделяются быстро; в противном случае смесь центрифугируют. При переходе окраски в бутиловый слой — результат отрицательный. Если водная часть остается окрашенной — результат положительный для ПБГ.

Нормальное значение. В норме ПБГ в моче не обнаруживается (0—2 мг/л). Данным методом ПБГ обнаруживается при концентрации, превышающей 6 мг/л.

Примечание. При хранении мочи свыше 3 ч при комнатной температуре реакция может стать ложноотрицательной, что, по-видимому, связано с превращением ПБГ в порфирины и образованием ингибиторов реакции. Если нет возможности исследовать мочу в первые 2—3 ч, ее хранят в холодильнике при 4 °С или в замороженном состоянии. При хранении в холодильнике и доведении рН мочи до 6,0—7,0 ПБГ стабилен длительное время.

Литература. *Clinical chemistry. Principles and technics.* 2ed/Eds. R.J. Henry, D. C. Cannon, J. W. Winkelman.— Hagerstown etc.: Harper and Row, 1974, p. 1251—1263.

Клиническое значение. Увеличение выделения ПБГ с мочой наблюдается при острой перемежающейся порфирии, при анемиях, связанных с нарушением порфиринового обмена, при свинцовой интоксикации.

5.4.4. Дельта-аминолевулиновая кислота

Унифицированный метод по реакции с п-диметиламинобензальдегидом. Принцип. Дельта-аминолевулиновая кислота (АЛК) определяется по реакции с реактивом Эрлиха после удаления ПБГ и других мешающих определению веществ сорбированием их на активированном угле.

Реактивы. 1. Уксусная кислота ледяная х.ч. 2. Хлорная кислота, 57 %, х.ч. 3. Натрия ацетат 3-водный х.ч. 4. Дельта-аминолевулиновой кислоты гидрохлорид ч. 5. Уголь активированный с дисперсностью 0,25—1 мм. 6. Ацетил-

ацетон ч.д.а. 7. п-Диметиламинобензальдегид ч. 8. Раствор А: 11,55 мл ледяной уксусной кислоты разводят водой в мерной колбе вместимостью 1 л. 9. Раствор Б: 27,2 г ацетата натрия растворяют в воде в мерной колбе вместимостью 1 л. 10. Ацетатный буфер рН 3,6: готовят, смешивая 463 мл раствора А и 37 мл раствора Б; доводят до метки водой в мерной колбе вместимостью 1 л. 11. Калибровочный основной раствор АЛК, 0,75 ммоль/л (100мкг/мл) в пересчете на основание: 0,00635 г АЛК гидрохлорида растворяют в ацетатном буфере рН 3,6 в мерной колбе вместимостью 50 мл. Хранят в холодильнике не более месяца. 12. Рабочий калибровочный раствор АЛК, 1 мкг/мл. Готовят перед употреблением разведением основного калибровочного раствора ацетатным буфером в 100 раз. 13. Взвесь угля: 0,25 г активированного угля помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл и разбавляют ацетатным буфером рН 3,6. Перед употреблением тщательно встряхивать. 14. Реактив Эрлиха: 1 г п-диметиламинобензальдегида растворяют в мерной колбе вместимостью 50 мл в 35 мл ледяной уксусной кислоты, добавляют 8 мл 57 % хлорной кислоты и доводят до метки ледяной уксусной кислотой. Хранят в посуде из темного стекла в холодильнике не более недели. 15. Беззольные фильтры (синяя лента).

Материал для исследования. Отбирают не менее 2 мл мочи. Допускается хранение мочи в холодильнике, рН мочи должен быть равен 6, для чего добавляют на 10 мл мочи 0,1 мл ледяной уксусной кислоты.

Специальное оборудование. Спектрофотометр.

Ход определения. К 1 мл мочи в пробирке с притертой пробкой добавляют 9 мл взвеси угля в ацетатном буфере рН 3,6. Суспензию взбалтывают 1 мин и фильтруют через бумажный фильтр (синяя лента). В две пробирки отбирают по 2 мл фильтрата. Первая пробирка для холостой пробы. Во вторую пробирку (опытную) добавляют 0,05 мл ацетилацетона и тщательно перемешивают. Затем обе пробирки помещают на 20 мин в кипящую водяную баню. После охлаждения проб и доведения объема жидкости ацетатным буфером до 2 мл в каждую пробирку добавляют по 2 мл реактива Эрлиха и перемешивают. Через 15 мин опытную пробу измеряют против холостой пробы при длине волны 553 нм в кювете с толщиной слоя 1 см. Окраска раствора стабильна в течение 1 ч.

Расчет ведут по калибровочному графику (готовят разведения, как указано ниже).

№ пробирки	Рабочий калибровочный раствор, мл	Ацетатный буфер рН 3,6, мл	АЛК в пробе (2 мл)	
			мкг	мкмоль
1	0,1	До 5 мл	0,04	0,0003
2	0,3	То же	0,12	0,0009
3	0,5	»	0,2	0,0015
4	0,7	»	0,28	0,0021
5	1,0	»	0,4	0,003
6	2,0	»	0,8	0,006

Из каждой пробы отбирают по 2 мл раствора в 2 пробирки (холодную и опытную), которые обрабатывают, как указано выше. По полученным данным строят калибровочный график.

Примечание. Поскольку диурез за сутки может быть различным, более достоверным показателем считается содержание АЛК в пересчете на 1 г креатинина.

Расчет. Содержание АЛК в моче (мкмоль/г креатина) рассчитывают с использованием калибровочного графика по формуле:

$$АЛК = \frac{С \cdot 10}{А \cdot 2},$$

где C — количество АЛК в пробе (мкмоль), найденное по калибровочному графику; A — содержание креатинина в пробе (г); 10 — коэффициент разведения мочи, 2 — объем фильтра (мл).

Коэффициент пересчета микрограмм АЛК в микромоли — 0,0076.

Нормальные величины содержания АЛК в моче 3,9—19 мкмоль/г креатинина (0,52—2,5 мг/г креатинина).

Оценка аналитической надежности. Нижняя граница чувствительности 0,15 мкмоль/л. Воспроизводимость: коэффициент вариации около 5 %.

Литература. *Mauzerall D. S., Grannick S. J. Biol. Chem., 1956, vol. 219, № 1, p. 435—446.*

Клиническое значение. Выделение дельта-аминолевулиновой кислоты с мочой увеличивается при патологических процессах, связанных с нарушением порфиринового обмена, а также при интоксикации свинцом, бензолом и другими токсическими веществами.

5.4.5. Копропорфирин, уропорфирин

Для копропорфирина (КП) наиболее приемлемыми по аналитическим качествам являются спектрофотометрические методы. Спектрофотометрический метод Соулсби в модификации Римингтона рекомендован в качестве унифицированного.

Унифицированный метод Соулсби в модификации Римингтона. **Принцип.** Экстракция КП и копропорфириногена (КПГ) из мочи в кислой среде с последующим переводом КПГ в КП йодом, реэкстракция КП кислотой и спектрофотометрическое определение его по разнице оптической плотности при трех длинах волн.

5.5. УГЛЕВОДЫ И РОДСТВЕННЫЕ СОЕДИНЕНИЯ

5.5.1. Глюкоза

Более 90 % всех растворимых низкомолекулярных углеводов крови приходится на глюкозу; кроме того, в небольших количествах могут при-

сутствовать фруктоза и пентозы, а при патологии и галактоза. После еды увеличивается содержание фосфорных эфиров гексоз, определяемых некоторыми методами вместе с глюкозой. Глюкоза распределена почти равномерно между

Реактивы. 1. Уксусная кислота ледяная х.ч. 2. Эфир медицинский. 3. HCl х.ч. 1,4 моль/л. 4. Йод ч.д.а., спиртовой раствор, 0,039 моль/л. 5. Раствор йода в HCl . Готовят ежедневно, смешивая реактивы № 3 (200 объемов) и № 4 (1 объем).

Специальное оборудование. Спектрофотометр.

Материал для исследования. Свежезыведенная моча. Срок хранения мочи не более 3 ч.

Ход определения. В делительную воронку вносят 2 мл мочи, 0,2 мл ледяной уксусной кислоты, 5 мл эфира и встряхивают в течение 1 мин. После разделения фаз нижний водный слой отбрасывают. К эфирному слою добавляют 5 мл раствора йода в HCl и встряхивают в течение 1 мин. После разделения фаз нижний слой переносят в пробирку, термостатируют при 37°C в течение 5 мин. Затем содержимое пробирки встряхивают и измеряют оптическую плотность раствора в кюветках с толщиной слоя 1 см при трех длинах волн: 380; 402; 430 нм против 1,41 моль/л раствора HCl .

Расчет. Учитывая, что диурез за сутки может быть разным, более достоверным показателем считают содержание КП в пересчете на креатинин. Содержание КП в моче (нмоль/г креатинина) рассчитывают по формуле:

$$КП = \frac{[2 \cdot E_{402} - (E_{430} + E_{380})] \cdot 2,093 \cdot 1,52}{A},$$

где E_{402} , E_{430} , E_{380} — оптическая плотность раствора при соответствующих длинах волн; A — содержание креатинина в пробе (г); 1,52 — коэффициент пересчета микрограммов КП в наномоли; 2,093 — коэффициент для расчета содержания КП, предложенный Римингтон.

Нормальные величины КП в моче: 30,5—122 нмоль/г креатинина (20—80 мкг/г креатинина).

Клиническое значение. Содержание КП в моче повышается при гепатитах, циррозах печени, свинцовой интоксикации и некоторых формах порфирии, наследственной копропорфирии, перемежающейся порфирии, эритропоэтической уропорфирии. Повышенное выделение с мочой УП наблюдается при перемежающейся порфирии, эритропоэтической уропорфирии.

Литература. *Павловская Н. А., Кахи Х. А., Семенова Л. С., Мере А. Т. — Лаб. дело, 1981, № 2, с. 86—89; Rimington C. Ass. clin. Pathol., 1971, vol. 70, p. 39—42; Soulsby I., Smith R. L. Brit. J. industr. Med., 1974, vol. 31, № 1, p. 72—74.*

плазмой и эритроцитами, поэтому с равным успехом может определяться в цельной крови, плазме или сыворотке, но надо иметь в виду, что в уже взятой пробе крови, особенно если сгусток для получения сыворотки формируется в термостате или если материал взят нестерильно, идет интенсивный гликолиз и содержание глюкозы быстро падает. Часто принимают, что в венозной крови содержится на 0,5 ммоль/л (10 мг в 100 мл) меньше глюкозы, чем в капиллярной, но эта величина, разумеется, условная.

Широко распространенный термин «сахар крови» надо считать неудачным, так же как и термин «сахарная кривая», и использовать более точные выражения: глюкоза крови и глюкозо-толерантный тест (ГТТ).

Методы определения глюкозы разделяют на три группы: ферментативные, редуктометрические и методы с использованием цветных реакций, в которых участвуют продукты, образующиеся при нагревании углеводов с концентрированными кислотами.

Ферментативные методы исследования сочетают в себе высокую точность и техническую простоту анализа, они основываются на одной из двух реакций — гексокиназной либо глюкозооксидазной. В первом случае глюкоза сначала фосфорилируется за счет АТФ благодаря действию гексокиназы; образовавшийся глюкозо-6-фосфорный эфир в присутствии глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназы восстанавливает NADP, количество которого определяется по увеличению светопоглощения в ультрафиолетовой области. Эти методы считаются наиболее точными, но для выполнения нуждаются в нескольких ферментах и кофакторах, поэтому определение оказывается дорогостоящим для клинико-диагностических лабораторий. Легче выполнимы глюкозооксидазные методы, в которых глюкозооксидаза окисляет глюкозу кислородом воздуха с образованием перекиси водорода, количество которой определяется либо химическим путем, либо по ее способности в присутствии пероксидазы окислять диамин с образованием окрашенных продуктов. Практически очень удобен унифицированный в 1974 г. глюкозооксидазный метод определения глюкозы по окислению ортолидина. Он не требует ни нагревания до высоких температур, ни работы с концентрированными кислотами, но имеет тот недостаток, что орто-толидин токсичен (канцероген), кроме того, трудно получить препарат глюкозооксидазы, полностью свободной от каталазы, которая, хотя бы в небольшой степени, разрушает образующуюся перекись водорода, поэтому всегда существует угроза получения заниженных результатов. Входящий в эту же группу глюкозооксидазных метод, основанный на окислении перекисью водорода фенолфталина, имеет то преимущество, что нуждается только в одном реактиве — глюкозооксидазе, зато метод более трудоемок.

Особый вариант ферментативных методов — *ферментные электроды*, которые представляют собой чувствительные электрохимические датчики, содержащие иммобилизованные ферменты. Существует два варианта электродов для опре-

деления глюкозы, и в обоих идет глюкозооксидазная реакция, но в первом варианте датчик улавливает перекись водорода, а во втором уменьшение содержания кислорода, израсходованного на окисление глюкозы.

Редуктометрический феррицианидный метод, предложенный в 1926 г. Н. С. Hagedorn, В. N. Jensen, малоспецифичен, но не нуждается ни в дефицитных реактивах, ни в дорогой аппаратуре, поэтому принят в качестве унифицированного и используется и в настоящее время, особенно в небольших лабораториях. Значительно точнее методы, основанные на способности глюкозы восстанавливать соли меди; так как образующаяся одновалентная медь легко окисляется кислородом воздуха, она обычно выступает в качестве промежуточного вещества, окончательным хромогеном служит мышьяково-молибденовая или фосфорно-вольфрамовая кислота. Однако, если в растворе присутствуют комплексообразователи, например неокупреин, восстановленная (одновалентная) медь не окисляется кислородом воздуха, поэтому может быть непосредственно измерена. Методы, основанные на восстановлении глюкозой нитробензолов, в частности пикриновой кислоты, в некоторых странах широко распространены, эффективность их, видимо, во многом зависит от степени чистоты реактивов. Ошибки редуктометрических методов в значительной степени вызваны присутствием восстанавливающих веществ неуглеводной природы — глутатиона и аскорбиновой кислоты. В связи с тем что глутатион находится в эритроцитах, при анализе плазмы или использовании такого метода исследования цельной крови, при котором эритроциты удаляются неразрушенными, погрешности значительно сокращаются.

Из многочисленных методов, которые основаны на цветных реакциях с продуктами, образующимися при нагревании углеводов с кислотами, наибольшее значение имеет *орто-толидиновый метод*. Он специфичен, прост в выполнении, но по ходу реакции надо кипятить пробу на водяной бане с концентрированной уксусной кислотой, поэтому работать надо под тягой или в специальном помещении. *Антроновый метод* значительно менее специфичен, но примерно в 5 раз чувствительнее; благодаря малой специфичности он годится для определения любых углеводов в крови, в частности полиглюкина. Другие методы этой группы, основанные на цветных реакциях с карбазолом, орцином или резорцином, применяются лишь для определения углеводов, входящих в состав гликопротеидов и протеогликанов.

В клинической лабораторной диагностике чаще всего глюкозу определяют в крови, взятой из пальца, в этом случае предварительное удаление белка абсолютно необходимо. Но если анализировать сыворотку без гемолиза и желтухи, то многие методы позволяют обходиться без депротенинизации.

Определение глюкозы в моче имеет лишь вспомогательное значение, поэтому обычно ограничиваются лишь ее качественным исследованием. При количественном определении обыч-

но используют ортотолуидиновый метод или поляриметрический, основанный на измерении вращения плоскости поляризации.

Как видно из краткого обзора методов, нет однозначности в том, какой метод или даже какая группа методов должна быть принята в качестве унифицированной. Наибольшее практическое значение имеет определение глюкозы для выявления и контроля за лечением сахарного диабета, однако даже наименее точный с аналитической точки зрения феррицианидный редуктометрический метод успешно применяется на протяжении многих лет; при правильном его использовании и интерпретации результатов он может применяться в КДЛ.

Унификация методов. В качестве унифицированных сейчас приняты три метода. Наиболее точный глюкозооксидазный унифицирован в 1974 г.; менее удобный в работе ортотолуидиновый метод унифицирован в 1972 г., тогда же унифицирован феррицианидный метод (Хагедорна—Иенсена), который хотя и дает несколько завышенные результаты, но везде может быть налажен.

Унифицированный глюкозооксидазный метод по окислению о-толидина. Принцип. Глюкозооксидаза окисляет глюкозу с образованием перекиси водорода, которая под действием пероксидазы окисляет ортотолуидин ($\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2-\text{C}_6\text{H}_4-\text{C}_6\text{H}_4-\text{CH}_2-\text{NH}_2$) с образованием синего хромогена. Обе реакции протекают одновременно при pH 4,8.

Реактивы. 1. Натрия хлорид 9 г/л (изотонический раствор): готовят, растворяя 0,9 г NaCl в 100 мл воды. 2. Цинка сульфат, 50 г/л: 5 г сульфата цинка (ZnSO_4) растворяют в воде, объем доводят до 100 мл. 3. Натр едкий, 0,3 моль/л: готовят, растворяя 1,2 г NaOH в 100 мл воды, концентрацию проверяют титрованием (она должна быть 0,3 н.). 4. Ортотолуидин, 1 % раствор: 1 г препарата растворяют в 100 мл абсолютного спирта. Раствор можно хранить в холодильнике в склянке с притертой пробкой несколько месяцев. Имеющийся в продаже препарат можно очистить перекристаллизацией, для чего его растворяют в абсолютном спирте, добавляют воду и выпавшие кристаллы отсаживают на фильтре, затем сушат над хлоридом кальция. 5. Ацетатный буферный раствор pH 4,8: смешивают 4 части 0,25 н. уксусной кислоты (проверить титрованием!) и 6 частей 0,25 н. ацетата натрия (содержит 34 г $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ в 1 л). 6. Глюкозооксидаза — сухой препарат активностью 3000 ед/мг или больше. 7. Пероксидаза из хрена. Желательно использовать кристаллический препарат фирмы «Реал» (Венгрия): 1 мг растворяют в 5 мл ацетатного буфера (реактив 5), в холодильнике можно хранить несколько дней. 8. Рабочий реактив: в 80 мл ацетатного буфера растворяют 2 мг глюкозооксидазы и 1 мг пероксидазы, прибавляют 1 мл 1 % раствора ортотолуидина, перемешивают и доводят объем буферным раствором до 100 мл. Рабочий реактив должен быть прозрачным, бесцветным или иметь слабо-зеленый оттенок, в этом случае он устойчив при хранении на холоду. Если же окраска интенсивна или через несколь-

ко часов после приготовления начинает выпадать осадок, это значит, что ортотолуидин недостаточно чистый и его надо перекристаллизовать. 9. Калибровочные растворы глюкозы. Глюкозу предварительно высушивают при 37°C и хранят в эксикаторе. Сначала готовят основной раствор с концентрацией 50 ммоль/л, для чего 180 мг вещества растворяют в 20 мл насыщенного раствора (примерно 0,3 %) бензойной кислоты. Из этого раствора готовят рабочие калибровочные растворы, содержащие 3; 6; 9; 12; 15; 18 и 21 ммоль/л, для чего берут 0,6; 1,2; 1,8; 2,4; 3; 3,6 и 4,2 мл основного раствора и доводят насыщенным раствором бензойной кислоты до объема 10 мл. Эти растворы содержат глюкозу в тех же концентрациях, в которых она бывает в крови, что облегчает расчеты при калибровке.

Ход определения. В центрифужные пробирки вносят 1,1 мл раствора хлорида натрия, 0,4 мл раствора сульфата цинка и 0,4 мл 0,3 н. раствора NaOH, перемешивают; при этом образуется очень тонкий гель гидрата окиси цинка, в него выпускают 0,1 мл крови или калибровочного раствора, снова перемешивают и через 10 мин центрифугируют при 3000 об/мин в течение 10 мин.

К 1 мл надосадочной жидкости добавляют 3 мл рабочего реактива и осторожно перемешивают. Постепенно начинает развиваться окраска, которая при обычной комнатной температуре достигает максимума через 13—15 мин, а затем постепенно уменьшается. Фотометрируют всегда через один и тот же промежуток времени после добавления рабочего реактива в кюветы с длиной оптического пути 1 см с красным светофильтром (длина волны 625 нм) против холостого опыта, который ставят одновременно с рабочими пробами, но вместо крови берут физиологический раствор хлорида натрия. При приготовлении калибровочного графика вместо проб крови берут 0,1 мл соответствующего калибровочного раствора.

Расчет можно проводить по правилу пропорций или по калибровочному графику, для построения которого на одной оси откладывают концентрацию глюкозы (ммоль/л), а на другой величину экстинкции.

Примечания. 1. Можно сначала выпустить кровь из пипетки в изотонический раствор хлорида натрия, а затем добавить растворы сульфата цинка и NaOH. 2. При систематической работе нет необходимости постоянно строить калибровочный график по всем точкам, достаточно ежедневно обрабатывать холостую пробу и 2—3 точки в диапазоне 3—9 ммоль/л, а полный калибровочный график строить лишь при смене реактивов или налаживании методики.

Нормальные величины натощак: 3,5—5,7 ммоль/л (60—100 мг в 100 мл).

Литература. Лаб. дело, 1976, № 6, 373—374.

Глюкозооксидазный метод по окислению фенолфталина. Принцип. Белки осаждают трихлоруксусной кислотой, pH безбелкового

раствора с помощью фосфата натрия доводят до точки, близкой к оптимальному действию глюкозооксидазы, и проводят ферментативную реакцию. Образующаяся перекись водорода в присутствии ионов меди окисляет фенолфталин до фенолфталеина, который в нейтральной области бесцветен, а в щелочной области окрашен в красный цвет. Поэтому перед фотометрированием добавляют щелочь.

Р е а к т и в ы . 1. Трихлоруксусная кислота, раствор 50 г/л. При титровании щелочью концентрация кислоты должна быть 0,3 н. 2. Натрия фосфат двузамещенный, 0,25 моль/л. Готовят, растворяя 9,7 г $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ или 18 г $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ в воде, объем доводят до 200 мл. При добавлении 2 мл этого раствора к 1 мл раствора трихлоруксусной кислоты pH должен быть в пределах 5,0–6,0. 3. Раствор глюкозооксидазы. Содержит около 3000 ед. в 1 мг. Готовят, растворяя соответствующее количество сухого препарата в 10 мл воды. Допускаются значительные колебания активности фермента, поэтому обычно нет необходимости проверять качество препарата. 4. Фенолфталин, 0,5 % раствор. Готовят, растворяя 75 мг вещества в 15 мл 0,1 н. NaOH, раствор должен быть бесцветным или слегка розоватым, окрашенные растворы для работы непригодны. Для увеличения стойкости реактива к нему добавляют 3 мг трилона (натриевой соли этилендиаминтетрауксусной кислоты), который, связывая соли тяжелых металлов, препятствует самоокислению фенолфталеина кислородом воздуха. 5. Рабочий реактив. Готовят в день определения, смешивая 30 частей 0,3 н. NaOH, 2 части 0,5 % раствора фенолфталеина (реактив 4) и 1 часть 0,12 % раствора сульфата меди (120 мг $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ растворяют в 100 мл воды). 6. Калибровочные растворы. Глюкозу высущивают при 37 °С и хранят в эксикаторе. Сначала готовят раствор с концентрацией 50 ммоль/л, для чего 180 мг препарата растворяют в 20 мл 5 % трихлоруксусной кислоты. Разведением этого раствора в 50 раз той же 5 % трихлоруксусной кислотой получают раствор, содержащий 1 ммоль/л. Берут 0,6; 1,2; 1,8 и 2,4 мл раствора 1 ммоль/л и объем каждой порции доводят до 10 мл, добавляя нужное количество 5 % трихлоруксусной кислоты. Получаются растворы, содержащие 60; 120; 180 и 240 мкмоль/л. При построении калибровочного графика окраска проб, в которых обрабатывались эти растворы, будет соответствовать концентрации 3; 6; 9 и 12 ммоль глюкозы в 1 л крови.

Ход определения . 0,03 мл крови выливают в 1,5 мл 5 % трихлоруксусной кислоты, перемешивают и центрифугируют. К 1 мл прозрачной надосадочной жидкости добавляют 2 мл 0,25 моль/л фосфата натрия и 2 капли (примерно 0,1 мл) раствора глюкозооксидазы. Перемешивают и оставляют при комнатной температуре на 1 ч, затем добавляют 2 мл рабочего реактива и еще через 30 мин фотометрируют в кювете с длиной оптического пути 1 см при длине волны 520 нм (зеленый светофильтр).

Одновременно ставят холостой опыт, в который берут 1 мл 5 % трихлоруксусной кислоты

и обрабатывают ее так же, как и надосадочную жидкость. В калибровочный опыт вместо надосадочной жидкости берут по 1 мл различных калибровочных растворов (реактив 6). Расчет проводят по калибровочному графику или по правилу пропорций.

П р и м е ч а н и я . 1. Фенолфталин можно синтезировать из недефицитного фенолфталеина, который широко используется в лабораториях в качестве кислотно-основного индикатора. Для этого в колбу вместимостью 1 л с обратным холодильником помещают 5 г фенолфталеина, 250 мл 20 % раствора КОН и 2,5 г цинковой пыли, а также несколько стеклянных бусинок для равномерного кипения. Раствор становится темно-красного цвета, его кипятят до тех пор, пока он не станет слабо-розовым или совсем не обесцветится, обычно на это уходит 1 рабочий день. Еще горячий раствор фильтруют через стеклянный фильтр и добавляют 100 мг трилона. К охлажденному прозрачному раствору в большом химическом стакане добавляют небольшими порциями при постоянном перемешивании 5 н. HCl до тех пор, пока реакция не станет сильнокислой (по конго красному или универсальной индикаторной бумажке), на это идет около 200 мл кислоты. Выпавший осадок отфильтровывают на бюхнеровской воронке и высушивают, желателно в вакууме.

2. Можно избежать удаления белков осаждением, если анализировать кровь, высушенную на фильтровальной бумаге. Для этого 0,02 мл исследуемой крови в виде плотного узора выпускают на фильтровальную бумагу, высушивают на воздухе, вырезают и замачивают на 10–15 мин в 1 мл 5 % трихлоруксусной кислоты. Фильтр с пятном крови удаляют, а экстракт обрабатывают так же, как и безбелковый фильтрат. В качестве холостого опыта используют 1 мл 5 % трихлоруксусной кислоты, в которой был замочен такой же по размеру кусочек фильтровальной бумаги. Если окраска в холостом опыте оказывается значительной, фильтровальную бумагу предварительно вымачивают в горячей 5 % уксусной кислоте, а затем высушивают.

Н о р м а л ь н ы е в е л и ч и н ы те же, что и в предыдущем методе.

Л и т е р а т у р а . Балаховский И. С., Наточин Ю. В. Пробл. космич. биол., 1973, т. XXII, с. 43; Городецкий В. К., Селиванов И. А. Прикладная биохимия и микробиология, 1969, т. 5, № 3, 353.

Купрометрический метод с использованием мышьяково-медного реактива (метод Сомоги — Нельсона). П р и н ц и п . Глюкоза восстанавливает ионы двухвалентной меди, которые в свою очередь восстанавливают мышьяково-молибденовую кислоту с образованием молибденовой сини, которая придает раствору устойчивое окрашивание.

Реактивы. 1. Натрия фосфат двузамещенный. Вместо 28 г безводной соли (Na_2HPO_4) можно взять 70,5 г ее гидрата ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$). 2. Калий, натрий виннокислый (сегнетова соль). 3. Безводный сульфат натрия. Вместо 80 г безводной соли (Na_2SO_4) можно взять 180 г ее кристаллического гидрата ($\text{Na}_2\text{SO}_4 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$). 4. Меди сульфат $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$. 5. Щелочной медный реактив: растворяют 28 г двузамещенного фосфата натрия и 40 г сегнетовой соли в 600–700 мл воды и добавляют туда 100 мл 1 н. NaOH . Отдельно растворяют 8 г сульфата меди в 80 мл воды и приливают, перемешивая, к предыдущему раствору. Затем к смеси добавляют 80 г безводного сульфата натрия, доводят объем до 1 л водой и оставляют на 2–3 дня при 37 °С, после чего фильтруют. Хранят в темноте, желательно в полиэтиленовом флаконе, так как стекло может выщелачиваться, нарушая кислотность среды. 6. Аммоний молибденовокислый ($(\text{NH}_4)_5\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot \text{H}_2\text{O}$). 7. Натрий мышьяковокислый двузамещенный ($\text{Na}_2\text{HAs}_2\text{O}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$). 8. Мышьяково-молибденовый реактив: при легком подогревании растворяют 25 г молибденовокислого аммония в 450 мл воды, затем добавляют 21 мл концентрированной серной кислоты и перемешивают. К этому раствору добавляют 3 г двузамещенного мышьяковокислого натрия, растворенного в 25 мл воды. Хорошо перемешивают и оставляют стоять на 1–2 сут в темном месте при 37 °С. Реактив должен быть зеленоватого цвета. К нему добавляют несколько капель 0,05 н. перманганата калия (0,79 % раствор KMnO_4), так, чтобы раствор стал золотисто-желтым. Хранить в посуде из темного стекла. 9. Вольфрамвоксислый натрий, 0,66 н. 10. Серная кислота, 0,66 н. 11. Калибровочные растворы глюкозы те же, что и в глюкозооксидазном методе определения глюкозы по окислению ортолидина.

Ход определения. К 1,5 мл воды добавляют 0,1 мл крови, перемешивают и приливают сначала 0,2 мл 10 % раствора вольфрамвоксислого натрия, а затем 0,2 мл 0,66 н. серной кислоты. Перемешивают и через несколько минут центрифугируют. К 0,5 мл прозрачной надосадочной жидкости добавляют 0,5 мл щелочного медного реактива и ставят на кипящую водяную баню на 20 с. Затем охлаждают 1 мин в воде комнатной температуры и добавляют 0,5 мл мышьяково-молибденового реактива и 7,5 мл воды.

Перемешивают и фотометрируют в кювете с длиной оптического пути 1 см при длине волны 700 нм против холостого опыта, при постановке которого вместо крови берут 0,1 мл воды. Одновременно обрабатывают калибровочные пробы, в которые вместо крови берут калибровочные растворы. Расчет можно: проводить по калибровочному графику или по правилу пропорций.

Нормальные величины и клиническое значение те же, что и в глюкозооксидазном методе, т. е. 3,5–5,7 ммоль/л (60–100 мг в 100 мл).

5.5.2. Углеводные компоненты гликопротеидов

Вещества, содержащие белковый и углеводный компоненты, называются гликопротеидами. Различают собственно гликопротеиды и протеогликаны. В первую группу входят белки, содержащие относительно короткие (не больше 15–20 моносахаридов) углеводные цепи, в которых нет периодически повторяющихся олигосахаридных последовательностей. Вторую подгруппу составляют протеогликаны или гликозаминпротеогликаны, которые иногда называют аминополисахаридами, или мукополисахаридами. Они значительно богаче углеводами, каждая углеводная цепь состоит из повторяющихся дисахаридных фрагментов, содержащих аминоксахар и урсоную кислоту или галактозу. Углеводные компоненты протеогликанов называют гликозаминогликанами (ГАГ).

Гликопротеиды. Большинство белков плазмы крови содержит хотя бы некоторое количество углеводов, поэтому формально относятся к гликопротеидам. Однако практически сывороточными гликопротеидами обычно называют лишь небольшую группу белков, особенно богатых углеводами, куда входят трансферрин, гаптоглобулин, макроглобулин и т. д. Содержание их увеличивается при воспалительных процессах, в связи с чем их называют белками острой фазы и определяют в тех случаях, когда надо выявить воспалительный процесс или оценить его активность. При этом возможно несколько подходов: 1) определение индивидуальных гликопротеидов острой фазы посредством специфических энзиматических или иммунологических методов; 2) выявление электрофоретических фракций, особенно богатых гликопротеидами; 3) определение суммы углеводов, связанных с сывороточными белками. Последний подход и рассматривается в настоящем разделе.

Из более чем 100 известных природных сахаров и их производных с белками бывает связано лишь около 10. В состав гликопротеидов входят следующие углеводы: 1) гексозы — главным образом галактоза и манноза, в очень незначительных количествах и глюкоза; 2) пентозы — ксилоза и арабиноза; 3) дезоксисахара — фукоза и рамноза; 4) аминоксахара — ацетилглюкозамин и ацетилгалактозамин; 5) нейраминная кислота и ее уксуснокислые эфиры, которые называются сиаловыми кислотами.

О количестве сывороточных гликопротеидов можно судить, определяя любой из этих компонентов, но по практическим соображениям в клинической практике находит широкое применение лишь определение связанных с белком гексоз и сиаловых кислот; методы определения фукозы, аминоксахаров и нейраминной кислоты известны, но не получили такого широкого распространения из-за сложности и трудоемкости.

Многие богатые углеводами белки обладают выраженными кислотными свойствами, растворимы в хлорной и трихлоруксусной кислотах и составляют группу серомукоидов, диагностическое значение которых примерно такое же, как гликопротеидов. О количестве серомукоидов

можно судить по содержанию белкового или углеводного компонента, но последний путь надежнее. Содержание в плазме гексоз, связанных с белком, свидетельствует об общем количестве гликопротеидов, а определение гексоз, которые растворимы в хлорной кислоте и нерастворимы в фосфорновольфрамовой, служит показателем количества серомукоидов.

Большинство цветных реакций на сахара может быть также использовано для определения углеводных компонентов гликопротеидов. Из них наиболее подходящим для определения гексоз орциновый метод, а для определения сиаловых кислот — резорциновый метод и метод с уксусно-серноокислым реактивом.

Хотя клиническая трактовка результатов определения перечисленных выше веществ во многом схожа, содержание отдельных углеводных компонентов изменяется не всегда строго параллельно, так как индивидуальные белки острой фазы содержат их в разных количествах и все зависит от того, какой конкретный протенд преимущественно изменился. По этой причине в клинике, в частности в ревматологической, стремятся одновременно определять несколько различных показателей.

Протеогликианы. Этими соединениями очень богата межклеточное вещество соединительной ткани, патологические процессы в которой отражаются на обмене углеводного компонента — гликозаминогликанов (ГАГ) и содержания их в моче. Протеогликианы весьма гидрофильны, они способны впитывать большое количество воды, чем и определяется их более старое название «мукополисахариды». Гистохимически они выявляются по способности к метахроматической окраске, т. е. окрашиванию в цвет, отличный от цвета красителя.

ГАГ состоят из повторяющихся дисахаридных единиц, каждая из которых содержит аминоксахар и уроновую кислоту или галактозу; другие углеводы (фукоза, сиаловые кислоты, манноза и ксилоза) присутствуют лишь в ничтожных количествах. При определении ГАГ в крови или в моче их обычно сначала выделяют, используя способность образовывать осадки с четвертичными аминами, содержащими длинную углеводную цепь, в частности с цетилтриметиламмонием, а затем определяют углеводный компонент специфической реакцией в карбазолом или орцином. Результаты определения ГАГ карбазоловым и орциновым методом очень часто не совпадают, что имеет определенное диагностическое значение.

Известно 7 типов ГАГ, из них 5 содержат в своем составе глюкуроновую кислоту, шестой — идуруновую кислоту, называемую также галактуроновой, а седьмой — галактозу. Глюкуроновую кислоту содержит гиалуруновая кислота, хондроитин-4-сульфат (хондроитинсульфат А), хондроитин-6-сульфат (хондроитинсульфат С), гепарин и гепарансульфат; дерматансульфат (хондроитинсульфат В) содержит идуруновую кислоту, а кератансульфат или кератансульфат — галактозу. Глюкуроновая кислота в реакции с орцином дает такое же окрашивание, как и идуруновая, в то же время

карбазоловая реакция интенсивнее развивается с глюкуроновой кислотой, чем с идуруновой. На этом основан простой метод, позволяющий судить об относительном содержании дерматансульфатов по так называемому коэффициенту К/О, который рассчитывают путем деления содержания ГАГ, определенного по карбазоловой реакции, на их содержание, определенное по реакции с орцином; разумеется, оба результата должны быть выражены в молях. Для чистого образца дерматансульфата этот коэффициент равен 0,67, для прочих ГАГ (за исключением, конечно, кератансульфата) он выше.

Увеличение экскреции ГАГ с мочой служит признаком повреждения соединительной ткани вследствие иммунного процесса, воспаления или же врожденного дефекта обмена. При приобретенных заболеваниях (ревматизм, склеродермия) увеличение коэффициента К/О характерно для более тяжелых, деструктивных процессов, в то время как при преобладании фибротических, склеротических и дистрофических процессов коэффициент падает, видимо, потому, что появляются гетерогенные Протеогликианы с высоким содержанием идуруновой кислоты.

Унификация методов. В 1972 г. унифицированы резорциновый метод определения сиаловых кислот и определения связанных с белками гексоз и гексоз, связанных с серомукоидом орциновым методом.

Л и т е р а т у р а. Астахова Т. А, Балабанова Р. М. Гликозаминогликианы мочи при системной склеродермии.— Тер. арх., 1980, № 12, с. 100[^]104; Видершайн Г. Я. Биохимические основы гликозидозов.— М.: Медицина, 1980.

5.5.3. Сиаловые кислоты

Унифицированный резорциновый метод.

П р и н ц и п. При нагревании гликопротеидов плазмы с трихлоруксусной кислотой отщепляются сиаловые кислоты, которые в свою очередь гидролизуются с образованием свободной нейраминаевой кислоты и уксусной кислоты. Резорцин в присутствии солей меди дает с нейраминаевой кислотой синее окрашивание.

Р е а к т и в ы. 1. Меди сульфат, 0,1 моль/л: растворяют 624 мг сульфата меди (медный купорос, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) в 25мл воды. 2. Резорцин 2 г/л. Резорциновый реактив готовят, растворяя 200 мг резорцина в 10 мл воды, затем добавляют 80 мл концентрированной HCl (отн. плотность 1,19) и 0,25 мл раствора сульфата меди, после смешивания общий объем доводят до 100 мл водой. Реактив годен к употреблению через 4 ч после приготовления, при хранении в холодильнике стоек. 3. Экстрагирующий реактив: смешивают 85 мл бутилацетата и 15 мл бутилового спирта. 4. Трихлоруксусная кислота, 50 г/л. 5. Калибровочные растворы. Основной раствор содержит 0,5 мг кристаллической ацетилнейраминаевой кислоты (мол. масса 309) в 1 мл воды. Из него готовят калибровочные растворы.

Основной раствор ацетилнейраминокислоты	Во-мл	Содержание		Соответствует концентрации в плазме	
		мкг	нмоль	мг/л	ммоль/л
0,1	0,9	50	162	200	0,65
0,2	0,8	100	324	400	1,29
0,3	0,7	150	485	600	1,94
0,4	0,6	200	647	800	2,59
0,5	0,5	250	809	1 000	3,24

Ход определения. К 0,1 мл плазмы или сыворотки приливают 1,9 мл раствора трихлоруксусной кислоты, ставят на 7 мин на кипящую водяную баню для гидролиза, затем охлаждают и фильтруют через бумажный фильтр. К 0,5 мл прозрачного фильтрата добавляют 0,5 мл воды и 1 мл резорцинового реактива, закрывают стеклянными пробками и ставят на водяную кипящую баню еще на 15 мин. После этого охлаждают, добавляют 3 мл экстрагирующего реактива, встряхивают и оставляют на 15 мин для расслоения фаз. Окраска переходит в верхний слой, который отсасывают и фотометрируют при длине волны 575—590 нм в кювете с длиной оптического пути 0,5 см против холостого опыта, при постановке калибровочного графика берут по 1 мл резорцинового реактива. Остальные процедуры те же, что и в основном опыте. Для построения калибровочного графика берут по 1 мл калибровочных растворов, приготовленных согласно таблице, добавляют по 1 мл резорцинового реактива и обрабатывают так же, как в основном опыте.

Расчет проводят по калибровочному графику.

Нормальные величины. В норме содержание сиаловых кислот составляет 2,0—2,33 ммоль/л независимо от того, выражаются результаты определения в свободной нейраминной кислоте или же в ее ацетилированной форме — сиаловых кислотах. При выражении результатов в весовых единицах содержание нейраминной кислоты составляет 620—730 мг/л.

Литература. *Svennerholm L.* The quantitative estimating of cerebroside in nervous tissue.— *J. of Neurochemistry*, 1956, vol.1, № 1, p. 42—53.

Клиническое значение. Содержание сиаловых кислот возрастает при самых разнообразных воспалительных процессах, а также при опухолях, инфаркте миокарда. В целом диагностическое значение такое же, как и остальных гликопротеидных показателей.

5.5.4. Связанные с белком гексозы

Унифицированный орциновый метод.
Принцип. Гликопротеиды осаждают вместе с белками сыворотки или плазмы спиртом, оса-

док отмывают, растворяют в щелочи и определяют в нем гексозы по реакции с орцином. Количество гексоз характеризует общее содержание гликопротеидов.

Серомукоиды — это особый вид гликопротеидов, которые растворимы в хлорной кислоте, но нерастворимы в фосфорновольфрамовой кислоте. Для их определения остальные белки осаждают хлорной кислотой; добавляя к надосадочной жидкости фосфорновольфрамовую кислоту, осаждают серомукоиды, осадок отмывают, растворяют в щелочи и определяют содержание гексоз по реакции с орцином. Количество гексоз характеризует общее содержание серомукоидов.

Реактивы. 1. Орциновый реактив. Готовят смешиванием двух реактивов: А — серная кислота и Б — раствор орцина, 16 г/л. Реактив А готовят, осторожно добавляя к 40 мл воды 60 мл концентрированной серной кислоты; реактив Б готовят, растворяя 1,6 г орцина в 100 мл воды. Оба реактива стойкие. Непосредственно перед определением смешивают 7,5 мл реактива А и 1 мл реактива Б. 2. 96 % этиловый спирт (этанол). 3. Натр едкий, 0,1 н. раствор. 4. Хлорная кислота, 0,6 моль/л, содержит 6 % HClO₄. 5. Фосфорновольфрамовая кислота, 50 г/л. Готовят, растворяя 5 г ее в 100 мл 2 н. HCl. 6. Калибровочный раствор, содержащий 45 мг галактозы и 45 мг маннозы в 100 мл воды. Сахара высушивают в эксикаторе над фосфорным ангидридом. В связи с тем, что оба вещества имеют одинаковую молекулярную массу, получается раствор, содержащий смесь гексоз в общей концентрации 5 ммоль/л.

Определение общего количества связанных с белками гексоз. К 0,1 мл исследуемой сыворотки или плазмы приливают 5 мл 96 % этилового спирта, перемешивают и центрифугируют 5 мин. Осадок тщательно взбалтывают в 5 мл 96 % этанола, снова центрифугируют и удаляют надосадочную жидкость. Осадок растворяют в 1 мл 0,1 н. NaOH, добавляют 8,5 мл орцинового реактива, перемешивают и ставят на водяную баню при 80 °С точно на 15 мин; следует избегать попадания прямого дневного света. Охлаждают в темноте в холодной воде и фотометрируют в кювете с длиной оптического пути 1 см при длине волны 560 нм против холостого опыта, при постановке которого берут вместо осадка, растворенного в щелочи, воду или 0,1 н. NaOH.

Построение калибровочной кривой. 0,05—0,3 мл основного калибровочного раствора доводят водой до объема 1 мл, приливают 8,5 мл орцинового реактива и обрабатывают дальше так же, как и опыт. Окраска раствора, в который взято 0,3 мл калибровочного раствора, соответствует окраске опытной пробы, в которую взята сыворотка, содержащая 15 ммоль/л гексоз. Окраска раствора, в который взято 0,2 мл калибровочного раствора, соответствует содержанию 10 ммоль/л гексоз и т.д.

Определение гексоз, связанных с серомукоидом. К 1 мл сыворотки или плазмы добавляют 1 мл воды и после перемешивания осторожно по стенке приливают 2 мл

0,6 н. хлорной кислоты, перемешивают и оставляют стоять 10 мин, после чего центрифугируют 10 мин при 4000 об/мин. Надосадочную жидкость сливают в чистую пробирку, добавляют 2 мл 5 % раствора фосфорновольфрамовой кислоты, перемешивают и центрифугируют. Надосадочную жидкость удаляют, к осадку добавляют 2 мл 96 % этилового спирта, снова перемешивают и центрифугируют 10 мин при 4000 об/мин. Надосадочную жидкость удаляют, осадок растворяют в 1 мл 0,1 н. NaOH, приливают 8,5 мл орцинового реактива. Дальнейшее определение проводят так же, как определение общего количество связанных с белками гексоз.

П о с т р о е н и е к а л и б р о в о ч н о г о г р а ф и к а . 0,05—0,5 мл калибровочного раствора доводят водой до объема 1 мл и приливают 8,5 мл орцинового реактива; дальнейшее определение проводят так же, как и в опыте. Окраска раствора, в который взято 0,5 мл калибровочного раствора, соответствует содержанию гексоз, связанных с серомукоидом 2,5 ммоль/л. Окраска раствора, в который взято 0,4 мл калибровочного раствора, соответствует содержанию в сыворотке 2 ммоль/л связанных с серомукоидом гексоз и т. д.

П р и м е ч а н и е . Препараты орцина обычно нуждаются в дополнительной очистке. Для этого препарат нагревают на водяной бане при 60—65 °С, при этом образуются два слоя — собственно расплавленный орцин и вода, нагревание продолжают до тех пор, пока вся вода не испарится. Осадок при нагревании растворяют в минимальном количестве бензола, добавляют активированный уголь, перемешивают, в горячем виде фильтруют и охлаждают. При этом выпадают кристаллы орцина. Перекристаллизацию повторяют дважды.

Н о р м а л ь н ы е в е л и ч и н ы . Общее количество гексоз, связанных с белками сыворотки или плазмы, составляет в норме 5,8—6,6 ммоль/л, из них с серомукоидом связано 1,2—1,6 ммоль/л.

К л и н и ч е с к о е з н а ч е н и е . Самые разнообразные воспалительные процессы приводят к увеличению содержания связанных с белками или серомукоидом сыворотки гексоз. Наибольшее диагностическое значение имеет их определение для выявления вяло текущих воспалительных процессов, повышение этих показателей свидетельствует об активации процесса, даже если клинические симптомы еще не проявились. Чаще всего связанные с белками гексозы исследуют ревматологи.

5.5.5. Гексуриновые кислоты

Содержание гексуриновых кислот, входящих в состав гликозаминогликанов мочи, определяется карбазоловым и орциновым методами.

П р и н ц и п . Гликозаминогликаны мочи осаждаются в виде комплексов с цетилтриметиламмонийбромидом, осадки отмывают и растворяют в слабой щелочи. Входящие в состав ГАГ гексуриновые кислоты определяют по цветным реакциям с орцином и карбазолом в присутствии

крепкой серной кислоты. Глюкуроновая кислота дает такое же окрашивание, как и галактуриновая (идуриновая) кислота при обработке орциновым реактивом, но с карбазоловым реактивом идуриновая кислота дает окрашивание на 21 % менее интенсивное, чем глюкуроновая кислота.

Р е а к т и в ы . 1. Раствор цетавлона. Водный раствор цетилтриметиламмонийбромид, 25 г/л. 2. 95 % этиловый спирт, насыщенный хлоридом натрия при комнатной температуре. 3. Карбазоловый реактив. Раствор карбазола 1 г/л в этиловом спирте. 4. Орциновый реактив: 0,2 г орцина растворяют в 100 мл концентрированной серной кислоты х. ч., отн. плотности 1,84. Реактив может храниться до 2 нед в посуде из темного стекла в холодильнике. 5. Серная кислота х. ч. 6. 1 н. NaOH. 7. 2 н. HCl. 8. Универсальная индикаторная бумага. 9. Калибровочные растворы глюкуроновой кислоты в воде, содержащие 5—100 мг/л.

Х о д о п р е д е л е н и я . Выделение цетавлоновых осадков. Собирают суточную мочу, отдельные порции до объединения хранят в холодильнике. Если плотность мочи ниже 1,020, для исследования берут 30 мл, в противном случае берут 15 мл и добавляют 15 мл воды. Перед отбором пробы суточное количество мочи тщательно перемешивают и не фильтруют. Добавлением 2 н. HCl под контролем рН метра или индикаторной бумаги кислотность исследуемой пробы доводится до рН 5,0. Затем добавляют 1 мл раствора цетавлона и оставляют на ночь в холодильнике. На следующий день центрифугируют при комнатной температуре 15 мин при 2000 об/мин. Надосадочную жидкость осторожно удаляют, а пробирки оставляют в перевернутом положении на 1 мин, чтобы с осадка успела стечь жидкость. Осадок дважды промывают порциями по 5—10 мл 95 % этилового спирта, насыщенного хлоридом натрия, каждый раз тщательно измывают осадок палочкой и центрифугируют его. Отмытый осадок растворяют в 1,5 мл воды, подщелоченной 2 каплями 1 н. NaOH, затем объем доводят до 5 мл. Если раствор окажется мутным и его оптическая плотность будет выше 0,7, то добавляют еще 5 мл воды, доводя суммарный объем до 10 мл. Осадок, не растворившийся в щелочи, удаляют.

Ц в е т н а я р е а к ц и я с к а р б а з о л о м (п о Д и ш е) . К 1 мл растворенного цетавлонового осадка приливают при охлаждении 6 мл концентрированной серной кислоты, нагревают на кипящей водяной бане 20 мин, охлаждают до комнатной температуры и добавляют 0,2 мл карбазолового реактива. Появляется розовое окрашивание, которое усиливается на протяжении 2 ч, а потом в течение 1 ч остается стабильным. Фотометрируют через 2 ч в кювете с длиной оптического пути 1 см при длине волны 540 нм против холостого опыта, при постановке которого вместо цетавлонового осадка берут воду.

Ц в е т н а я р е а к ц и я с о р ц и н о м (п о С в е н н е р х о л ь м у) . К 2 мл растворенного цетавлонового осадка добавляют 4 мл орцинового реактива и оставляют на 15 мин, затем тща-

Очистку орцина см. с. 237, левая колонка.

5.5.6. Гликозилированный гемоглобин

тельно перемешивают и ставят еще на 20 мин в водяную баню при 80 °С; охлаждают на льду и фотометрируют при длине волны 505 нм в кювете с длиной оптического пути 1 см против холостого опыта, при проведении которого к 2 мл растворенного цетавлонового осадка добавляют вместо орцинового реактива 4 мл серной кислоты из той же самой партии, которая была использована для приготовления реактива 4; холостую пробу обрабатывают так же, как опытную.

Построение калибровочного графика. При построении калибровочных графиков для карбазоловой и орциновой реакции используют одну и ту же серию калибровочных растворов, содержащих 5—100 мкг глюкуроновой кислоты в 1 мл воды. Калибровочные пробы обрабатывают так же, как и опытные. По калибровочному графику вычисляют содержание глюкуроновой кислоты в микрограммах в 1 мл растворенного цетавлонового осадка. Эту величину делят на 1,5; 3 или 6 в зависимости от того, какому количеству мочи соответствует 1 мл растворенного осадка.

Окончательный результат выражают в миллиграммах за сутки. Можно выразить его и в миллиграммах на 1 г креатинина, для этого концентрацию гексурановых кислот (мг/л) делят на концентрацию креатинина (г/л). Для пересчета результатов в молекулярные величины найденное количество делят на молекулярную массу глюкуроновой кислоты, т. е. на 196; в связи с тем что молекулярные массы глюкуроновой и идуроновой кислот одинаковы, расчеты совпадают. Для вычисления коэффициента К/О количество гексурановых кислот, определенное карбазоловым методом, делят на их количество, определенное орциновым методом.

Нормальные величины. Выведение гексурановых кислот у детей 10—15 лет составляет 5—10 мг/л, у взрослых 2,4—3,9 мг/л, или около 2 мг на 1 г креатинина. Коэффициент К/О в норме близок к единице.

Литература. Меркурьева П. В., Гусев М. П. Сравнительная оценка методов определения гликозаминогликанов мочи.— Лаб. дело, 1974, № 3, с. 162—166; DiFerrante N., Rich C. The determination of acid aminopolysaccharide in urine.— J. Lab. and Clin. Med., 1956, vol. 48, № 3, p. 491—499; Dische Z. A specific color reaction for glucuronic acid.— J. Biol. Chem., 1947, vol. 71, p. 725—730.

Клиническое значение. Увеличение содержания в моче гексурановых кислот бывает при приобретенных заболеваниях, поражающих соединительную ткань,—ревматизме, склеродермии. Уменьшение коэффициента К/О в этом случае характерно для более тяжелых, деструктивных процессов. Значительное увеличение имеет место также при врожденной патологии — мукополисахаридозах; в этом случае увеличение коэффициента К/О характерно для болезни Гурлера, а уменьшение этого коэффициента — для болезни Хантера.

Белки, в том числе гемоглобин, если их длительное время выдерживать в растворе, содержащем глюкозу или другой редуцирующий моносахарид, присоединяют ее остатки за счет химических, неэнзиматических процессов. Чем выше концентрация глюкозы в растворе и чем длительнее инкубация, тем больший процент молекул гемоглобина гликозилируется, поэтому содержание гликозилированного гемоглобина (Gly-Hb) характеризует средний уровень концентрации глюкозы в крови за время жизни молекулы гемоглобина. Лечение диабета проводят с помощью лекарств, понижающих содержание глюкозы в крови лишь на ограниченный промежуток времени, очень важно подобрать такие схемы терапии, которые позволили бы добиться стойкой нормализации гликемии. Исследование гликозилированного гемоглобина оказывается ценным лабораторным показателем, характеризующим некоторый средний уровень глюкозы в крови на протяжении длительного промежутка времени, который соизмерим с длительностью полужизни молекулы гемоглобина (3—4 мес). Количество гликозилированного гемоглобина выражают в молярных процентах, т. е. в количестве остатков моносахарида, которые приходится на 100 молекул гемоглобина. Его уровень повышается при сахарном диабете и характеризует степень его компенсации, уменьшается он при омоложении популяции молекул гемоглобина, что бывает при активном синтезе гемоглобина, например при регенерации после кровопотери.

Методы определения. Для определения гликозилированного гемоглобина предложено много способов, включающих хроматографию или электрофорез на различных фазах. Химические методы заключаются в том, что связь между молекулой белка и моносахаридным остатком разрушается гидролизом и освободившиеся молекулы моносахарида определяются по цветной реакции. Результаты определения во многом зависят от выбранного метода. Наиболее точными в настоящее время считаются хроматографические методы, но они трудоемки и требуют специальной аппаратуры и реактивов. Поэтому в настоящем справочнике приводится относительно менее точный химический метод, который, однако, проще и может быть выполнен в КДЛ.

Метод по реакции с тиобарбитуровой кислотой. Принцип. Эритроциты отмываются от белков плазмы и глюкозы; содержащийся в них гликозилированный гемоглобин гидролизуются нагреванием со шавелевой кислотой, при этом из остатков моносахарида образуется 5-оксиметилфурфурол, количество которого определяется по цветной реакции с тиобарбитуровой кислотой. Одновременно определяют концентрацию гемоглобина в гемолизате, результаты выражают процентами молекул гемоглобина, которые гликозилированы.

Реактивы. 1. Кислота шавелевая, 0,5 моль/л: растворяют 22,5 г $H_2C_2O_4$ в 0,5 л воды. Реактив сток. 2. Кислота шавелевая,

0,2 моль/л: готовят из 0,5 моль/л, смешивая 40 мл реактива Г и 60 мл воды. 3. Трихлоруксусная кислота, 400 г/л (40%); хранят в холодильнике. 4. Натрия хлорид, 9 г/л (изотонический раствор). 5. Тиобарбитуровая кислота, 50 ммоль/л: растворяют 0,72 г тиобарбитуровой кислоты примерно в 80 мл воды, доводят рН до 6,0, добавляя 1 н. едкий натр; переливают в мерную колбу и доводят объем водой до 100 мл. 6. Реактивы, необходимые для определения гемоглобина в гемоллизате. 7. Калибровочный раствор 5-оксиметилфурфуrolа: 126 мг неокрашенного препарата растворяют в 100 мл 0,25 моль/л раствора щавелевой кислоты; получается раствор, содержащий 10 ммоль/л. Его разводят в 100 раз тем же раствором щавелевой кислоты; получается раствор с концентрацией 100 мкмоль/л. Из него путем соответствующего разведения 0,25 моль/л щавелевой кислотой готовят серию калибровочных растворов с концентрациями 12,5—100 мкмоль/л. Хранят в замороженном состоянии при -20°C . Вместо калибровочного раствора 5-оксиметилфурфуrolа можно использовать растворы фруктозы, которые готовят точно так же, только для исходного раствора с концентрацией 10 ммоль/л берут 180 мг фруктозы, которые растворяют в 100 мл раствора щавелевой кислоты 0,25 моль/л.

Ход определения. Кровь для исследования берут, используя в качестве антикоагулянта этилендиаминтетрауксусную кислоту или ее соли. В 10 мл изотонического раствора хлорида натрия выливают 0,3—0,5 мл цельной крови, перемешивают и центрифугируют. Надосадочную жидкость удаляют, к осадку эритроцитов снова добавляют 10 мл изотонического раствора хлорида натрия, перемешивают и снова центрифугируют. Отмытые эритроциты могут храниться в ожидании анализа при -4°C до 15 дней.

Взвесь плотноупакованных эритроцитов в количестве 0,1 мл переносят в 1,4 мл воды и перемешивают, в растворе определяют гемоглобин любым методом. При этом надо иметь в виду, что концентрация гемоглобина в растворе примерно в 7 раз меньше, чем в цельной крови, т. е. около 20 г/л. Результаты выражают в молях на 1 л.

К 1 мл гемоллизата добавляют 0,5 мл щавелевой кислоты 0,5 моль/л и закрывают пробирку плотной резиновой пробкой, в которую вставлена тонкая игла для инъекций. Закрытую пробкой пробирку ставят на кипящую водяную баню и через 10 мин вынимают иглу, а плотно закрытую пробирку продолжают нагревать при 100°C еще 5 ч. После этого охлаждают в ледяной воде и добавляют 1 мл охлажденной на льду трихлоруксусной кислоты. Тщательно перемешивают и осадок отделяют центрифугированием в течение 10 мин при 1000g. К 1,5 мл надосадочной жидкости добавляют 0,5 мл раствора тиобарбитуровой кислоты и помещают на 30 мин в водяную баню при 40°C , после этого фотометрируют

в кювете с длиной оптического пути 1 см при длине волны 443 нм против холостого опыта, окраска стабильна на протяжении по крайней мере 2 ч.

На всю серию определений ставят один холостой опыт. Для этого смешивают остатки нескольких гемоллизатов и из верхнего слоя отбирают 1 мл, в нем проводят гидролиз и осаждение белков трихлоруксусной кислотой; так же как и в опыте, отбирают 1,5 мл надосадочной жидкости, но к ней добавляют вместо раствора тиобарбитуровой кислоты 0,5 мл воды. Смесь инкубируют вместе с пробами 30 мин при 40°C .

Для построения калибровочного графика к 1 мл калибровочного раствора, содержащего 5-оксиметилфурфуrol в концентрации 12,5—100 мкмоль/л, добавляют 0,5 мл воды и 1 мл раствора трихлоруксусной кислоты, из пробы отбирают 1,5 мл, к которым добавляют 0,5 мл раствора тиобарбитуровой кислоты и ставят цветную реакцию, инкубируя на водяной бане при 40°C в течение 30 мин, так же как и в основном опыте. Калибровочные пробы фотометрируют против холостой калибровочной пробы, в которую вместо калибровочного раствора 5-оксиметилфурфуrolа берут 1 мл раствора щавелевой кислоты 0,25 моль/л.

Для выполнения расчета сначала вычисляют содержание гликозилированного гемоглобина в 1 л эритроцитов, для этого содержание 5-оксиметилфурфуrolа, вычисленное по калибровочному графику, умножают на 15 (разведение при получении гемоллизата). Затем вычисляют содержание гемоглобина в той же эритроцитарной массе, умножая содержание его в гемоллизате на 15; чтобы перевести полученный результат в ммоль/л, его делят на 64. Чтобы количество гликозилированного гемоглобина выразить в молярных процентах, его содержание в эритроцитарной массе, выраженное в ммоль/л, делят на содержание гемоглобина в тех же единицах и умножают на 100. Для расчета можно воспользоваться формулой:

$$\frac{\text{Гли-Нб} \cdot 64}{\text{Нб} \cdot 100} = \text{молярные \% гли-Нб,}$$

где Гли-Нб — содержание оксиметилфурфуrolа в гемоллизате (ммоль/л); Нб — содержание гемоглобина в гемоллизате (г/л).

Примечание. В данном методе после гидролиза и осаждения белков трихлоруксусной кислотой раствор оказывается слегка окрашенным, поэтому вводят специальную холостую пробу. Ее оптическая плотность очень мало варьирует от одного гемоллизата к другому, поэтому можно ставить только одну пробу на всю серию.

'Согласно данным автора метода, содержание 5-оксиметилфурфуrolа в калибровочном растворе может быть рассчитано по формуле:

$$813 \cdot E_{443} - 6,18,$$

где E_{443} — оптическая плотность при длине волны 443 нм.

Нормальные величины. Содержания гликозилированного гемоглобина, определенное этим методом, 4,5–6,1 молярных %, коэффициент вариации методики, по данным авторов, 5,7 %.

Литература. *Standefer J. C., Eaton R. P.* Evolution of colorimetric method for determination of glycosylated hemoglobin.— *Clin. Chem.*, 1983, № 1, vol. 29, p. 135–137.

Клиническое значение. Количество гликозилированного гемоглобина — важный показатель эффективности лечения диабета. Чем ближе к норме его содержание, тем лучше подобрана терапия.

5.5.7. Молочная кислота

Метод по реакции с параоксидифенилом.

Принцип. Из молочной кислоты в присутствии серной, фосфорной кислот и солей меди образуется уксусный альдегид, который, реагируя с параоксидифенилом ($C_6H_5C_6H_4OH$), дает фиолетово-окрашенные продукты. Реакция очень чувствительна, поэтому надо строго выдерживать все условия выполнения исследования.

Реактивы. 1. Концентрированная серная кислота, выдерживающая пробу Савалы. От ее качества зависит возможность выполнения анализа, иногда качество кислоты можно улучшить, нагревая ее и по каплям добавляя в нагретую кислоту перекись водорода. 2. Смесь из 3 г медного купороса ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$) и 9 мл ортофосфорной кислоты. Должен образоваться гомогенный раствор, на что уходит некоторое время. 3. 1,5 % раствор параоксидифенила ($C_6H_5C_6H_4OH$) в диметилформамиде. Растворяют 15 мг параоксидифенила в 1 мл диметил-

формамида. 4. 5 % трихлоруксусная кислота (0,3 н.).

Ход определения. 0,02 мл крови выливают в 1 мл 5 % трихлоруксусной кислоты, через несколько минут центрифугируют. К 0,2 мл безбелкового фильтрата прибавляют 0,1 мл смеси медного купороса и фосфорной кислоты и 2,5 мл концентрированной серной кислоты. Энергично встряхивают и точно через 3 мин ставят ровно на 3 мин в кипящую водяную баню, затем еще 3 мин охлаждают в ледяной воде. Добавляют 1 каплю раствора параоксидифенила в диметилформамиде, эта капля должна сразу попасть в центр пробирки; встряхивают и оставляют стоять 10 мин при комнатной температуре. После этого нагревают на кипящей водяной бане 1'/2 Мин, охлаждают в воде и фотометрируют при длине волны 565 нм.

Одновременно ставят холостой опыт, в который вместо безбелкового фильтрата берут 5 % раствор трихлоруксусной кислоты, и калибровочные опыты, в которые берут растворы трихлоруксусной кислоты, содержащие в 0,2 мл 2–20 ммоль молочной кислоты или молочно-кислого лития; их обрабатывают так же, как опытные. Окраска калибровочной пробы, в которую взято 2 ммоль молочной кислоты, соответствует пробе с содержанием 0,5 ммоль/л; соответственно окраска пробы, содержащей 20 ммоль, соответствует концентрации 5 ммоль/л.

Нормальные величины. В хорошо артериализованной крови содержание молочной кислоты должно быть ниже 1 ммоль/л.

Литература. *Балаховский И. С., Наточин Ю. В.* Проблема космической биологии.— М.: Наука, 1973, т. XXII, с. 32.

Клиническое значение. Любая форма гипоксии — при наркозе, физической нагрузке, местном нарушении кровообращения — приводит к увеличению содержания молочной кислоты в крови.

5.6. ЛИПИДЫ

Липиды нерастворимы в воде, поэтому в плазме крови они присутствуют только в составе липопротеидов, которые образуют устойчивые коллоидные растворы и по многим свойствам близки к белкам. Для каждого липопротеида специфична его белковая часть — апопротеид, которая и определяет свойства комплекса в целом и его клинико-физиологическое значение. Липидная часть менее специфична, так как разные липопротеиды содержат одни и те же липидные вещества, но в разных соотношениях. Исследовав липидный состав плазмы, можно лишь приблизительно оценить ее липопротеидный состав.

Различают три группы, или семейства, липопротеидов. Наиболее крупные частицы у хиломикрон и липопротеидов очень низкой плотности (VLDL), они богаты триглицеридами, содержат апопротеиды, обозначаемые латинской буквой С. Менее крупные частицы у липо-

протеидов низкой плотности (LDL), которые содержат апопротеиды группы В, при электрофорезе попадают главным образом в (3-полосу. Самые мелкие частицы у липопротеидов высокой плотности (HDL), в состав которых входят апопротеиды А, при электрофорезе они попадают в α-полосу.

Поскольку современная лабораторная диагностика не располагает простыми и надежными методами количественного определения индивидуальных липопротеидов по их апопротеидам, приходится использовать косвенные методы; электрофоретическое исследование, осаждение гепарином и определение содержания отдельных липидов.

В плазме крови человека присутствуют четыре основных класса липидов: 1) холестерин и его эфиры; 2) триглицериды; 3) фосфолипиды; 4) неэтерифицированные жирные кислоты (НЭЖК). Первые три класса веществ образуют

комплексы с апопротеидами и входят в состав липопропротеидов, НЭЖК главным образом адсорбированы на альбумине. Наибольшее клиническое значение имеет определение холестерина и триглицеридов — клиническое значение НЭЖК значительно скромнее; фосфолипидам крови сейчас также не придают большого клинического значения.

Для определения холестерина используются обычно характерные для него цветные реакции, триглицериды определяют по количеству входящего в их состав глицерина, НЭЖК — титрометрическим методом, а фосфолипиды — по входящему в их состав фосфору. В настоящем разделе рассматриваются лишь методы определения холестерина, триглицеридов и НЭЖК; определение фосфолипидов излагается вместе с методами определения фосфорных соединений. Перспективен метод инфракрасной спектроскопии, позволяющий одновременно определять концентрацию нескольких различных липидов.

Сложноэфирная связь, соединяющая остатки жирных кислот с глицерином в триглицеридах и фосфолипидах, а также участвующая в образовании эфиров холестерина, очень нестойка, она разрушается в щелочной среде, а также под влиянием присутствующей в плазме диацилглицеролипазы, которая активируется гепарином, вероятно, и под действием других гидролитических ферментов. Поэтому кровь для исследования липидов необходимо брать с соблюдением ряда предосторожностей: лучше всего анализировать плазму, полученную с ЭДТА (трилоном Б) в качестве антикоагулянта; получение плазмы должно проводиться по возможности на холоду, а хранение должно быть ограниченным по времени.

5.6.1. Холестерин и его эфиры

Находящийся в тканях свободный (неэтерифицированный) холестерин входит в состав клеточных мембран. Переходя в плазму крови, он там этерифицируется, образуя сложные эфиры с жирными кислотами, источником которых служит фосфатидилхолин (лецитин). Реакция переэтерификации ускоряется плазмаспецифическим ферментом фосфатидилхолинхолестеринацилтрансферазой, которая вырабатывается печенью. При заболеваниях печени, когда нарушена выработка фермента, количество эфиров холестерина в плазме крови уменьшается. Среди жирных кислот, которые соединяются эфирной связью с холестерином, больше всего линолевой (18:2), олеиновой (18:1) и пальмитиновой (16:0) кислот. В меньших количествах присутствуют и другие жирные кислоты с 16—20 атомами углерода; соотношение их может сильно варьировать и зависит главным образом от состава поступающих с пищей жиров. Помимо холестерина, в организме, в частности в плазме крови, присутствуют в небольших количествах продукты его неполного биосинтеза и распада, растительные стероиды из пищи, сульфитированные производные и т. д. Присутствие этих производных, хотя и в небольших количествах, так же как и измен-

чивость остатков жирных кислот, образующих эфиры, осложняет анализ.

В эритроцитах, так же как и в других клетках, содержится лишь свободный холестерин, количество которого значительно отличается от содержания в плазме, поэтому, хотя и прослеживается общий параллелизм между его содержанием в плазме и цельной крови, практически для исследования пригодна лишь плазма или сыроворотка.

Методы определения. Самым точным методом определения холестерина считается ферментативный, основанный на действии холестериноксидазы, в результате чего образуются холестенон и перекись водорода. Оба эти вещества могут быть определены сравнительно простыми методами: холестенон — по изменению светопоглощения при длине волны 240 нм, перекись водорода — теми методами, которые используются при определении глюкозы. Сложность ферментных методов определения холестерина в первую очередь определяется дефицитом соответствующих ферментов, которые трудно очистить от каталазы, разрушающей перекись водорода, а также тем, что фермент активен лишь в отношении свободного холестерина, поэтому эфирносвязанный холестерин должен быть предварительно гидролизован. Преимущество ферментного метода состоит в том, что он может быть применен непосредственно к сыроворотке или плазме без предварительного разрушения липопротеидных комплексов. В условиях лаборатории лечебного учреждения можно наладить такое определение холестерина только с помощью выпускаемых промышленностью наборов реактивов, поэтому в справочнике эти методы не приводятся.

При окислении холестерина, так же как и при его дегидратировании, могут образовываться самые разнообразные окрашенные или флуоресцирующие продукты. На этом основано несколько цветных реакций на холестерин. Из них в аналитических целях широкое распространение получили две: Либермана—Бурхарда и Златкиса—Зака. Первая из них заключается в том, что в сильно кислой среде в присутствии уксусного ангидрида от холестерина отщепляется вода и образуется окрашенное в зеленовато-синий цвет соединение, содержащее несколько сопряженных двойных связей, предположительно бисхолестадиенилмоносульфоновую кислоту. Реакция может протекать в самых разнообразных растворах, содержащих, помимо уксусного ангидрида, уксусную и серную кислоты, а также органические растворители, лишь бы среда была абсолютно безводной. Протеканию реакции способствуют арилсульфоновые кислоты — сульфосалициловая, паратолуенсульфоновая, диметилбензолсульфоновая. Эфиры холестерина в этих условиях расщепляются и окрашивание развивается, но реакция идет медленнее, чем со свободным холестерином. Реакция ускоряется при повышении температуры, яркий свет разрушает окрашенные продукты. Помимо холестерина, ряд других родственных продуктов дает такое же окрашивание, но в связи с тем что в биологических жидкостях их мало, реакция оказывается

достаточно специфичной для холестерина, превосходя в этом отношении другие химические реакции. Наиболее вероятная причина завышенных результатов — присутствие билирубина или гемоглобина.

Другая цветная реакция, получившая широкое распространение в медицинской практике, называется реакцией Златкиса—Зака. Она основана на том, что при окислении холестерина хлорным железом в концентрированной серной кислоте развивается красно-фиолетовое окрашивание. Эта реакция в 4—5 раз чувствительнее, чем реакция Либермана—Бурхарда, но менее специфична, поскольку более широкий круг веществ, в частности витамин А, дает такое же окрашивание, как и холестерин. Как и в случае реакции Либермана—Бурхарда, эфирно-связанный холестерин дает окрашивание, но менее, чем свободный.

Присутствующие в плазме крови эфиры холестерина образуются непосредственно в плазме в результате переноса остатков жирных кислот фосфатидилхолином (лецитина) на свободный холестерин. Эта реакция ускоряется плазмаспецифическим ферментом ЛХАТ, который вырабатывается печенью. При ее поражении синтез фермента нарушается и количество эфиров холестерина уменьшается. Поэтому степень этерификации холестерина имеет определенное клинико-диагностическое значение. Для ее определения чаще всего используют способность свободного холестерина образовывать нерастворимые соединения с дигитонином, томатином, пиридинсульфатом и другими веществами, по большей части гликозидами; используют также хроматографическое разделение свободного и эфирно-связанного холестерина, существуют и так называемые кинетические методы, которые основываются на том, что свободный холестерин образует цветное окрашивание, значительно быстрее, чем его эфиры. Для рядовых лабораторий, где работа выполняется вручную, хроматографические методы слишком громоздки, кинетические мало надежны, поэтому практически пригодны лишь методы с осаждением дигитонином. При определении эфиров холестерина всегда надо иметь в виду, что эти соединения непрочные, легко гидролизуются в щелочной среде.

Присутствующие в плазме крови белки и пигменты мешают количественному определению холестерина посредством цветных реакций, обуславливая дополнительное окрашивание или мутность раствора, поэтому наиболее точные методы предполагают выделение холестерина путем экстракции различными комбинациями смесей этилового и изопропилового спирта, эфира, ацетона и т. д. и омыление (гидролиз) эфиров щелочью. В последние годы, особенно после появления автоанализаторов, разработаны достаточно совершенные прямые методы, т. е. без предварительного выделения холестерина путем экстракции. Более старые, классические методы определения холестерина предусматривали использование в качестве экстрагентов смесей спирт—эфир или спирт—петролейный эфир, но оказалось, что экстракция изопропи-

ловым спиртом быстрее и эффективнее, поэтому она рекомендована в унифицированных методах. Поскольку холестерин обычно определяют в тех же случаях, что и триглицериды, желательно использовать реактив, одинаково хорошо экстрагирующий оба вещества, например смесь гексан—изопропиловый спирт—серная кислота. В целом при ручной работе экстракционные методы оказываются точнее и надежнее.

В некоторых случаях, например при проведении эпидемиологических исследований, желательно анализировать высушенный материал, который удобно пересылать и хранить. Для этого плазму крови высушивают на фильтровальных бумажках; сложность анализа в этом случае определяется тем, что прочность связи холестерина с белками увеличивается и приходится предварительно обрабатывать гемво-липидный комплекс щелочью, которая гидролизует большинство сложноэфирных связей.

Унификация методов. Учитывая разнообразие как возможностей, так и потребностей лабораторий различных лечебных учреждений, унифицировано несколько методов определения холестерина. Для небольших лабораторий неспециализированных лечебных учреждений подходит унифицированный в 1972 г. метод определения общего холестерина по реакции с уксусным ангидридом, а также унифицированный в 1972 г. прямой метод определения общего и эфирно-связанного холестерина по реакции с хлорным железом. Для более крупных лабораторий лечебных учреждений кардиологического или эндокринологического профиля более подходит унифицированное в 1979 г. определение общего и свободного холестерина по реакции с хлорным железом после экстракции изопропанолом.

Общий холестерин. Унифицированный метод по реакции с уксусным ангидридом (метод Илька). П р и н ц и п. Присутствующий в плазме или сыворотке крови холестерин и его эфиры дают цветное окрашивание при обработке смесью уксусного ангидрида, серной и уксусной кислот.

Р е а к т и в ы. 1. Ледяная уксусная кислота. 2. Концентрированная серная кислота. 3. Уксусный ангидрид. 4. Абсолютный этиловый спирт. 5. Кислотная смесь: в сухую колбу наливают 10 мл ледяной уксусной кислоты и 50 мл уксусного ангидрида, затем при постоянном перемешивании и охлаждении добавляют 10 мл концентрированной серной кислоты. Смесь должна быть бесцветной или слегка желтоватой, хранить в холодильнике в темной склянке с притертой пробкой. 6. Калибровочный раствор: 232 мг холестерина растворяют в 2—3 мл хлороформа и доводят до объема 100 мл абсолютным этиловым спиртом. Приготовленный раствор содержит холестерин в концентрации 6 ммоль/л.

Ход определения. К 2,1 мл кислотной смеси медленно по стенке пробирки добавляют 0,1 мл плазмы или сыворотки без признаков гемолиза, перемешивают встряхиванием и ставят на 20 мин в термостат или водяную баню при 37 °С, затем фотометрируют в кювете с длиной

оптического пути 0,5 см против реактива при длине волны 625 нм.

Построение калибровочной кривой и расчет. К 0,05–0,2 мл калибровочного раствора добавляют такое количество кислотной смеси, чтобы общий объем был 2,2 мл, перемешивают и выдерживают 20 мин при 37 °С, так же как и опытные пробы, а затем фотометрируют. Окраска калибровочной пробы, в которую взято 0,05 мл калибровочного раствора, соответствует содержанию холестерина в плазме 3 ммоль/л, пробы, в которую взято 0,1 мл, — содержанию 6 ммоль/л и т. д.

Примечания. 1. Попадание воды приводит к помутнению раствора. 2. Следы гемолиза или желтушность исследуемой плазмы или сыворотки служат причиной завышенных результатов. 3. Можно использовать для фотометрии и кюветы с длиной оптического пути 1 см, тогда количество кислотной смеси удваивают, а количество исследуемого материала остается прежним.

Нормальные величины см. табл. 42.

Литература. *Лца* S. Zschr. ges. inn. Med., 1962, В. 17, Н. 2, S. 83.

Унифицированный метод по реакции с хлорным железом (метод Златкис—Зака). **Принцип.** Содержащийся в плазме или сыворотке крови свободный и эфирносвязанный холестерин окисляется хлорным железом в присутствии уксусной, серной и фосфорной кислот с образованием ненасыщенных продуктов, окрашенных в красно-фиолетовый цвет. Фосфорная кислота повышает стойкость реактива, содержащего хлорное железо.

Реактивы. 1. Ледяная уксусная кислота. Для проверки качества реактива к 2–4 мл уксусной кислоты добавляют несколько кристаллов перманганата калия, перемешивают. На протяжении 40 мин раствор не должен менять окраски. Кислоту, которая не выдерживает этого испытания, можно очистить, прокипятив с хромовым ангидридом и затем подвергнув перегонке. 2. Серная кислота концентрированная. 3. Железо хлорное $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. 4. Ортофосфорная кислота; содержит 85% H_3PO_4 . 5. Раствор хлорного железа: 2,5 г хлорного железа растворяют в 80 мл ортофосфорной кислоты, нагревая до полного растворения препарата, затем охлаждают и доводят объем до 100 мл ортофосфорной кислотой. 6. Цветной реактив: к 8 мл раствора хлорного железа добавляют серную кислоту так, чтобы суммарный объем был 100 мл. 7. Калибровочный раствор холестерина в уксусной кислоте: 116 мг холестерина растворяют в 100 мл ледяной уксусной кислоты. Раствор содержит холестерин в концентрации 3 ммоль/л.

Ход определения. К 1,3 мл уксусной кислоты осторожно добавляют 0,05 мл плазмы или сыворотки без следов гемолиза, перемешивают, а затем добавляют 1 мл цветного реактива, хорошо перемешивают встряхиванием и оставляют на 30 мин при комнатной температуре, после чего фотометрируют при длине вол-

ны 530 нм в кювете с длиной оптического пути 1 см против холостого опыта, в который берут 1,3 мл уксусной кислоты, 0,05 мл исследуемой сыворотки или плазмы и 1 мл концентрированной серной кислоты.

Для приготовления калибровочного графика вместо исследуемого материала берут 0,05–0,2 мл калибровочного раствора, к которому добавляют уксусную кислоту до суммарного объема 1,35 мл, а затем добавляют 1 мл цветного реактива. Проба, в которую взяли 0,05 мл калибровочного реактива, по окраске соответствует опытной пробе с содержанием холестерина в исследуемом материале 3 ммоль/л; проба, в которую взяли 0,1 мл калибровочного раствора, соответствует содержанию холестерина 6 ммоль/л и т. д. Расчет проводят по калибровочному графику.

Нормальные величины см. табл. 42

Литература. *Zlatkis A., Zak B., Boyle A. J. Lab. Clin. Med.*, 1957, vol. 50, №2, p. 318; *Rosenthal N. I. et al. J. Lab. Clin. Med.*, 1953, vol. 41, p. 486.

5.6.2. Экстракционные методы определения холестерина и его эфиров

Унифицированный метод по реакции с хлорным железом после экстракции изопропанолом.

Принцип. Холестерин и его эфиры экстрагируют из плазмы или сыворотки изопропанолом. Для определения общего содержания холестерина он весь окисляется хлорным железом в растворе уксусной, серной и фосфорной кислот с образованием ярко окрашенных красно-фиолетовых продуктов. Для определения свободного холестерина он осаждается в виде комплекса с дигитонином, осадок промывается ацетоном и содержание холестерина определяется по той же цветной реакции.

Реактивы. 1. Изопропиловый спирт (изопропанол). 2. Уксусная кислота ледяная. 3. Ортофосфорная кислота; содержит 85% H_3PO_4 . 4. Серная кислота концентрированная. 5. Железо хлорное, раствор в фосфорной кислоте: 2,5 г $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ растворяют при нагревании примерно в 80 мл ортофосфорной кислоты, объем доводят ортофосфорной кислотой до 100 мл. 6. Цветной реактив: к 8 мл раствора хлорного железа осторожно при перемешивании приливают серную кислоту до суммарного объема 100 мл. 7. Дигитонин, раствор 10 г/л: 1 г дигитонина растворяют при нагревании в 50 мл этилового спирта, добавляют 50 мл воды и через некоторое время, после охлаждения, фильтруют. 8. Ацетон. 9. Калибровочный раствор: 38,7 мг холестерина растворяют в 100 мл изопропанола, получают раствор, содержащий 1 ммоль/л; его разводят в 5 раз изопропанолом, получая раствор, содержащий 200 мкмоль/л.

Ход определения. К 0,2 мл исследуемой плазмы или сыворотки добавляют при постоянном встряхивании 4,8 мл изопропанола, тщательно перемешивают и через 10 мин

центрифугируют 5 мин, отсасывают надосадочную жидкость (экстракт); 1 мл экстракта используется для определения общего холестерина, а 2 мл — для определения свободного холестерина.

Для определения общего холестерина к 1 мл экстракта добавляют 2 мл уксусной кислоты, тщательно перемешивают, а затем добавляют 2 мл цветного реактива, опять перемешивают и оставляют стоять 10—15 мин. Фотометрируют в кювете с длиной оптического пути 0,5 см при длине волны 560 нм против холостой пробы, в которую берут вместо экстракта плазмы 1 мл изопропанола.

Для определения свободного холестерина к 2 мл экстракта добавляют 1 мл раствора дигитонина, закрывают пробкой и оставляют на 30 мин, после чего 10 мин центрифугируют. Надосадочную жидкость осторожно удаляют и выбрасывают, к осадку добавляют 3 мл ацетона, перемешивают и снова центрифугируют 5 мин. Надосадочную жидкость удаляют и оставляют пробирки открытыми на несколько минут для испарения остатков ацетона. К сухому осадку добавляют 1 мл изопропанола и 2 мл уксусной кислоты, перемешивают и затем добавляют 2 мл цветного реактива, при этом осадок должен полностью раствориться. Через 10—

15 мин фотометрируют при длине волны 560 нм в кюветах с длиной оптического пути 0,5 см против холостой пробы, в которую берут 1 мл изопропанола, 2 мл уксусной кислоты и 2 мл цветного реактива.

К а л и б р о в к а и р а с ч е т. Для калибровки к 1 мл калибровочного раствора добавляют 2 мл ледяной уксусной кислоты и 2 мл цветного реактива и через 10—15 мин фотометрируют в таких же условиях, как и опытные пробы. При расчете количества общего холестерина калибровочная проба соответствует содержанию 5 ммоль/л холестерина, а при расчете содержания свободного холестерина — 2,5 ммоль/л.

Л и т е р а т у р а. *Сентебова Н. А.* Предложения по унификации методов определения свободного и этерифицированного холестерина в сыворотке крови.— Лаб. дело, 1976, № 6, с. 375—380; *Leffler H.* Amer. J. Clin. Pathol., 1959, vol. 31, p. 310—313.

Н о р м а л ь н ы е в е л и ч и н ы. Содержание холестерина составляет 3,9—6,5 ммоль/л (150—250 мг в 100 мл), из них 70% этерифицированный, а 30% свободный. Более подробная возрастная норма приведена в табл. 40.

Т а б л и ц а 40. Верхние границы содержания холестерина в сыворотке здоровых мужчин в зависимости от возраста (по данным Института кардиологии АМН СССР)

	Возрастные группы (годы)					
	10—19	20—29	30—39	40—49	50—59	60 и более
Содержание холестерина, ммоль/л	5,5	5,84	6,18	6,54	6,88	7,22
Триглицериды, ммоль/л	1,53	1,82	2,21	2,71	3,27	3,94

К л и н и ч е с к о е з н а ч е н и е. Повышение содержания холестерина свидетельствует об угрозе развития атеросклероза; чаще всего холестерин увеличивается при II типе гиперлипидемии, повышается он также при диабете и нефритах. Понижение¹ содержания холестерина чаще всего бывает при гипертриглицеридемии.

Определение холестерина в биологическом материале, высушенном на бумаге. Принцип. При проведении эпидемиологических исследований возникает необходимость пересылать пробы, собранные для исследования; в этом случае удобно предварительно высушивать их на бумаге, так как это не только упрощает пересылку, но и обеспечивает консервацию. Пробы биологического материала — кровь, плазму, сыворотку — наносят на специально отмытую фильтровальную бумагу и высушивают на воздухе. Липопротеидный сгусток высушенного материала растворяют в щелочи, затем разделяют в смеси хлороформ—метанол на липидную и водорастворимую фракции. Липидную фракцию выпаривают и в сухом остатке определяют холестерин по цветной реакции с уксусным ангидридом. В процессе обработки щелочью эфиры холестерина разрушаются.

Р е а к т и в ы. 1. Бумага для высушивания крови. Используют хроматографическую бумагу или беззольные фильтры. Если при постановке холостого опыта выясняется, что в бумаге содержатся вещества, дающие цветную реакцию с уксусным ангидридом, ее обрабатывают в аппарате Соклета на протяжении 1—2 рабочих дней метанолом и дихлорметаном. 2. 0,3 н. раствор едкого натра (NaOH). 3. Смесь дихлорметан-метанол 2:1. В день определения смешивают 2 объема дихлорметана и 1 объем метанола (метилового спирта), готовят в таком количестве, которое будет израсходовано за 1 рабочий день. Вместо дихлорметана можно брать хлороформ. 4. Кислотная смесь: готовят в день определения путем смешивания 2,5 мл концентрированной серной кислоты, 25 мл уксусного ангидрида и 50 мл хлороформа. 5. Калибровочный раствор, 3 ммоль/л. Готовят, растворяя 58 мг холестерина в 50 мл хлороформа.

Х о д о п р е д е л е н и я. На сухую фильтровальную бумагу наносят микропипеткой исследуемый материал так, чтобы определенный участок бумажки был равномерно смочен, и дают высохнуть на воздухе. На краю бумаги, не смоченной плазмой, карандашом записывают номер пробы, фамилию и другие паспорт-

ные данные. Проба высыхает на воздухе обычно за 2—3 ч, после чего ее можно пересылать по почте, упаковывая в конверт и т. д.

Ножницами аккуратно вырезают пятно высушенного биологического материала, удаляя поля, на которых сделаны записи, бумажку разрезают на несколько кусочков и кладут в колбочку или стаканчик, куда наливают также 1,5 мл 0,3 н. NaOH и оставляют на несколько часов, желательно на ночь. Если исследуют кровь, полноту смывания легко контролировать по виду бумажки; если исследуется сыворотка, то конец растворения густка не виден, поэтому лучше оставить ее стоять на большее время. После этого добавляют 15 мл смеси метанол—дихлорметан или метанол—хлороформ, при этом образуется однородный раствор, который перемешивается легкими покачиваниями. Для расслоения добавляют 3 мл воды и слегка перемешивают стеклянной палочкой, внизу оказывается бесцветная неводная фаза, а наверху водная, которая может быть окрашенной, если высушивалась кровь или гемолизированная сыворотка. Нижнюю фазу отсасывают тонкой пипеткой, выпаривают в токе воздуха, к сухому остатку прибавляют 3 мл кислотной смеси и оставляют в темноте на 30 мин, после чего фотометрируют при длине волны 625 нм.

Одновременно ставят холостой опыт, в который вместо высушенного материала берут кусочки той же самой фильтровальной бумаги, на которой высушивали плазму; обычно используют обрезки от фильтров. Если холостой опыт дает заметную величину порядка 0,05—0,1, надо фотометрировать на трех длинах волн (525, 625 и 725 нм) и результаты рассчитывать по формуле:

$$E_{625} - \frac{E_{525} + E_{725}}{2}$$

В Противном случае достаточно фотометрировать против холостого опыта.

П о с т р о е н и е к а л и б р о в о ч н о й к р и в о й р а с ч е т . Для построения калибровочной кривой в три пробирки вносят 0,1; 0,2 и 0,3 мл калибровочного раствора, содержащего 3 ммоль холестерина в 1 л хлороформа, т. е. в первую пробирку берут 0,3 мкмоль, во вторую 0,6 мкмоль, а в третью 0,9 мкмоль. Калибровочные растворы выпаривают и ставят цветную реакцию так же, как и в опыте. По полученным точкам строят калибровочную кривую, учитывая, что первая точка соответствует содержанию холестерина в крови 3 ммоль/л, вторая — 6 ммоль/л, а третья — 9 ммоль/л.

Н о р м а л ь н ы е в е л и ч и н ы : 2,5—4 ммоль/л (100—160 мг в 100 мл) в цельной крови.

Л и т е р а т у р а . Балаховский И. С., Наточин Ю. В. Проблемы космической биологии.— М.: Наука, 1973, т. 22, с. 36—56.

5.6.3. Холестерин а-липопротеидов

Определение после осаждения в-липопротеидов гепарином в присутствии солей марганца.
П р и н ц и п . Липопротеиды, обладающие

электрофоретической подвижностью в и пре-в осаждаются гепарином в присутствии солей марганца и удаляются центрифугированием, при этом хиломикроны всплывают, образуя пленку. В растворе остаются только а-липопротеиды, в которых содержание холестерина определяют любым из описанных методов.

Р е а к т и в ы . 1. Марганца хлористого 1 моль/л раствор: 197,90 г $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ растворяют в воде и объем доводят в мерной колбе до 1 л. Препарат гигроскопичен, поэтому лучше сразу приготовить большое количество раствора, который разливают в несколько флаконов и используют по мере надобности. 2. Гепарин — фармакопейный раствор, содержащий 5000 ЕД в 1 мл. Разные препараты несколько отличаются по осаждающим свойствам, поэтому рекомендуют сделать запас из одной партии и всегда им пользоваться.

Х о д о п р е д е л е н и я . В пробирку, установленную в штативе на ледяной бане, помещают сначала 1 мл исследуемой плазмы или сыворотки, затем 0,04 мл препарата гепарина, перемешивают, после чего добавляют 0,04 мл 1 М раствора марганца хлорида, снова тщательно перемешивают и оставляют стоять на льду еще на 30 мин. Центрифугируют 30 мин при 2500 об/мин желательнее при температуре 4—6 °С. Пробирки из центрифуги надо вынимать осторожно, так как легко взмутить осадок. Нижний слой содержит осажденные в-липопротеиды, верхний — растворенные а-липопротеиды, над которым может плавать еще кольцо хиломикрон. Пипеткой с тонким носиком осторожно отсасывается слой, содержащий а-липопротеиды, который используют для определения холестерина любым из описанных выше методов.

Если сыворотка хилезная, сверху может быть большой слой хиломикрон, из-под которого трудно взять пробу. В этом случае рекомендуют повторить определение, взяв несколько миллилитров сыворотки и соответственно увеличив другие реактивы, при этом прозрачный слой оказывается больше и из него легче взять пробу.

Калибровку проводят так же, как и в методе определения холестерина, с той разницей, что содержание холестерина а-липопротеидов значительно ниже, чем общего, поэтому калибровочный раствор должен соответствовать содержанию 1—2 ммоль холестерина в 1 л.

Н о р м а л ь н ы е в е л и ч и н ы . 0,9—1,9 ммоль/л.

К л и н и ч е с к о е з н а ч е н и е . Содержание холестерина а-липопротеидов в крови здоровых людей мало меняется с возрастом и не подвержено колебаниям вследствие различных других причин. Величины ниже 0,9 ммоль/л свидетельствуют о нарушении липидного обмена и угрозе развития атеросклероза. Повышение содержания холестерина а-липопротеидов, как и повышение общего холестерина, в результате увеличения этой фракции, является доброкачественным состоянием.

Л и т е р а т у р а . Титов В. Н., Брснер Е. Д., Задоя А. А. и др. Метод и диагностическая

значимость исследования содержания холестерина в а-липопротеидах.— Лаб. дело, 1979, № 1, с. 36—41.

5.6.4. Триглицериды

Триглицериды или нейтральные жиры представляют собой сложные эфиры глицерина и трех остатков жирных кислот, чаще всего с 16 или 18 атомами углерода. Точный состав жирнокислотных остатков может колебаться в определенных пределах и зависит главным образом от характера питания. Поэтому говорят о триглицериде не как об индивидуальном химическом веществе, а как о группе родственных соединений. Это осложняет выражение результатов анализа в весовых единицах, т. е. в г/л или мг/100 мл, так как существующие аналитические методы позволяют определять количество молекул триглицеридов, но молекулярная масса в разных образцах может быть несколько отличной. Другая аналитическая сложность вызвана нестойкостью сложноэфирной связи, которая легко распадается в щелочной среде, а также под действием ферментов сыворотки или микроорганизмов.

Методы определения. Не существует химических реакций, специфичных для молекулы триглицерида в целом; их количество определяют чаще всего по содержанию глицерина, который образуется при щелочном или ферментативном гидролизе. Этот путь связан с той трудностью, что глицерин входит также в состав фосфолипидов, поэтому определение должно начинаться с выделения фракции нейтрального жира, свободной от фосфолипидов, или нужно проводить гидролиз очень специфическим ферментом, который бы отщеплял глицерин только от триглицеридов, но не от других соединений. Очень точный и удобный ферментативный метод заключается в том, что фосфоэнолпировиноградная кислота в присутствии АДФ и ферментов глицерокиназы и пируваткиназы фосфорилирует глицерин, при этом освобождается пировиноградная кислота, количество которой определяют по ее способности окислять НАД-Н в присутствии лактатдегидрогеназы, при этом поглощение света с длиной волны 330—340 нм падает. Для реализации этого метода необходимы три фермента и три кофактора, поэтому он может быть налажен только в тех лабораториях, где имеются соответствующие наборы реактивов заводского изготовления.

Химические методы основаны также на определении глицерина, который окисляют йодной кислотой до формальдегида, способного давать темно фиолетовое окрашивание с хромотроповой кислотой или желтое с ацетилацетоном. Последняя реакция имеет то удобство, что образующееся вещество можно определять не только спектрофотометрически, но и флуориметрически. Заслуживает внимания и весьма перспективный метод, основанный на измерении светопоглощения в инфракрасной области; его преимущество — можно одновременно определять несколько липидных соединений.

Унификация методов. В 1974 г. был унифицирован широко распространенный в то время, но трудоемкий метод определения триглицеридов, предложенный Карлсоном. Трудоемкость его была вызвана тем, что липидный экстракт, содержащий Триглицериды, очищался адсорбцией на кремниевой кислоте от фосфолипидов, а формальдегид, образовавшийся при окислении глицерина, определялся по реакции с хромотроповой кислотой, которая идет только в определенных условиях. Разработанные затем методы избирательной экстракции триглицеридов позволяют за один этап получать достаточно чистый экстракт. Метод упростился также благодаря использованию менее капризной реакции на формальдегид с ацетилацетоном. На этом основан метод, унифицированный в 1979 г.

Условия взятия материала для исследования. В связи с тем что Триглицериды — нестойкие соединения, легко разрушающиеся под влиянием сывороточных ферментов, исследование предпочтительнее делать в плазме, полученной с использованием трилона, так как гепарин тоже активирует липазу. Хранение пробы несколько дней, особенно если туда попадут микроорганизмы, также может быть причиной заниженных результатов.

Унифицированный метод по реакции с ацетилацетоном после экстракции смесью гептана и изопропилового спирта. Принцип. Триглицериды экстрагируются смесью гептана и изопропилового спирта, в которую переходит только неполярные липиды, а более полярные фосфолипиды остаются в водной фазе. Триглицериды омыляются (гидролизуются) щелочью, глицерин окисляется йодной кислотой до формальдегида, который определяется по цветной реакции с ацетилацетоном.

Реактивы: 1. Гептан. 2. Изопропиловый спирт (изопропанол) 3. 0,08 н. серная кислота (примерно 2,2 мл концентрированной H_2SO_4 на 1 л воды). 4. Едкое кали, 6,25 моль/л: 17,8 г КОН растворяют в 50 мл, осторожно добавляя гранулы щелочи в воду, охлаждая и перемешивая. 5. Уксусная кислота, 50 г/л. 6. Йодная кислота: растворяют 0,6 г HO_4-2H_2O (периодная кислота) в 100 мл 5 % уксусной кислоты. 7. Аммония ацетат 2 моль/л: растворяют 154 г ацетата аммония во воде, объем доводят до 1 л. 8. Ацетилацетоновый реактив: 1,5 мл ацетилацетона ($CH_3COCH_2COCH_3$) разводят раствором уксуснокислого аммония до суммарного объема 200 мл. Хранят в сосуде из темного стекла. 9. Калибровочный раствор триолеина, 2 ммоль/л. Содержит 170 мг триолеина в 100 мл изопропилового спирта. Можно использовать и другие калибровочные растворы, перечисленные в примечании.

Примечание. Если использовать для калибровки раствор триолеина в изопропиловом спирте, то после экстракции и расщепления объем верхней фазы в калибровочных пробах оказывается больше, чем в опытных, что приводит к заниженным результатам анализа. Чтобы избежать этой

ошибки, рекомендуют калибровочный раствор готовить по следующей прописи: 510 мг триолеина растворяют в 100 мл изопропилового спирта, получается исходный калибровочный раствор с содержанием 6 ммоль/л, из которого готовят по мере необходимости рабочий калибровочный раствор с содержанием 1,2 ммоль/л, разводя 1 объем исходного калибровочного раствора 4 объемами воды.

Ход определения. К 0,5 мл сыворотки или плазмы добавляют 2 мл гептана, 3,5 мл изопропилового спирта и 1 мл 0,08 н. серной кислоты, перемешивают и через 5 мин центрифугируют. Из верхнего (гептанового) слоя отбирают 0,4 мл, добавляют 2 мл изопропилового спирта и 1 каплю 6,25 н. КОН. Перемешивают, закрывают пробкой и нагревают на водяной бане 10 мин при 70 °С. После охлаждения добавляют 0,2 мл периодатного реактива и 1 мл ацетилацетонового реактива, после перемешивания снова закрывают пробкой и нагревают еще 10 мин при 70 °С. Развивается желто-зеленое окрашивание, интенсивность которого измеряют, фотометрируя при длине волны 425 нм в кюветах с длиной оптического пути 0,5 см против холостой пробы, которую ставят так же, как и опытную, но вместо исследуемого материала берут 0,5 мл воды.

Калибровочную пробу ставят так же, как и опытную, но вместо сыворотки или плазмы берут 0,5 мл калибровочного раствора и 0,5 мл воды; развивающаяся окраска соответствует окраске опытной пробы, в которую взята плазма с содержанием триглицеридов 2 ммоль/л. Расчет проводят по правилу пропорций или по калибровочному графику. Если используется калибровочный раствор, уже содержащий воду (см. примечание), то при постановке калибровочного опыта берут 0,5 мл рабочего калибровочного раствора, а воду не добавляют.

Литература. *Gottfried S. P., Rosenberg V.* Clin. Chem. 1973. vol. 19, № 9, p. 1077—1078.

Примечание. При отсутствии триолеина или трибутирина для калибровки можно использовать растительное масло, принимая, что образующие его триглицериды имеют ту же молекулярную массу, что и триолеин. Можно проводить калибровку, используя раствор глицерина в этаноле, в этом случае его непосредственно добавляют к щелочному раствору едкого кали.

Литература. *Carlson L. A.* Atherosclerosis Research, I 1963, vol. 3, p. 334—336.— Лаб. дело, 1976, № 6, с. 375—376.

Нормальные величины. В целом нормальной величиной содержания триглицеридов в плазме крови считают 0,55—1,65 ммоль/л (50—150 мг в 100 мл), но, так же как и для холестерина, верхняя граница нормальных величин у мужчин зависит от возраста, особенностей жизни и т. д. В качестве ориентира верхней границы возрастной нормы для мужчин можно принять данные Института кардиологии АМН СССР (см. табл. 42).

Клиническое значение. Наибольшее значение имеет определение триглицеридов для типирования эссенциальных гиперлипидемий, II частности дифференцирования типа ПА (изолированная гиперхолестеринемия) и ПБ (увеличение содержания и холестерина, и триглицеридов). Кроме того, повышение содержания триглицеридов бывает при нефротическом синдроме, переломах костей, гипотиреозе и алкоголизме, но большого диагностического значения при этих заболеваниях не имеет. В практическом отношении надо всегда помнить о существовании алиментарной гипертриглицеридемии.

5.6.5. Инфракрасная спектрофотометрия липидов

Принцип. Холестерин, его эфиры и триглицериды экстрагируются из исследуемой плазмы или сыворотки смесью гексан — изопропиловый спирт — серная кислота, в которую фосфолипиды не переходят. Растворитель выпаривают, а исследуемые вещества растворяют в четыреххлористом углероде; инфракрасный спектр этого раствора снимается. Все липиды имеют характерные пики поглощения в инфракрасной области спектра, поэтому не требуется проведения дополнительных химических реакций. Пики поглощения триглицеридов и холестерина пересекаются, поэтому расчет проводят по эмпирически подобранным формулам, которые позволяют исключать взаимную интерференцию определяемых веществ.

Реактивы. 1. Гексан. 2. Изопропиловый спирт (изопропанол). 3. Смесью гексан — изопропиловый спирт — 0,1 н. серная кислота 6:9:1. Готовят в день определения, смешивая 6 объемов гексана, 9 объемов изопропилового спирта и 1 объем 0,1 н. серной кислоты. 4. Четыреххлористый углерод. 5. Натрия хлорид.

Ход определения. К 0,2 мл исследуемой сыворотки или плазмы крови прибавляют 2 мл экстрагирующей смеси и энергично встряхивают. Добавляют в пробирку шепотку натрия хлорида, при этом на дне образуется, густая белая масса, над которой плавают прозрачная жидкость. Верхний слой осторожно переливают в сухую пробирку, где выпаривают в токе азота или воздуха. Сухой остаток может храниться неограниченно долго. Его растворяют в 1 мл четыреххлористого углерода и снимают спектр поглощения в инфракрасной области в кювете с длиной оптического пути 1 мм против аналогичной кюветы, заполненной четыреххлористым углеродом. При работе на приборе фирмы «К. Цейс-10» в диапазоне 1000—2000 см⁻¹ работают с призмой NaCl, а в диапазоне 2000—3500 см⁻¹ с призмой LiF.

Расчет проводят по эмпирической формуле:

$$\begin{aligned} \text{ХОЛ} &= -2,33 + 33,1 \cdot E_{1180} + 22,0 \cdot E_{1760} + \\ &+ 12,7 \cdot E_{2860} + 19,4 \cdot E_{2880}; \\ \text{ТГ} &= 0,53 + 8,35 \cdot E_{1180} + \\ &+ 5,76 \cdot E_{1760} + 3,18 \cdot E_{2860}; \end{aligned}$$

где ХОЛ и ТГ — концентрации холестерина и триглицеридов (моль/л) в исследуемой плазме или сыворотке, а Е — величины экстинкции при соответствующих волновых числах, выраженных в см (читается «обратные сантиметры»).

При работе на других типах приборов или переюстировке прибора формулу для расчета желательно проверить путем сопоставления результатов вычисления по ней с результатами химического определения холестерина и триглицеридов в гексан-изопропаноловом экстракте.

5.6.6. Неэтерифицированные жирные кислоты

Колориметрический метод определения медных солей. Принцип. При нейтральных и слабощелочных значениях рН медные соли жирных кислот экстрагируются из водных растворов различными неводными растворителями (в данном случае смесью хлороформ — гептан — метанол), в то же время в этих условиях ионы меди остаются в водной фазе. Поэтому количество меди, перешедшее в органическую фазу, отражает содержание неэтерифицированных (свободных) жирных кислот (НЭЖК). Медь определяют по цветной реакции с 1,5-дифенил-карбазидом.

Реактивы. 1. Хлороформ. 2. Гептан. 3. Метиловый спирт (метанол). 4. Экстракционная смесь. Смешивают 250 мл хлороформа, 250 мл гептана и 12 мл метилового спирта. 5. Меди нитрат 0,5 моль/л: готовят растворением 24,16 г $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ в 200 мл воды. 6. Триэтаноламин, 1 моль/л: готовят, растворяя 29,8 г триэтанолamina в воде (примерно 20,7 мл), объем доводят водой до 200 мл. 7. Едкий натр, 1 н. раствор. 8. Натрия хлорид, насыщенный водный раствор. 9. Медный реактив. В день определения смешивают 10 мл раствора меди нитрата, 10 мл раствора триэтанолamina и 6 мл 1 н. NaOH. Объем доводят до 100 мл насыщенным раствором хлорида натрия, после чего устанавливают рН 8,0, добавляя нужное количество 1 н. NaOH. 10. Дифенилкарбазид спиртовой раствор: 100 мг 1,5-дифенилкарбазид растворяют в 25 мл этилового спирта, непосредственно перед употреблением добавляют 0,24 мл триэтанолamina. 11. Калибровочный раствор. Для его приготовления можно использовать различные жирные кислоты с длинной цепью, но удобнее всего работать со стеариновой кислотой, так как она при комнатной температуре существует в твердом состоянии (температура плавления 70 °С). Исходный раствор с концентрацией 10 ммоль/л готовят, растворяя 284,5 мг в 100 мл хлороформа, из него готовят рабочие калибровочные растворы, содержащие 400—1000 мкмоль/л, путем разведения хлороформом.

Ход определения. К 0,05 мл сыворотки или плазмы добавляют 3 мл экстракционной смеси и 0,9 мл медного реактива, закрывают пробирку пробкой (лучше всего полиэтиленовой) и встряхивают 3 мин, после чего

центрифугируют. Отбирают 1,8 мл верхней фазы и добавляют к ней 0,5 мл раствора дифенилкарбазид, через 15 мин фотометрируют при длине волны 550 нм в кюветах с длиной оптического пути 1 см против холостого опыта, в который берут 1,8 мл экстракционной смеси, к которой добавлено 0,5 мл Дифенилкарбазид.

Расчет проводят по калибровочной кривой, для построения которой используют рабочие калибровочные растворы, содержащие 400—1000 мкмоль жирной кислоты в 1 л хлороформа; 0,05 мл рабочего калибровочного раствора обрабатывают так же, как и исследуемую плазму или сыворотку.

Примечание. Основной источник ошибок при определении неэтерифицированных жирных кислот (НЭЖК), или, как их иногда называют, свободных жирных кислот (СЖК), связан с тем, что в процессе получения сыворотки или при ее хранении происходит гидролиз нейтральных жиров (триглицеридов) и фосфолипидов и появляется дополнительное количество НЭЖК, которые неотличимы от уже существовавших в плазме. Поэтому желательно исследовать не сыворотку, а плазму, полученную на холоду без гепарина.

Нормальные величины неэтерифицированных жирных кислот в плазме: 400—800 мкмоль/л.

Литература. Прохоров М. Ю., Туннов М. П., Шакалис Д. А.—Лаб. дело, 1977, № 9, 535—536.

Клиническое значение. Увеличение количества НЭЖК обусловлено приемом пищи, а также различными факторами, стимулирующими липолиз (гепарин, адреналин и различные близкие ему по химической структуре или физиологическому действию вещества). Обычно если содержание глюкозы в крови возрастает, содержание НЭЖК уменьшается. Количество их возрастает при атеросклерозе, после инфаркта миокарда.

5.6.7. Липопротеиды

Определение фракций методом дискэлектрофореза в полиакриламидном геле. Принцип. Предварительно окрашенные липопротеиды сыворотки подвергают электрофорезу в направлении сверху вниз в колонке, заполненной четырьмя слоями полиакриламидного геля. Нижний слой геля самый мелкопористый, верхний самый крупнопористый. Липопротеиды в зависимости от размера их молекул задерживаются в разных участках геля.

Реактивы. 1. ТРИС — трис(оксиметил)аминометан. 2. Акриламид. 3. N, N'-метиленбисакриламид (МБА). 4. N, N, N', N'-тетраметилэтилендиамин (ТЕМЕД). 5. Рибофлавин. 6. Сахароза. 7. Глицин (аминоуксусная кисло-

та, гликокол). 8. Судан черный — насыщенный спиртовой раствор. Растворяют 100 мг в 5 мл этилового спирта. 9. Аммоний персульфат (аммоний надсерноокислый), 0,14 % раствор. Растворяют 140 мг $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ в 100 мл воды. Годен при хранении в холодильнике в течение недели. 10. Электродный тристеариновый буфер, рН 8,3: в 1 л воды растворяют 0,6 г ТРИС и 2,88 г глицина; с помощью HCl или едкого натра устанавливают рН 8,3. 11. Трис-буфер рН 8,9 — раствор А: к 36,6 г ТРИС добавляют около 40 мл воды, 48 мл 1 н. HCl и 0,23 мл ТЕМЕД; после растворения объем доводят до 100 мл водой и устанавливают рН 8,9. 12. Трис-буфер рН 6,7, раствор В: к 5,98 г ТРИС добавляют около 40 мл воды, 48 мл 1 н. HCl и 0,46 мл ТЕМЕД, доводят объем до 100 мл и устанавливают рН 6,7. 13. 28 % раствор акриламида — реактив С: 28 г акриламида и 0,735 г МБА растворяют в воде и доводят объем до 100 мл. 14. 10 % раствор акриламида — реактив D: 10 г акриламида и 2,5 г МБА растворяют в воде и объем доводят до 100 мл. 15. Раствор рибофлавина — реактив E: 4 мг рибофлавина растворяют в 100 мл воды. 16. 40 % раствор сахарозы — реактив F: 40 г сахарозы растворяют в воде и доводят объем до 100 мл.

Ход определения. Определение проводят в аппарате для вертикального электрофореза любой конструкции. Он представляет собой пластмассовый штатив с вертикально укрепленными стеклянными трубками длиной 70 мм и диаметром 6—7 мм, в которых собственно и проводится электрофорез. Нижние концы трубок погружены в электродный буферный раствор, соединенный с положительным электродом источника тока, а верхний конец заливают таким же раствором, подсоединенным к отрицательному электроду.

Перед началом работы в трубках формируются столбики четырехслойного геля, причем в нижнем слое концентрация акриламида самая высокая и условия полимеризации подобраны так, чтобы размер пор был наименьшим; чем выше расположен слой геля, тем больше размер его пор. Нижние три слоя называются разделяющими, в них рН 8,9, самый верхний слой геля концентрирующий, его рН 6,7. Для формирования столбика геля трубку устанавливают вертикально, нижний конец герметично прижимают к резиновой пластине и шприцем с длинной иглой последовательно заливают растворы, подлежащие полимеризации, которые готовят как указано справа.

После того как залит очередной раствор, который должен полимеризоваться в гель, на него сверху наносят несколько капель воды, под слоем которой гель и полимеризуется. Это обеспечивает горизонтальную поверхность. Два нижних слоя полимеризуют в темноте при комнатной температуре, два верхних — при освещении лампой дневного света на расстоянии 30—40 см.

Ход определения. К 0,3 мл исследуемой сыворотки добавляют 0,15 мл раствора Судана черного, 0,15 мл раствора сахарозы и 0,05 мл трис-буфера рН 6,7, после чего пере-

Расположение слоя геля	Нижний	2-й снизу	3-й снизу	Верхний
Высота слоя геля, мм	22	14	14	9
рН	8,9	8,9	8,9	6,7
Концентрация полиакриламида, %	10	5	3	3
Раствор А (реактив 11) *	1	1	1	—
Раствор В (реактив 12)	—	—	—	1
Раствор С (реактив 13)	2,8	1,36	—	—
Раствор D (реактив 14)	—	—	2	2
Раствор E (реактив 15)	—	—	1	1
Раствор F (реактив 16)	—	—	4	4
Раствор персульфата аммония (реактив 9)	4	4	—	—
Воды	0,2	1,64	—	—

* Раствор для полимеризации готовят, смешивая указанные количества объемов исходных растворов.

мешивают и оставляют на 1 ч в темноте. После этого 0,03—0,05 мл осторожно наносят на поверхность уже сформированного в трубке геля и дают впитаться в течение нескольких минут, заполняют трубку доверху электродным буфером и проводят электрофорез в течение 1 ч в затемненном помещении при силе тока 4—5 мА на трубку.

Оценка результатов. На самом верш трубки, на старте, расположена полоса хиломикрон и остатки не прореагировавшей с липидами краски. Медленнее всего в этой системе движется пре-в-ЛП, полоса которых расположена в 3 % геле. На границе 3 % и 5 % гелей оказывается две полосы (Will, а на границе 5 % и 10 % гелей — две полосы а-ЛП, еще ниже расположен альбумин, на котором адсорбированы неэтерифицированные жирные кислоты, обычно отличающиеся по цвету от липопротеидов.

Предложено много разных способов количественно выражать результаты электрофоретического разделения липопротеидов в геле акриламида, используя для этого различные варианты денситометрии и элюции, но для практической лаборатории, которая занимается фенотипированием гиперлипидемий, достаточно визуальной оценки; константы увеличения количества хиломикрон, vi- или пре-в-фракции.

Л и т е р а т у р а. Маграчева Е. Я. Разделение липопротеидов сыворотки крови методом дискового электрофореза в полиакриламидном геле.— *Вопр. мед. химии*, 1973, т. 19, №. 6, с. 652—655.

5.7. Гормоны

Определение гормонов в методическом отношении наиболее сложный раздел клинической биохимии, которым занимаются лишь специальные лаборатории или отделения больших клинических лабораторий, так как для выполнения большинства гормональных методов необходимы определенные условия, в том числе использование радионуклидов. В справочнике, который рассчитан на рядовые КДЛ лечебных учреждений, приводятся лишь некоторые, относительно более простые, химические методы определения гормонов, их метаболитов и близких им биологически активных веществ. Для специализированных лабораторий можно рекомендовать вышедшее в 1980 г. справочное пособие А. Г. Резникова «Методы определения гормонов» (Киев, «Наукова думка»).

В клинической эндокринологии все большее распространение получает метод конкурентного связывания (так называемое радиоиммунное определение), область применения которого, однако, значительно шире, чем определение гормонов, поэтому он вынесен в специальный раздел.

5.7.1. Экстракция и очистка растворителей

Многие методы определения гормонов включают схожие способы экстракции и нуждаются в растворителях примерно одинаковой степени чистоты. Чтобы не повторяться при описании каждого метода; ниже приводятся общие сведения по этим вопросам.

Экстракция. Для экстракции используют не смешивающиеся с водой растворители, в которые переходят экстрагируемые вещества. В целом чем больше в экстрагируемом веществе полярных кетоновых, альдегидных и спиртовых групп, тем лучше оно переходит в не смешивающиеся с водой полярные растворители — высшие спирты, этилацетат и т. д., чем меньше полярных групп, тем больше подходят неполярные растворители (гексан, хлороформ, дихлорметан); эфир занимает промежуточное положение. Эффективность экстракции часто зависит также от pH водного раствора и его ионной силы (содержание солей). Эффективнее всего экстракция происходит, если первоначально образуется одна фаза, которая затем разделяется на две добавлением избытка одного из ингредиентов, на такие условия удается подобрать не всегда, значительно чаще просто встряхивают две несмешивающиеся жидкости. Надо иметь в виду, что объемы фаз после экстракции очень часто не соответствуют объемам взятых растворов или растворителей, так как вместе с экстрагируемым веществом в другую фазу часто переходит и часть

растворителя и наоборот; это очень затрудняет точный отбор аликвоты из какой-либо фазы. Если вещество плохо экстрагируется, часто используют повторную экстракцию тем же растворителем, а затем оба экстракта смешивают.

Очень важно проводить экстракцию так, чтобы не образовалась стойкая эмульсия, которая препятствует разделению фаз. Часто это зависит от не поддающихся учету примесей, поэтому надо встряхивать очень осторожно, в то же время достаточно энергично, чтобы наступило равновесие; в этих случаях определить нужную границу помогает только опыт. Образованию эмульсии в какой-то мере препятствует увеличение содержания соли в растворе, эмульсию можно попытаться разделить центрифугированием, но это не всегда помогает.

Некоторые авторы рекомендуют проводить экстракцию в делительных воронках, но в условиях клинической практики, когда жизнь вынуждает максимально экономить время и реактивы, они неудобны. Лучше экстрагировать в конических колбах или в пробирках с пришлифованными стеклянными или полиэтиленовыми пробками. Если работают с колбами, надо использовать мешалки, лучше всего магнитные, в этом случае один лаборант может одновременно обрабатывать несколько проб, в то же время удобно дозировать степень перемешивания. При работе с пробирками их встряхивают вручную или на встряхивающем (шюттель) аппарате, пробирки удобны тем, что если образуется эмульсия, ее можно постараться разрешить центрифугированием.

После экстракции один слой отделяют от другого, обычно значительно легче отсосать верхний слой и количественно перенести его в чистую посуду, чем нижний. Удобно отсасывать пастеровской пипеткой с грушей, перенося верхний слой небольшими порциями, при этом, если по ошибке будет захвачена небольшая порция нижнего слоя, ее легко вернуть на место. Работа с грушей требует определенной точности движений, которая вырабатывается со временем; начинающим можно рекомендовать укрепить пипетку в штативе строго вертикально и соединить верхний конец резиновой или лучше хлорвиниловой трубкой со шприцем, который укреплен на том же штативе. Надо не забывать смазывать поршень шприца специальной смазкой или вазелином.

Если верхний слой для дальнейшей работы не нужен, например при промывании хлороформного экстракта, его иногда отсасывают пастеровской пипеткой, подсоединенной к водоструйному насосу, при этом весь слой сразу же удаляется в канализацию. Это ускоряет работу, но имеет тот недостаток, что, если ошибочно засосана порция нижней фазы, ее спасти уже невозможно.

Очистка этанола. Абсолютный этанол готовят из 90—96 % этилового спирта кипячением с СаО или ВаО на водяной бане с электроподогревом с обратным холодильником до тех пор, пока точка кипения не станет 78,3 °С при нормальном барометрическом давлении. Для обнаружения альдегидов к 5 мл этанола добавляют

0,2 мл раствора калия перманганата, содержащего 200 мг в 1 л (1:5000); раствор не должен обесцвечиваться на протяжении 20 мин, изменение окраски указывает на присутствие альдегидов. Пищевой спирт обычно содержит больше альдегидов, чем гидролизный.

Для удаления альдегидов можно использовать два способа: с 2,4-динитрофенилгидразином и с серебра нитратом. В первом случае к 1 л этилового спирта добавляют 2 г гидрохлорида 2,4-динитрофенилгидразина и 0,5 мл концентрированной HCl, закрывают пробкой и оставляют стоять 2 сут в темноте, затем перегоняют. При очистке с помощью серебра нитрата в 100 мл горячего этанола растворяют 7 г AgNO₃ и добавляют туда 15 г едкого кали, раствор выливают в 4 л подлежащего очистке этилового спирта. Выпадает темный осадок, который постепенно оседает на дно. Через сутки его отделяют декантацией или фильтрованием, этанол перегоняют, отбрасывая первую и последнюю порции.

Очистка хлороформа и дихлорметана (метилхлорида). Для определения гормонов лучше всего использовать хлороформ марки «для наркоза», содержащий небольшое количество спирта, что делает его более стабильным. Для очистки хлороформа или дихлорметана других марок, а также для регенерации тех порций растворителя, которые уже один раз использовались для экстракции гормонов, их взбалтывают с концентрированной серной кислотой на протяжении 1 или 2 рабочих дней, при этом серная кислота темнеет тем скорее, чем более загрязнен растворитель. Встряхивание надо проводить в темноте; удобно пользоваться магнитной мешалкой, закрывая колбу светонепроницаемым колапком. После этого кислоту отсасывают, хлороформ или дихлорметан промывают водой, а затем на протяжении нескольких часов концентрированным раствором аммиака, 1 н. NaOH или насыщенным раствором натрия карбоната, затем опять промывают водой и осушают безводным натрием сульфатом или натрием карбонатом. После осушения растворитель перегоняют, используя стеклянный перегонный аппарат на шлифах, нагреватель обязательно должен быть электрический с водяной баней.

Конкретный режим очистки во многом зависит от качества исходного растворителя; некоторые партии этими методами вообще очистить не удается. Об эффективности очистки лучше всего судить, поставив холостой или калибровочный опыт.

Очистка эфира. Для удаления перекисей эфир взбалтывают с 10 % раствором железа сульфида (сернистого железа — FeS) в 1 н. серной кислоте, затем промывают водой. Для проверки наличия перекисей 200 мл эфира выпаривают, остаток растворяют в 2 мл абсолютного этанола. Из этого количества отбирают 0,2 мл, к которым добавляют 0,2 мл 2 % спиртового раствора метадинитробензола и 0,2 мл 5 н. раствора едкого кали в метаноле; окраска не должна превышать той, которая развивается при добавлении к тем же реактивам Г) мкг кристаллического кетостероида.

Очистка этилацетата. Несколько раз промывают яркоокрашенным водным раствором перманганата калия. Промывание повторяют до тех пор, пока раствор не перестанет приобретать фиолетовый оттенок, затем отмывают водой 3—5 раз, осушают безводным сульфатом натрия и перегоняют.

5.7.2. 17-Кетостероиды

Унифицированный метод по цветной реакции с метадинитробензолом. Принцип. Эфиры 17-кетостероидов (17-КС) с глюконовой и серной кислотами гидролизуют нагреванием в кислой среде в присутствии формальдегида, который уменьшает образование темноокрашенных продуктов. Кетостероиды экстрагируют эфиром и определяют по цветной реакции с метадинитробензолом. Побочные окрашенные продукты, мешающие фотометрированию, удаляют избирательной экстракцией.

Реактивы. 1. HCl концентрированная. 2. Уксусная кислота ледяная. 3. Формальдегид, водный раствор: 50 мл имеющегося в продаже 40 % раствора формалина смешивают с 250 мл воды. 4. Едкий натр, 100 г/л: 10 г NaOH растворяют в 50—60 мл воды, после охлаждения объем доводят водой до 100 мл. 5. Этиловый эфир, свободный от перекисей. 6. Хлороформ очищенный. 7. Этиловый спирт 50 %. Смешивают равные объемы этилового спирта и воды. 8. Этиловый спирт абсолютный. 9. Едкое кали, раствор 5 моль/л в метаноле: растворяют 28 г КОН в дважды перегнанном метиловом спирте, объем доводят до 100 мл и немедленно фильтруют (в противном случае раствор может потемнеть) и проверяют концентрацию титрованием 0,1 н. кислотой, используя в качестве индикатора метиловый оранжевый. Хранят в темной склянке в холодильнике. 10. Метадинитробензол, раствор 20 г/л в абсолютном этиловом спирте: 400 мг метадинитробензола растворяют в 20 мл абсолютного этанола. В случае необходимости метадинитробензол можно очистить перекристаллизацией, для этого в колбу вместимостью 3 л помещают 20 г препарата, которые растворяют в 750 мл этилового спирта, нагревая до 40 °С. Затем прибавляют 100 мл 2 н. NaOH, перемешивают, охлаждают и быстро добавляют 2,5 л холодной воды, при этом должны выпасть мелкие кристаллы, которые собирают, фильтруя раствор в воронке Бюхнера. 11. Калибровочный раствор. Навеску в несколько миллиграммов дегидроэпиандростерона или андростерона растворяют в таком количестве этилового спирта, чтобы концентрация составила 100 мкг/мл.

Ход определения. Суточную мочу собирают в чистую посуду; если выпадает осадок, его тщательно перемешивают и из всего количества отбирают 5—20 мл в зависимости от содержания кетостероидов. Объем доводят изотоническим раствором натрия хлорида до 20 мл, добавляют 3 мл HCl, 1 мл уксусной кислоты и 0,2 мл раствора формальдегида. Колбу закрывают стеклянной затычкой груше-

видной формы (можно использовать воронки или неплотноприлегающие стеклянные пробки) и ставят на 15 мин на кипящую водяную баню; этот этап надо проводить под тягой или в хорошо проветриваемом помещении.

После охлаждения содержимого колбы его дважды экстрагируют порциями по 10 мл эфира, экстракты сливают вместе, сначала промывают 10 мл 10 % раствора едкого натра, затем водой. Экстракцию и промывание можно проводить в делительных воронках, но лучше в колбочках, используя для перемешивания магнитную мешалку, или в пробирках с притертыми стеклянными пробками. Вместо промывания 10 % раствором NaOH можно добавлять гранулы едкого натра в эфирный экстракт, который затем сливают в чистую посуду. Промытый эфирный экстракт небольшими порциями переносят в пробирку, в которой выпаривают на водяной бане при температуре не выше 50 °С при встряхивании, под струей воздуха или лучше азота. Сухой экстракт можно оставить на несколько дней в ожидании окончания анализа.

В пробирку с сухим экстрактом добавляют 0,2 мл 5 н. раствора едкого кали в метаноле, 0,2 мл абсолютного этанола и 0,2 мл 2 % спиртового раствора метадинитробензола, перемешивают и оставляют в темноте при комнатной температуре на 1 ч. После этого добавляют 4 мл 50 % этанола и 2 мл хлороформа, энергично встряхивают и дают образоваться двум слоям. Верхний, водно-спиртовой, слой коричневого цвета, содержащий загрязнение, отсасывают, нижний слой фиолетового цвета фотометрируют в кюветках с длиной оптического пути 0,5 см против холостого опыта при длине волны 520 нм; кюветы закрывают крышками. Одновременно ставят холостой опыт, в который вместо пробирки с высушенными экстрактами берут чистую пробирку, в которую помещают по 0,2 мл этанола, 5 н. раствора едкого кали в метаноле и 2 % раствора метадинитробензола, дальнейшую обработку проводят так же, как и опытных проб.

Для калибровки к 20 мл изотонического раствора натрия хлорида добавляют 0,5 мл калибровочного раствора, т. е. 50 мкг кетостероида; в дальнейшем калибровочную пробу обрабатывают так же, как и опытную пробу **мочи**.

При налаживании методики или смене реактивов рекомендуется построить калибровочный график, для приготовления которого берут (1,5; 1; 1,5 и 2 мл калибровочного раствора.

Расчет проводят по правилу пропорций. Получается содержание кетостероидов в 20 мл мочи. Чтобы узнать выведение за сутки, полученную величину делят на 20 и умножают на величину суточного диуреза.

Упрощенный метод по реакции с метадинитробензолом. Принцип. Принцип и ход определения такой же, как и в унифицированном методе, но некоторые детали упрощены, что практически не сказывается на точности метода. Чтобы уменьшить ошибки, вызванные посторонними веществами, экстинкцию измеряют трехволновым методом.

Реактивы. 1. HCl примерно 30%. К 80 мл концентрированной HCl добавляют 20 мл воды. 2. Дихлорметан (метилхлорид). 3. Этиловый эфир, лучше использовать марки «для наркоза». 4. Этиловый спирт 30 %. К 35 мл 96 % этилового спирта добавляют воды до объема 100 мл. 5. Едкое кали, спиртовой раствор 200 г/л. Растворяют 2 г КОН в 10 мл этилового спирта, нерастворившиеся примеси отделяют центрифугированием. Раствор нестойк. 6. Метадинитробензол, спиртовой раствор 5 г/л. Растворяют 250 мг метадинитробензола в 50 мл этилового спирта. 7. Едкое кали или едкий натр гранулированный. 8. Калибровочный раствор. Навеску в несколько миллиграммов дегидроэпиандростерона или андростерона растворяют в таком количестве этилового спирта, чтобы концентрация составила 500 мкг/мл.

Ход определения. Из тщательно перемешанной суточной мочи отбирают 10 мл в большую пробирку или колбочку, желательнее с притертой пробкой, добавляют 10 мл 30 % HCl и кипятят на водяной бане 10 мин. Этот этап надо проводить под тягой. После охлаждения добавляют 10 мл дихлорметана или эфира и тщательно встряхивают; когда слои разделяются, водный слой удаляют. Если для экстракции используют дихлорметан, который тяжелее воды, то водный слой оказывается сверху, поэтому его легче удалить, чем при экстракции эфиром, который оказывается в верхнем слое. После удаления водной фазы к органической добавляют 10–20 гранул КОН или NaOH для осушения. Они должны быть добавлены в таком количестве, чтобы образовался конгломерат, впитавший всю оставшуюся водную фазу, а дихлорметановый слой был подвижным, прозрачным и однородным. Отбирают 5 мл экстракта, которые переносят в чистую сухую пробирку, где выпаривают в токе воздуха или азота при температуре не выше 50 °С.

К сухому остатку добавляют 0,4 мл раствора метадинитробензола и 0,2 мл раствора едкого кали и выдерживают 40 мин в темноте при 35 °С для развития реакции. После этого добавляют 2 мл этилового спирта и 5 мл эфира, встряхивают и дают разделиться слоям. Верхний (эфирный) слой переносят в кювету длиной оптического пути 1 см, закрывают крышкой и фотометрируют при трех длинах волн — 440; 520 и 600 нм против кюветы, заполненной водой. Следует иметь в виду, что в результате испарения эфира температура проб понижается, они мутнеют, что мешает фотометрии, поэтому кюветы с пробами обязательно надо закрывать крышками.

Для построения калибровочного графика в сухие чистые пробирки вносят 0,05–0,15 мл калибровочного раствора, т. е. 25–75 мкг кетостероида, и выпаривают досуха в токе воздуха или лучше азота. В темном месте такие подготовленные пробы могут храниться несколько месяцев. В каждую пробирку вносят 0,4 мл раствора динитробензола и 0,2 мл спиртового раствора едкого кали, дальнейшая обработка такая же, как и для опытных проб.

Для проведения расчета сначала вычисляют исправленную величину экстинкции ($E_{исп}$) по формуле:

$$E_{исп} = E_{520} - 0,5 \cdot (E_{440} + E_{600}).$$

Строят калибровочный график, откладывая на одной оси $E_{исп}$ а на другой — содержание кетостероида в калибровочной пробе. В связи с тем что в конечном итоге в исследуемой пробе оказываются все кетостероиды, содержащиеся в 5 мл мочи, чтобы узнать концентрацию, выраженную в мг/л, полученную величину делят на 5; чтобы узнать выведение за сутки, концентрацию умножают на суточный диурез.

Нормальные величины. Экскреция 17-КС у мужчин 23—80 мкмоль/сут (8—29 мг/сут), у женщин 22—60 мкмоль/сут (8—22 мг/сут).

Клиническое значение. Повышение 17-КС свидетельствует о гиперсекреции глюкокортикоидов (синдром Кушинга), чаще всего вследствие опухоли надпочечника, гипофиза или АКТГ продуцирующей опухоли легких, уменьшение — признак пониженной выработки глюкокортикоидов и мужских половых гормонов.

5.7.3. 17-Оксикортикостероиды

Определение в моче по реакции с фенилгидразиновым реактивом после ферментативного гидролиза. **Принцип.** 17-Оксикортикостероиды (17-ОКС), т.е. глюкокортикоидные гормоны и их метаболиты, содержащие гидроксильные группы в положениях 17 и 10 и кетогруппу в положении 20, при нагревании с фенилгидразином в смеси серной кислоты и спирта дают окрашенные в желтый цвет соединения. Одновременно с основным опытом ставят холостой, в котором учитывают неспецифическую окраску, которая в этих условиях развивается без фенилгидразина. В связи с тем что большая часть 17-ОКС мочи присутствует в виде парных соединений с глюкуроновой и серной кислотами, предварительно проводят гидролиз с помощью фермента глюкуронидазы, затем 17-ОКС экстрагируют хлороформом или дихлорметаном и переводят в смесь серной кислоты и спирта.

Реактивы. 1. Хлороформ или дихлорметан, лучше всего марки «для наркоза»¹. 2. Этиловый спирт². 3. 2 н. раствор едкого натра. 4. 2 н. раствор HCl. 5. Универсальная индикаторная бумага; вместо нее можно пользоваться pH-метром. 6. 0,1 н. раствор едкого натра. 7. Натрия сульфат или натрия карбонат безводный. 8. Серно-спиртовой реактив. Для его приготовления используют наиболее чистую серную кислоту марки «выдерживает пробу Савала», стараясь как можно дольше рабо-

тать с одной и той же партией. 310 мл концентрированной серной кислоты осторожно выливают в 190 мл воды, охлаждая колбу водой со льдом, чтобы избежать нагревания, которое может сказаться на качестве реактива, 100 мл разведенной таким образом кислоты осторожно смешивают с 50 мл этилового спирта. 9. Фенилгидразиновый реактив: 21,7 мг гидрохлорида фенилгидразина растворяют в 50 мл серно-спиртового реактива. В случае необходимости гидрохлорид фенилгидразина можно приготовить из фенилгидразина основанием, нейтрализуя его HCl из расчета 10 мл 10 н. HCl на 9,4 г фенилгидразина основания. Препарат очищают перекристаллизацией из этилового спирта, для этого 5—10 г вещества растворяют в 30—40 мл этанола, затем охлаждают в холодильнике, кристаллы отделяют на фильтре и высушивают. 10. Ацетатный буфер pH 4,5. Растворяют в воде 5,79 г ацетата натрия, добавляют туда 3,25 мл ледяной уксусной кислоты, доводят pH до требуемой величины уксусной кислотой или NaOH и доливают водой до 1 л. 11. в-Глюкуронидаза, активность 100 000 ЕД в 1 г препарата. Растворяют в воде в таком количестве, чтобы активность была 500 ЕД в 1 мл, раствор хранят 1—2 дня. Препарат плохо растворим в воде, поэтому при приготовлении раствора его надо перемешивать не менее 30 мин, лучше на магнитной мешалке, после чего осадок удаляют центрифугированием или фильтрацией. Можно готовить раствор и на ацетатном буфере, но в этом случае надо убедиться, что препарат действительно растворяется (см. примечание 3). 12. Калибровочный раствор, содержащий 20 мкг гормона в 1 мл. Для его приготовления 1 мг гидрокортизона или кортизона растворяют в 50 мл этилового спирта.

Ход определения. Из хорошо перемешанного объема суточной мочи отбирают небольшое количество и доводят pH до 6,5, добавляя по каплям 2 н. NaOH или HCl, кислотность контролируют pH-метром или универсальной индикаторной бумагой. Отбирают 2 пробы (опытную и холостую) по 5 мл и нагревают их на кипящей водяной бане 3—5 мин для разрушения ингибитора фермента. Если по какой-либо причине моча сразу не может быть проанализирована, желательно хранить ее после кипячения, которое одновременно убивает и микробную флору. После охлаждения и к опытной, и к холостой пробе добавляют по 5 мл ацетатного буфера, по 5 мл раствора фермента и ставят в термостат на 18—20 ч при 37 °С.

После ферментации каждую пробу экстрагируют 75 мл хлороформа (пятикратный объем), после расслаивания удаляют верхний слой (мочу), хлороформенный экстракт промывают 7,5 мл 0,1 н. NaOH и затем еще 3 мл воды, после чего осушают безводным натрия сульфатом или натрия карбонатом. Из опытной пробы отмеривают точно 50 мл хлороформенного экстракта и экстрагируют его 4 мл фенилгидразинового реактива, из холостой пробы также

¹ Очистку см. с. 251.

² Очистку см. с. 250.

Очистку см. с. 250.

точно отмеривают 50 мл хлороформенного экстракта и экстрагируют их 4 мл серно-спиртового реактива. Каждая из этих экстракций должна занимать около 2 мин. После этого осторожно удаляют нижние, хлороформенные, слои, а верхние, т. е. соответственно фенилгидразиновый и серно-спиртовой реактивы, переносят в отдельные пробирки и нагревают на водяной бане при 60 °С в течение 20 мин.

Одновременно ставят калибровочный опыт, для чего 1 мл калибровочного раствора, содержащий 20 мкг/мл, выпаривают досуха в пробирке, растворяют в 50 мл хлороформа и экстрагируют 4 мл фенилгидразинового реактива, холостой опыт при калибровке не ставят. Все три раствора — опытный с фенилгидразиновым реактивом, холостой с серно-спиртовым реактивом и калибровочный — фотометрируют в кюветках с длиной оптического пути 1 см при длине волны 410 нм против прогретого серно-спиртового реактива.

Расчет проводят по правилу пропорции, учитывая, что из 5 мл мочи, взятых для исследования, на стадии хлороформенного экстракта отбрасывается 1/3 часть, поэтому фактически в фенилгидразиновый реактив переходят 17-оксикортикостероиды из 3,33 мл мочи. Вводится также поправка на неспецифические хромогены, о которых судят по экстинкции холостой пробы. Окончательный расчет проводят по формуле:

$$\frac{E_{\text{оп}} - E_{\text{хол}}}{E_{\text{кал}}} \cdot \frac{C_{\text{кал}}}{3,33} = \text{содержание 17-ОКС мкг/мл.}$$

Умножая полученную величину на суточный диурез, получают выведение 17-ОКС с мочой за сутки.

Примечания. 1. Серно-спиртовой и фенилгидразиновый реактивы очень агрессивны как в отношении кювет и прибора, так и в отношении платья и рук лаборанта, поэтому работать с ними надо очень осторожно. 2. Результаты работы по этой методике во многом зависят от чистоты реактивов — растворителя, спирта, кислоты и даже солей, используемых для осушения, поэтому при налаживании методики или смене реактивов желательно провести контрольное определение, в котором вместо мочи взять воду. Оптические плотности серно-спиртового и фенилгидразинового реактивов в этом случае должны быть не более 0,1—0,2 при измерении против воды, в противном случае надо искать тот реактив, который вносит загрязнения. 3. Приведенный унифицированный метод требует значительного расхода реактивов, поэтому появилось много предложений о том, как можно проводить определение более экономно. С нашей точки зрения заслуживают внимания предложения, направленные на уменьшение расхода хлороформа. Это можно сделать, если растворять фермент непосредственно в буферном растворе и брать в опыт по 4 мл мо-

чи и 4 мл фермент-буферного раствора, а экстрагировать их 50 мл хлороформа или дихлорметана, в этом случае из суммарного экстракта отбирают по две порции по 20 мл — одну для экстракции фенилгидразиновым реактивом (опыт), другую для экстракции серно-спиртовым реактивом (холостой опыт). Экстракцию в этом случае проводят порциями по 2 мл серно-спиртового и фенилгидразинового реактива; этого количества оказывается достаточно, чтобы измерить светопоглощение на спектрофотометре типа СФ даже без специальных микрокювет, а просто приподнимая стандартные кюветы с помощью вкладышей. Это сокращает расход растворителя почти в 3 раза — с 150 до 50 мл. 4. В качестве экстрагента могут быть использованы и хлороформ, и дихлорметан, но последний труднее получить достаточно высокого качества. Экстрагирование дихлорметаном удобнее, так как он легче серно-спиртового и фенилгидразинового реактивов, в то время как хлороформ тяжелее их. По этой причине дихлорметановый слой оказывается сверху и его проще полностью удалить, оставив на дне пробирки тот слой, который в дальнейшем используют для анализа. 5. Если нет достаточно чистых реактивов, иногда можно вводить поправку на их небольшие загрязнения, используя измерение экстинкции при трех длинах волн — 370; 410 и 450 нм, как это делается при анализе крови. 6. Иногда после ферментативного гидролиза моча резко темнеет; это признак того, что обследуемый получил с пищей или принял в виде фармацевтических препаратов какие-то вещества, которые образовали парные соединения с глюкуроновой кислотой. Как правило, это не влияет на дальнейший ход анализа.

Нормальные величины. Суточное выведение 17-ОКС составляет 4—20 мкмоль/сут (1,4—7,2 мг/сут).

Определение 17-ОКС в плазме крови по реакции с фенилгидразином. Принцип метода аналогичен определению 17-ОКС в моче с той разницей, что определяются лишь не связанные с глюкуроновой кислотой соединения, поэтому ферментативный гидролиз не проводится. Для экономии плазмы крови холостой опыт не ставят, а поправку на неспецифическое поглощение проводят путем вычитания соседних участков спектра.

Реактивы. 1. Хлороформ'. 2. Фенилгидразина гидрохлорид. 3. Фенилгидразиновый реактив'. Сначала готовят смесь серной кислоты, спирта и воды, для чего осторожно, избегая нагревания, смешивают 62 мл концентрированной серной кислоты, 38 мл воды и 50 мл этилового спирта. В день определения растворяют 4,3 мг гидрохлорида фенилгидразина³

¹ Очистку см. с. 251.

² Требования к чистоте спирта и серной кислоты см. с. 253.

³ Очистку см. с. 253.

5.7.4. 11-Оксикортикостероиды

в 10 мл этой смеси. 4. 0,2 н. раствор натрия карбоната. 5. Калибровочный раствор гидрокортизона, содержащий 0,5 мкг в 1 мл. Готовят, растворяя 1 мг препарата в 5 мл метилового или этилового спирта, и доводят объем воды до 2 л.

Ход определения. Для анализа желателен использовать гепаринизированную плазму, полученную на холоду, но можно проводить определение и в сыворотке, полученной обычным методом. Экстрагируют 5 мл плазмы 25 мл хлороформа, плазму удаляют, экстракт промывают два раза порциями по 2,5 мл 0,2 н. натрия карбоната, затем таким же количеством воды. Отмытый экстракт упаривают при температуре не выше 40 °С до объема 1—1,5 мл, который переносят в центрифужную пробирку. Стенки посуды, где проводилось выпаривание, смывают еще 1—1,5 мл хлороформа, который переносят в ту же центрифужную пробирку. К суммарному экстракту добавляют 0,2 мл фенилгидразинового реактива, экстрагируют взбалтыванием и дают отстояться не менее 20—30 мин. После этого хлороформенный слой (нижний) осторожно отсасывают, опасаясь захватить фенилгидразиновый экстракт. Пробирку с кислотным экстрактом прогревают 30 мин при 60 °С, при этом остатки хлороформа выпариваются. Прогретый реактив, приобретший желтоватую окраску, пастеровской пипеткой переносят в микрокювету и измеряют светопоглощение при длинах волн 370; 410 и 450 нм против фенилгидразинового реактива, который прогревают так же, как и опытную пробу.

Для калибровки аналогичным образом экстрагируют 25 мл хлороформа 1 мл калибровочного раствора (0,5 мкг гидрокортизона), экстракт упаривают и рэкстрагируют фенилгидразиновым реактивом так же, как и опытную пробу.

Для проведения расчета сначала вычисляют исправленную величину экстинкции ($E_{\text{исп}}$) по формуле:

$$E_{\text{исп}} = E_{410} - 0,5 \cdot (E_{370} + E_{450})$$

как для опытной, так и для калибровочной проб. Содержание 17-ОКС в 5 мл плазмы крови рассчитывают по правилу пропорций, сопоставляя $E_{\text{исп}}$ опытной и калибровочной проб. В 1 л содержится в 200 раз больше 17-ОКС.

Нормальные величины: 140—550 нмоль/л (5—20 мкг в 100 мл).

Клиническое значение. Нестойкое увеличение 17-ОКС бывает при нервно-эмоциональных напряжениях, тяжелой физической работе у нетренированных людей, травмах, хирургических операциях и т. д. Стойкое увеличение свидетельствует о развитии гиперкортицизма (синдром Кушинга) чаще всего в результате опухоли надпочечника, гипофиза и эктопической АКГГ продуцирующей опухоли. Снижение свидетельствует о гипокортицизме вследствие поражения надпочечников (болезнь Аддисона) или длительной стероидной терапии.

Унифицированный метод по флюоресценции в серно-спиртовом реактиве. Принцип. Кортикостероиды, имеющие гидроксилы в положениях 11 и 21 и кетогруппу в положении 3, после обработки смесью серной кислоты и спирта флюоресцируют зеленым светом. Их определению мешают холестерин и другие липиды, которые в этих условиях также образуют флюоресцирующие соединения, поэтому их удаляют предварительной экстракцией гексаном, в который кортикостероиды не переходят.

Реактивы. 1. Гексан. 2. Дихлорметан. 3. 0,2 н. раствор натрия карбоната. 4. Серно-спиртовой реактив: смешивают 3 объема концентрированной серной кислоты и 1 объем этилового спирта, смесь охлаждают до комнатной температуры, реактив годен только в день приготовления. Требования к качеству серной кислоты и спирта те же. 5. Калибровочные растворы. Желательно, чтобы калибровочные растворы содержали гидрокортизон и кортикостерон в тех же соотношениях, в которых они присутствуют в крови человека, т.е. 4:1, но можно обойтись и одним гидрокортизоном. Основной калибровочный раствор содержит 200 мкг гидрокортизона и 50 мкг кортикостерона в 1 мл; его готовят, растворяя кортикостерон в 1 мл спирта и добавляя воду до нужного объема. Ампулированные фармацевтические препараты обычно содержат гемисулцинат и для калибровки не годятся.

Ход определения. Исследуемую плазму или сыворотку в количестве 1 мл экстрагируют 3 мл гексана, верхний (гексановый) слой удаляют, остаток гексана упаривают под вакуумом на водяной бане при 40 °С. Плазму экстрагируют 10 мл дихлорметана, дают хорошо отстояться (по крайней мере 20 мин), дожидаясь полного осветления раствора, промывают его 0,5 мл 0,2 н. раствора натрия карбоната, затем 0,5 мл воды и 8 мл переносят в чистую пробирку, куда добавляют 2,5 мл серно-спиртового реактива, встряхивают и через несколько минут удаляют дихлорметановый слой (верхний). Через час измеряют флюоресценцию серно-спиртового экстракта в диапазоне 540—550 нм при возбуждении светом с длиной волны 475 нм.

Одновременно с опытными пробами обрабатывают и калибровочные с той разницей, что экстракцию гексаном пропускают, а 1 мл калибровочного раствора непосредственно экстрагируют 10 мл дихлорметана; дальнейшая обработка такая же, как и в опытных пробах.

Расчет проводят по формуле:

$$\frac{\Phi_{\text{оп}}}{\Phi_{\text{к}}} = C_{\text{исп}}$$

где $\Phi_{\text{оп}}$ и $\Phi_{\text{к}}$ — соответственно величины флюоресценции опытной и калибровочной проб,

См. с. 253.

а C_x — содержание 11-ОКС в калибровочном растворе. Результаты выражают в мкг/л.

Нормальные величины: 140—230 моль/л (5—8 мкг в 100 мл).

Клиническое значение такое же, как и определения 17-ОКС.

5.7.5. Адреналин, норадреналин

Метод раздельного определения. Принцип. Адреналин и норадреналин выделяются из мочи адсорбцией на окиси алюминия, как и в других методах. Адреналин окисляется во флюорофор феррицианидом при pH 4,2, норадреналин при pH 6,2. Чтобы при pH 6,2 не происходило образование флюорофоров из адреналина, в реакционную смесь добавляют тиогликолевую кислоту и формалин; гидросульфит натрия, удаляя растворенный кислород, способствует стабилизации флюорофоров, образовавшихся из норадреналина.

Реактивы. 1. HCl, 6 моль/л. Готовят разведением промышленно изготовляемой концентрированной 10 н. HCl до концентрации 6 н. 2. Этилендиаминтетрауксусная кислота или ее соли (версен, трилон, хелатон, ЭДТА). 3. Гидрат окиси аммония (NH_4OH), растворы 0,5 н. и 1 н. 4. Окись алюминия очищенная и активированная по Брокману II. 5. Уксусная кислота, 0,25 н. раствор. 6. Фосфатные буферные растворы pH 4,2 и 7,4, концентрация 1/15. 7. Калия феррицианид (железистосинеродистый калий, красная кровяная соль, K_3Fe/CN_6), растворы концентрации 5 и 2,5 г/л. Готовят из препарата, очищенного перекристаллизацией. 8. Аскорбиновая кислота, 3 г/л. В день опыта растворяют 30 мг перекристаллизованного препарата в 10 мл 5 н. NaOH. 9. Тиогликолевая кислота, раствор 0,58 моль/л: 5,34 г (что составляет 4 мл) доводят водой до объема 100 мл. 10. Формальдегид, раствор 0,05 моль/л на 2,5 н. NaOH. На 100 мл 2,5 н. раствора едкого натра берут 0,375 мл имеющегося в продаже 40% раствора формалина. 11. Гидросульфит натрия (натрий гидросернистокислый, $Na_2S_2O_4$), сухой препарат в виде порошка. 12. Калибровочные растворы адреналина и норадреналина, содержащие по 100 нг основания в 1 мл. Могут быть использованы как кристаллические, так и ампулированные фармацевтические препараты; если используются соли, то надо пересчитать на чистое основание.

Ход определения. Моча, подкисленная 6 н. HCl до pH 3,0, может храниться в замороженном состоянии без потерь в течение месяца. Для анализа берут подкисленную мочу, стоявшую по крайней мере одну ночь в холодильнике, за это время максимальное количество солей успевает выпасть в осадок. К 15 мл отфильтрованной мочи добавляют 200 мг ЭДТА и 1 н. раствором NaOH доводят pH до 8,2 при тщательном перемешивании и под контролем pH-метра. Колонки для хроматографии диаметром около 7 мм заполняют окисью алюминия, для чего 1,2 г Al_2O_3 взбалтывают в 3 мл воды и вносят в колонку, нижний конец которой рыхло закрыт ватой, прокипяченной в воде

и высушенной. Остатки окиси алюминия переносят в колонку еще 2—3 порциями воды. 15 мл мочи наносят на колонку и дают стечь под действием силы тяжести, затем промывают 10 мл воды, к которым добавлена 1 капля 0,5 н. NH_4OH ; создавая вакуум водоструйным насосом, катехоламины элюируют 6 мл 0,25 н. уксусной кислоты. Время между промывкой колонки подщелоченной водой и окончанием элюции не должно превышать 30 мин.

В кислотных элюатах pH бывает в пределах 3,5—3,9, их можно хранить 2—3 дня до анализа. Перед исследованием остатки взвеси окиси алюминия удаляют центрифугированием. Для определения адреналина к 1 мл холодного элюата добавляют 1 мл холодного фосфатного буферного раствора pH 4,2, 1 каплю 0,5 н. NH_4OH (pH должен быть в пределах 4,1—4,3) и 0,5 мл 0,25 % раствора феррицианида калия. На этом этапе исследуемая проба и все реактивы должны находиться в бане со льдом. Точно через 2 мин окисление останавливают, добавляют 0,2 мл 0,3 % раствора аскорбиновой кислоты в 5 н. NaOH, а еще через 3 мин 1 мл воды, охлажденной на льду, перемешивают и флюорометрируют, измеряя флюоресценцию в области 500—550 нм при возбуждении светом с длиной волны 400 нм.

Для определения норадреналина, которое также проводят при постоянном охлаждении всех реагентов в бане с ледяной водой, к 1 мл отцентрифугированного элюата добавляют 1 мл холодного фосфатного буфера pH 7,3 (при этом pH смеси устанавливают в пределах 6,2—6,5) и 0,4 мл 0,5 % раствора феррицианида калия. Перемешивают и точно через 2 мин добавляют 1,2 мл смеси, которая приготовлена за несколько минут до этого путем смешивания 3 мл охлажденной тиогликолевой кислоты и 8 мл охлажденного раствора едкого натра с формалином, еще через 3 мин добавляют на кончике стеклянной палочки 2—3 мг порошка гидросульфата натрия, перемешивают и измеряют флюоресценцию в тех же условиях, что при определении адреналина.

Для калибровки анализируют в таких же условиях пробы, содержащие 25—100 нг катехоламина, по этим данным строят калибровочный график. При повседневной работе калибровочные пробы не проводят через стадию элюции, а обрабатывают их так же, как и элюаты. Чтобы рассчитать концентрацию катехоламина в моче, его содержание в элюате (нг/мл или нмоль/мл) умножают на 0,4, так как 1 мл элюата соответствует 2,5 мл мочи.

Примечания. 1. Флюоресцирующие продукты, образующиеся при определении норадреналина, быстро окисляются кислородом воздуха, поэтому свечение падает. Гидросульфит натрия, поглощая кислород воздуха, делает флюорофоры более стойкими, слишком энергичное перемешивание способствует аэрации раствора и уничтожает защитное действие гидросульфита. 2. Если при pH 6,2 проводить окисление так же, как и при pH 4,2, т. е. после добавления фосфатного буфера к элюату доба-

вить 0,5 мл 0,25 % раствора феррицианида и точно через 2 мин 0,2 мл 0,3 % раствора аскорбиновой кислоты в 5 н. NaOH, то будет определена сумма адреналина и норадреналина. 3. В целом определение адреналина более надежно, чем норадреналина; основная ошибка анализа связана с гашением флюоресценции посторонними веществами, что проявляется в том, что добавки адреналина или норадреналина к моче определяются не полностью. Этот эффект во многом зависит от качества окиси алюминия, поэтому при налаживании методики >желательно проверить полноту открытия добавок исследуемых веществ к моче.

Нормальные величины. Выведение адреналина 30—80 нмоль/сут (5—15 мкг/сут), норадреналина 20—240 нмоль/сут (7—44 мкг/сут).

5.7.6. Ванилил-миндальная кислота

Метод тонкослойной хроматографии.

Принцип. Ванилил-миндальную кислоту (ВМК) экстрагируют из мочи этилацетатом, экстракт упаривают и подвергают тонкослойной хроматографии на силикагеле. Для обнаружения на хроматограммах и количественного определения используют цветную реакцию сдiazотированным п-нитроанилином.

Реактивы. 1. HCl концентрированная, примерно 10 н. 2. Этилацетат. 3. Натрия сульфат безводный, порошок. 4. Натрия хлорид, порошок. 5. Силикагель марки АСК или КСК, порошок, размер зерен 150—175 меш. 6. Гипс медицинский. 7. Дихлорметан (метилхлорид). 8. Метиловый спирт. 9. Гидрат окиси аммония (NH₄OH), 17 % водный раствор, плотность 0,933. 10. Раствор для хроматографирования. Смешивают 40 мл дихлорметана, 40 мл метилового спирта и 2 мл 17 % раствора аммиака. 11. Раствор п-нитроанилина, 1 г/л. 12. Натрия нитрит (NaN₂), раствор 2 г/л. 13. Калия карбонат (поташ, K₂CO₃), раствор 100 г/л. 14. Проявляющий диазореактив. Непосредственно перед употреблением на холоду смешивают 1 часть раствора п-нитроанилина, 1 часть раствора натрия нитрита и 10 частей раствора поташа. Смесь годна к употреблению лишь несколько минут. 15. Усиливающий окраску диазореактив. Непосредственно перед употреблением на холоду смешивают равные объемы раствора п-нитроанилина и натрия нитрита. Реактив годен к употреблению лишь несколько минут. 16. Натрия карбонат (сода, Na₂CO₃), раствор 20 г/л. 17. Метанольная щелочь. В день определения смешивают 1 объем раствора натрия карбоната и 2 объема метилового спирта. 18. Этиловый спирт. 19. Ацетатный буферный раствор pH 1,96 (концентрация 0,1 М). 20. Калибровочный раствор, содержащий ВМК в концентрации 100 мг/л в 0,1 н. HCl.

Ход определения. 2,5 г силикагеля тщательно смешивают с 0,4 г гипса, желатель-

но перемешивать механической мешалкой в течение часа. К этому количеству добавляется 9 мл воды до образования густой массы, которую после тщательного перемешивания с помощью специального аппарата наносят на обезжиренную стеклянную пластину размером 8X18 см слоем толщиной 0,25 мм. Пластины высушивают на воздухе в защищенном от пыли месте на протяжении 2 ч, а затем прогревают при 120 °С еще 2 ч. Хранят в плотно закрытом эксикаторе над хлоридом кальция (для предотвращения впитывания паров воды).

Свежесобранную суточную мочу подкисляют HCl до pH 1,0, ее можно хранить в холодильнике несколько дней. К 1 мл подкисленной мочи добавляют 300 мг порошка NaCl и дважды экстрагируют ВМК порциями по 3 мл этилацетата. Этилацетатные экстракты (верхний слой) отсасывают, объединяют, осушают безводным сульфатом натрия и выпаривают в токе воздуха при 35—40 °С.

Сухой этилацетатный остаток растворяют в 0,1 мл этилового спирта и наносят на хроматографическую пластинку небольшими порциями; следующую порцию наносят на то же место после того, как предыдущая уже высохла. Повторно омывают пробирку 0,1 мл этилового спирта и наносят на то же место хроматографической пластинки. Дважды проводят восходящее хроматографирование так, чтобы слой растворителя поднялся на 12 см, после этого пластину высушивают и проявляют. Тонкослойное хроматографирование проводят в специальных плотно закрывающихся банках или эксикаторах, воздух внутри которых предварительно насыщен парами растворителя.

Для проявления пластин их после высушивания опрыскивают проявляющим диазореактивом. При этом у самого финиша видно пятно гомованилиновой кислоты, пятно ВМК находится примерно на 4 см выше линии старта (R_f в среднем 0,16), оно окрашивается в ярко-фиолетовый цвет. Пятна соскабливают в пробирку, куда добавляют по 2 мл метанольной щелочи и 0,1 мл усиливающего диазореактива. Тщательно перемешивают и через 20 мин центрифугируют, надосадочную жидкость фотометрируют при трех длинах волн: 450; 520 и 590 нм против экстрактов из соскобов пластин в участках, где нет ВМК.

Одновременно с опытными пробами через всю процедуру анализа пропускают калибровочные пробы, содержащие 4; 6 и 8 мкг ВМК. Для этого 0,04—0,08 мл калибровочного раствора, содержащего ВМК в концентрации 100 мкг/мл, выливают в порции по 1 мл ацетатного буфера pH 1,96, затем экстрагируют этилацетатом так же, как и опытные пробы и т. д.

Для расчета сначала вычисляют исправленную величину экстинкции с поправкой на неспецифическое поглощение по формуле:

$$E = E_{520} - 1/2 \cdot (E_{350} + E_{590})$$

как для опытных, так и для калибровочных проб. По этим данным строят калибровочный график, который служит для непосредствен-

Очистку см. с. 251.

Т а б л и ц а 41. Содержание гистамина, серотонина и 5-ОИУК

	Содержание	Литература
Гистамин в цельной крови	180—900 нмоль/л (2—10 мкг %)	Л. Я. Прошина. Лаб. дело, 1981, № 2, с. 90—93
Гистамин в плазме	300 ± 50 нмоль/л (3,3 ± ± 0,6 мкг %)	Ю. А. Плюшкис, В. А. Мурза. Лаб. дело, 1980, № 8, с. 472 — 475
Гистамин в гранулоцитах	310 ± 45 нмоль (35 ± 56 мкг) на 10 ⁶ клеток	Там же
Серотонин в цельной крови	230—460 нмоль/л (4—8 мкг %)	Л. Я. Прошина. Лаб. дело, 1981, № 2, с. 90—93
Серотонин в тромбоцитах	420 ± 190 нмоль (74 ± 33 мкг) на 10 ⁹ клеток	Ю. А. Плюшкис, А. А. Матулис, В. А. Мурза. Лаб. дело, 1976, № 2, с. 84—87
5-Оксииндолилуксусная кислота мочи свободная	17—50 мкмоль (3—9 мг) в сутки	Ц. И. Герасимова. Лаб. дело, 1975, № 1, с. 3—4
То же суммарная	40—130 мкмоль (7—22 мг) в сутки	

ного расчета содержания ВМК. в моче в микрограммах в 1 мл.

Нормальные величины: 2,5—38 мкмоль/сут (0,5—7 мг/сут).

Клиническое значение. Небольшое проходящее повышение свидетельствует о повышении функциональной активности симпатико-адреналовой системы, стойкое повышение бывает при феохромоцитоме.

5.7.7. Гистамин, серотонин

Биогенные амины — гистамин и серотонин (окситриптами, 5-ОТ) — содержатся главным образом в клетках крови (табл. 41), гистамин в базофильных лейкоцитах, а серотонин в тромбоцитах, поэтому результаты их определения в цельной крови в большей степени зависят от количества соответствующих клеток. Имеются данные, что и то, и другое вещество, будучи добавлено к плазме, связывается с белками — гистамино- и серотонинопексия.

Гистамин освобождается при анафилактических и аллергических реакциях, но в целом клиническое значение результатов его определения невелико. Серотонин образуется в клетках желудочно-кишечного тракта и продуцируется особым видом опухолей — карциноидом. Основной метаболит серотонина — 5-оксииндолилуксусная кислота — выводится с мочой в виде парных соединений с серной и глюкуроновой кислотами. Особенно информативно повышение содержания серотонина в плазме и оксииндолилуксусной кислоты в моче при карциноидах кишечника или легких, некоторое увеличение может быть и при заболеваниях желудочно-кишечного тракта.

Как гистамин, так и серотонин обычно определяют после разрушения клеток и осаждения белков, но и при этом теряется до 40 % исходного содержания биогенного амина; лучшие результаты получаются при разрушении клеток замораживанием — оттаиванием. Оба вещества

способны реагировать с о-фталевым альдегидом с образованием флюорофоров, но для серотонина эта реакция идет в кислой среде, а для гистамина — в щелочной. Кроме того, серотонин сам обладает флюоресценцией и может, реагируя с нингидрином, также давать флюоресцирующие соединения.

Метод совместного определения гистамина и серотонина. П р и н ц и п. Гистамин содержится главным образом в лейкоцитах, серотонин — в тромбоцитах, поэтому оба вещества определяют в цельной крови после осаждения белков хлорной кислотой. Для очистки и выделения используют способность этих соединений при щелочных рН переходить в органическую фазу, а при кислых в водную. Анализ завершается изменением флюоресценции продуктов конденсации гистамина с ортофталевым альдегидом, а серотонина с нингидрином.

Реактивы. 1. Калия оксалат, раствор 13,4 г/л. 2. Хлорная кислота (НСЮ₄), 1 н. раствор. 3. Натр едкий, растворы 1 н. и 5 н. 4. Натр едкий, 0,1 н. раствор, насыщенный поваренной солью. К 0,1 н. NaOH добавляют кристаллы поваренной соли в таком количестве, чтобы на дне все время был осадок. 5. Натрия хлорид, сухой порошок. 6. HCl, 0,1 н. раствор. 7. Фосфатный буферный раствор рН 8,0, концентрации 1/15 моль/л. 8. Хлороформ. 9. Бутиловый спирт нормальный (н-бутанол). 10. Бутанол-хлороформенная смесь. Смешивают 150 мл н-бутанола и 100 мл хлороформа. 11. Кислота фосфорная, 1,5 моль/л: 17,3 мл имеющейся в продаже 85 % фосфорной кислоты доводят водой до объема 100 мл. 12. Ортофталевый альдегид, раствор 1 г/л в абсолютном метаноле. 13. Нингидрин, раствор 100 ммоль/л. Растворяют 180 мг нингидрина в 10 мл воды. 14. Калибровочные растворы гистамина и нингидрина, содержащие по 100 мг/л в 0,01 н. HCl. Для приготовления

См. с. 259.

можно использовать серотонинкреатинсульфат, 2,312 мг которого эквивалентны 1 мг серотонина основания.

Ход определения. Кровь берут в пробирку, содержащую 1,34 % раствор оксалата натрия в количестве, составляющем 1/10 от предполагаемого количества крови. К 1 мл крови приливают 2 мл воды и 1 мл н. хлорной кислоты, перемешивают и через 30 мин центрифугируют. К 2 мл надосадочной жидкости добавляют 0,2 мл 5 н. NaOH, 1 г порошка хлорида натрия и 4 мл бутанол-хлороформенной смеси, встряхивают 3 мин, а затем центрифугируют для разделения слоев. Водную фазу удаляют, а к органической добавляют 2 мл 0,1 н. NaOH, насыщенного хлоридом натрия, встряхивают и центрифугируют, 3,5 мл органической фазы переносят в другие пробирки, где экстрагируют 2,5 мл 0,1 н. HCl. После разделения фаз из кислотной (верхней) фазы отбирают порции по 1 мл, которые используют для определения гистамина и серотонина.

Для определения гистамина к 1 мл кислотной фазы добавляют 0,2 мл 1 н. NaOH и 0,1 мл раствора ортофталевого альдегида в метаноле. Через 4 мин приливают 0,1 мл 1,5 М фосфорной кислоты, доводят объем до 5 мл и измеряют флюоресценцию при длине волны 470 нм при возбуждении светом с длиной волны 360—365 нм.

Для определения серотонина к 1 мл кислотной фазы добавляют 1 мл фосфатного буфера pH 8,0 (при этом в растворе должен установиться pH 7,0) и 0,2 мл 0,1 М раствора нингидрина. Смесь инкубируют 30 мин при 75 °C, затем еще 1 ч выдерживают при комнатной температуре, доводят объем до 5 мл и измеряют флюоресценцию в области 490 нм при возбуждении светом с длиной волны 365 нм.

Для калибровки берут пробы, содержащие по 0,05 и 0,1 мкг серотонина и гистамина соответственно, доводят водой до объема 1,5 мл и приливают 0,5 мл 1 н. хлорной кислоты. В холостой опыт берут 1,5 мл воды и 0,5 мл 1 н. хлорной кислоты. Калибровочные и холостую пробы экстрагируют бутанол-хлороформенной смесью после добавления 0,2 мл 5 н. NaOH и обрабатывают так же, как и опытные пробы. Свечение холостой пробы вычитают из результатов, полученных для опытных и калибровочных проб.

Расчет проводят по калибровочному графику, по данным которого рассчитывают содержание гистамина или серотонина в пробе. Чтобы узнать содержание в 1 мл цельной крови, полученные результаты умножают на 3/2, так как в опыт взято 2 мл хлорного экстракта крови из общего объема 3 мл.

Определение гистамина в цельной крови, унифицированный метод по реакции с ортофталевым альдегидом. Принцип. Гистамин соединится главным образом в лейкоцитах, поэтому определение выполняется в цельной крови, а не в сыворотке или плазме. Белки осаждают хлорной кислотой, добавлением едкого натра устанавливают щелочную реакцию, которая необходима для экстракции смесью бутанола и хлороформа. После промывания экстракта гистамин реэкстрагируют кислотой и опре-

деляют в кислой фазе флюорометрическим методом после конденсации с ортофталевым альдегидом.

Реактивы. 1. Натрия оксалат, раствор 13,5 г/л. Растворяют 1,35 г натрия оксалата в 100 мл воды. 2. Кислота хлорная, 1 моль/л, имеет концентрацию 1 н. или 10 %. 3. Натр едкий, растворы 1 н. и 5 н. Готовят, растворяя соответственно 4 или 20 г NaOH в воде, объем доводят до 100 мл. 4. Натрия хлорид в виде сухого порошка. 5. HCl 0,1 н. 6. Натр едкий, 0,1 н раствор, насыщенный поваренной солью. Добавляют кристаллический NaCl в 0,1 н. NaOH в таком количестве, чтобы на дне флакона все время был осадок нерастворившейся соли. 7. Бутиловый спирт нормальный (н-бутанол). 8. Хлороформ, лучше использовать марки «для наркоза». 9. Бутанол-хлороформенная смесь: смешивают 150 мл н-бутанола и 100 мл хлороформа. 10. Метиловый спирт (метанол), не содержащий воды. 11. Ортофталевый альдегид, раствор 1 г/л в абсолютном метаноле. Желательно использовать ампулированный препарат, в случае необходимости ортофталевый альдегид можно очистить перекристаллизацией из лигроина. Для приготовления реактива используют абсолютный (не содержащий воды) метиловый спирт. 12. Ортофосфорная кислота, раствор 1,5 моль/л. 17,3 мл изготовляемой промышленностью 85 % фосфорной кислоты (H₃PO₄) плотности 1,65 доводят водой до объема 100 мл. 13. Калибровочные растворы готовят на 0,4 н. хлорной кислоте, растворяя 1,63 мг кристаллического гистаминхлорида или 1 мг гистамина основания в 100 мл 0,4 н. HClO₄. И в том, и в другом случае получается раствор, содержащий 10 мг/л. Хранят в замороженном состоянии в полиэтиленовом (стеклянный может лопнуть!) флаконе. Из него готовят рабочий калибровочный раствор с концентрацией 1 мкг/мл в 0,4 н. хлорной кислоте.

Ход определения. Кровь берут в пробирку, содержащую раствор натрия оксалата в количестве 1/10 от предполагаемого количества крови. К 4 мл оксалатной крови добавляют равный объем 1 н. хлорной кислоты, перемешивают и через 10 мин центрифугируют. К 4 мл надосадочной жидкости добавляют 0,5 мл 5 н. NaOH, 1,5 г сухого порошка поваренной соли и хорошо перемешивают, затем приливают 10 мл смеси бутанол — хлороформ, встряхивают 5 мин, центрифугируют и водную фазу удаляют. К органической фазе добавляют 5 мл 0,1 н. NaOH, насыщенного хлоридом натрия, встряхивают, центрифугируют и водную фазу удаляют. Точно 8 мл органической фазы переносят в пробирку, содержащую 3 мл 0,1 н. HCl, и встряхивают 3 мин, при этом гистамин переходит в кислотную фазу, которую и используют для дальнейшего анализа.

К 2 мл кислотной фазы добавляют 0,4 мл 1 н. NaOH и 0,12 мл 0,1 % раствора ортофталевый альдегида в метаноле, а через 4 мин еще 0,2 мл 1,5 М ортофосфорной кислоты. После этого измеряют флюоресценцию при длине волны 460 нм при возбуждении светом с длиной волны 360 нм. Из показателя опытной пробы

вычитают результаты измерения холостого опыта, в который вместо крови берут соответствующее количество воды.

Расчет проводят по калибровочному графику, для построения которого пробы, содержащие 0,1; 0,5 и 1 мкг гистамина в 4 мл 0,4 н. хлорной кислоты, обрабатывают так же, как и кровь. При окончательном расчете учитывают, что в опыт взято 4 мл крови, поэтому в 1 мл содержание гистамина в 4 раза меньше.

5.7.8. 5-Оксииндолилуксусная кислота

Определение 5-оксииндолилуксусной кислоты в моче. Унифицированный метод по реакции с а-нитрозо-в-нафтолом. Принцип. Диазотированный а-нитрозо-в-нафтол реагирует с 5-оксииндолилуксусной кислотой (5-ОИУК) с образованием окрашенных в сиреневый цвет продуктов. Для повышения специфичности определения 5-ОИУК экстрагируют из подкисленной мочи этилацетатом, определение ведут в высушенном экстракте, повторную очистку экстракцией этилацетатом проводят уже после проведения цветной реакции. В случае необходимости может быть проведен еще третий этап очистки: удаление мешающих веществ хлороформом.

Реактивы. 1. HCl, 5 н. раствор. Для его получения концентрированную HCl осторожно смешивают с равным объемом воды. 2. Кислота серная 1 н. 3. Натрия хлорид, насыщенный раствор. 4. а-Нитрозо-р-нафтол, раствор 1 г/л в абсолютном этаноле. 5. Натрия нитрит, водный раствор 25 г/л. Растворяют 1 г NaNO₂ в 40 мл воды. 6. Нитрозокислотный реактив. Непосредственно перед употреблением смешивают 0,2 мл раствора натрия нитрита и 5 мл 1 н. серной кислоты. 7. Этилацетат (уксусноэтиловый эфир). 8. Абсолютный этиловый спирт. 9. Калибровочный раствор ОИУК, содержащий 100 мкг вещества в 1 мл воды.

Ход определения. Из общего количества суточной мочи отбирают небольшую порцию и подкисляют ее 5 н. HCl до pH 1,0. 1,5 мл подкисленной мочи смешивают с 1,5 мл насыщенного водного раствора хлорида натрия и дважды экстрагируют этилацетатом порциями по 4 мл. Оба экстракта смешивают и упаривают на водяной бане при температуре не выше 47 °С досуха. Сухой остаток растворяют в 0,15 мл абсолютного этанола и из этого количества 0,1 мл переносят в чистую сухую пробирку, куда добавляют также 2,9 мл воды, а затем 0,3 мл спиртового раствора а-нитрозо-в-нафтола, а затем 0,3 мл свежеприготовленного нитрозокислотного реактива. Перемешивают и нагревают на водяной бане при 47 °С в течение 7 мин. К неостывшему раствору добавляют 3 мл этилацетата и встряхивают. После разделения фаз нижний слой приобретает сиреневую окраску, его отсасывают и фотометрируют при длине волны 526 нм в кювете с длиной оптического пути 1 см против холостого опыта, в который берут вместо мочи 1,5 мл воды.

Одновременно ставят калибровочный опыт, в который берут пробы, содержащие 10—100 мкг

5-ОИУК; их подкисляют и обрабатывают так же, как и опытные пробы. По результатам измерений строят калибровочный график, который позволяет непосредственно определить количество микрограммов 5-ОИУК в 1 мл мочи.

Примечание. При заболеваниях, сопровождающихся нарушениями аминокислотного обмена, необходима дополнительная очистка, которая заключается в том, что после упаривания этилацетатного экстракта и растворения сухого остатка в этаноле отбирают 0,1 мл, к которым добавляют 3 мл воды и 2 мл хлороформа, встряхивают и переносят водную фазу в чистую пробирку, где проводят цветную реакцию, как описано выше.

Нормальные величины. Суточное выведение 5-ОИУК у взрослых 10—20 мкмоль/сут.

Литература. Лаб. дело, 1973, № 10, с. 637—638.

Определение свободной и связанной 5-оксииндолилуксусной кислоты в моче по реакции с а-нитрозо-р-нафтолом. Принцип. Парные соединения 5-ОИУК с серной и глюкуроновой кислотами гидролизуют нагреванием с хлорной кислотой в присутствии унитиола, который предохраняет определяемые вещества от полного разрушения. После нейтрализации свободную оксииндолилуксусную кислоту экстрагируют эфиром, экстракт выпаривают и проводят определение по цветной реакции диазотированной а-нитрозо-р-нафтолом аналогично тому, как это делается в унифицированном методе.

Реактивы. 1. Хлорная кислота концентрированная, содержащая не менее 42 % HClO₄, т. е. концентрация не менее 4,2 н. 2. Унитиол. 3. Кали едкое, 4 н. раствор: растворяют 22,4 г КОН в 70—80 мл воды, добавляя гранулы щелочи мелкими порциями, объем доводят водой до 100 мл. 4. Натрия хлорид, сухой порошок. 5. Серная кислота 2 н. 6. Натрия нитрит (NaNO₂), раствор 25 г/л. 7. Нитрозокислотный реактив: непосредственно перед употреблением смешивают 0,2 мл раствора нитрита натрия и 5 мл 2 н. серной кислоты. 8. а-Нитрозо-р-нафтол, раствор 1 г/л в абсолютном спирте. 9. Эфир (диэтиловый эфир), лучше использовать марки «для нарकोза». 10. Этилацетат (этилово-уксусный эфир). 11. Калибровочный раствор, содержащий 100 мкг 5-оксииндолилуксусной кислоты в 1 л воды.

Ход определения. *Определение суммарной (свободной и связанной) оксииндолилуксусной кислоты.* Из суточной мочи отбирают порцию 5 мл, к которой добавляют 0,1 г унитиола, 1 мл концентрированной хлорной кислоты и нагревают 15 мин на кипящей водяной бане. После охлаждения добавляют 4 н. КОН до тех пор, пока pH не станет равным 2,0; выпавший осадок отделяют фильтрованием. К фильтрату добавляют 1 г хлорида натрия (примерно) и экстрагируют 13 мл эфира в течение 30 мин на аппарате для встряхивания. После разделения фаз, для чего может потребоваться центрифугирование, отбирают 8 мл эфирного экстракта и переносят в чистую сухую пробирку, где выпаривают.

ривают досуха на водяной бане при 40 °С. Сухой остаток растворяют в 2 мл воды, приливают 1 мл раствора нитрозоафта и 1 мл нитрозохлоридного реактива, перемешивают и ставят на 10 мин на водяную баню при 37 °С. Для удаления избытка нитрозоафта приливают 10 мл этилацетата и встряхивают. После разделения слоев внизу оказываются хромогены синего цвета, этот слой переносят в кювету с толщиной оптического слоя 1 см и фотометрируют при длине волны 540 нм против холостой пробы. Холостую пробу готовят так же, как и опытную, но вместо эфирного экстракта мочи берут 8 мл эфира, который выпаривают и сухой остаток обрабатывают, как описано выше.

Определение свободной оксииндолилуксусной кислоты. К 5 мл мочи из суточного количества добавляют 2 н. серную кислоту в таком количестве, чтобы рН был 2,0, затем 1 г порошка хлорида натрия и экстрагируют 13 мл эфира, встряхивая пробу 30 мин на аппарате для встряхивания; 8 мл эфирного экстракта упаривают

досуха, так же как при определении общей 5-ОИУК. Дальнейшее определение проводят, как описано выше в предыдущем разделе.

Построение калибровочного графика и расчет. Для построения калибровочного графика 5 мл пробы, содержащей 10—100 мкг 5-ОИУК в виде водного раствора, обрабатывают так же, как опытные пробы, включая гидролиз хлорной кислотой, ее удаление в виде калиевой соли и экстракцию эфиром и т. д. Линейность графика сохраняется до 70 мкг в пробе. Чтобы узнать содержание 5-ОИУК в 1 мл мочи, полученную по калибровочному графику величину делят на 5 (так как в пробу берется 5 мл мочи), чтобы узнать суточное выведение, умножают на суточный диурез.

Для определения свободной 5-ОИУК строят отдельный калибровочный график, который может несколько отличаться, так как не будет потерь, связанных с кипячением с хлорной кислотой. В остальном расчет аналогичен.

5.8. НЕОРГАНИЧЕСКИЕ ВЕЩЕСТВА

В отличие от других разделов лабораторной диагностики, где почти монополюбно господствует фотометрия, при определении неорганических элементов и показателей КЩС широко используются и другие физико-химические методы. В связи с тем что анализы выполняются на приборах — пламенных фотометрах, потенциометрах и т. д., заводские инструкции к которым содержат подробные указания о том, как следует работать, в настоящем разделе описывается только химическая сторона методик, а принципы устройства аппаратуры и советы о том, как ее лучше использовать, вынесены в главу 1.6.

5.8.1. Натрий и калий

Несмотря на то что физиологические функции натрия и калия в организме различны, для их определения используют одинаковые физические принципы. Подавляющая часть калия в организме находится внутри клеток, и его концентрация в плазме, которая лишь очень приблизительно отражает общее содержание элемента в организме, может колебаться в значительных пределах, особенно у тяжелобольных. Она тесно связана с состоянием кровообращения и кислотно-щелочного равновесия, поэтому определение калия в плазме или сыворотке — один из важнейших показателей в реанимационной клинике.

Натрий почти исключительно внеклеточный элемент, его общее количество хорошо коррелирует с объемом межклеточной жидкости. У каждого индивидуального человека концентрация натрия в плазме поддерживается с большим постоянством, физиологические колебания, как правило, меньше, чем точность обычных лабораторных методов, но межиндивидуальные колебания гораздо выше. При получении сыворотки в

процессе формирования сгустка угольная кислота теряется, при этом изменяются соотношения эритроцитарного и плазматического объемов, что сказывается на концентрации натрия, колебания которой в сыворотке больше, чем в плазме. По этой причине для точного определения надо анализировать плазму, полученную с гепарином, так как солевые антикоагулянты, изменяя осмотическую концентрацию среды, вызывают сморщивание эритроцитов и разведение плазмы. Некоторые препараты гепарина содержат много натрия, тогда надо вводить на него поправку. Результаты определения натрия в плазме в целом имеют то же клиническое значение, что и результаты определения осмотической концентрации.

Клинико-диагностическое значение определения натрия и калия в эритроцитах невелико, это скорее область научных исследований, а не практической медицины.

Выведение натрия с мочой относительно равномерно на протяжении суток, в то же время экскреция калия имеет четкий пик в утренние часы, соответственно возрастает и отношение K/Na , которое коррелирует с активностью глюкокортикоидов. Минералокортикоид альдостерон вызывает задержку натрия в организме, увеличивая отношение K/Na мочи.

Унифицированный метод фотометрии пламени. Определение в сыворотке и плазме крови. Принцип. Разведенная водой плазма или сыворотка крови расплывается и в виде мельчайших капелек с током воздуха поступает в пламя газовой горелки, которому калий придает слабое красно-фиолетовое, а натрий ярко-желтое окрашивание. Интенсивность окраски измеряется фотоэлементом. В связи с тем, что концентрация калия в плазме невелика, при его определении калибровочный раствор должен содержать также соли натрия, а при некоторых конструк-

циях прибора и соли кальция. Натрия в плазме много и он ярко окрашивает пламя, поэтому калибровочный раствор может содержать только соли натрия.

Приготовление калибровочных растворов. Есть два способа приготовления калибровочных растворов. В первом случае сначала готовят серию основных калибровочных растворов, концентрации электролитов в которых перекрывают возможный диапазон колебаний состава плазмы, а затем эти растворы разводят так же, как и исследуемая плазма. Этот способ позволяет в максимальной степени избежать погрешностей, связанных с неточностями пипеток, используемых при разведении, но необходим двойной набор посуды — для основных и рабочих растворов. В другом случае сразу готовят рабочие калибровочные растворы, которые имитируют состав разведенной для сжигания плазмы; такой раствор может быть использован лишь в том случае, если плазма всегда разводится совершенно одинаково. Ниже даются прописи и того, и другого способа, считая, что первый более подходит для лабораторий, где электролиты определяются не очень часто, второй — для лабораторий, где проводится много определений и методику можно считать хорошо налаженной.

При приготовлении калибровочных растворов используют соли натрия, калия и кальция, высушенные в сушильном шкафу при 100—120 °С.

1. Натрия хлорид. Исходный калибровочный раствор, содержащий 1000 ммоль/л. Готовят, растворяя 11,69 г NaCl (поваренной соли) в воде и доводя объем до 200 мл.

2. Калия хлорид. Исходный калибровочный раствор с концентрацией 100 ммоль/л. Готовят, растворяя 0,746 г KCl в воде и доводя объем до 100 мл.

3. Кальция карбонат. Исходный калибровочный раствор, содержащий 100 ммоль/л. Готовят, растворяя 1,001 г CaCO₃ (кальция карбоната) в 1 н. HCl и доводя объем до 100 мл той же кислотой.

4. Основной калибровочный раствор для определения калия готовят из исходных калибровочных растворов.

При построении калибровочного графика из основного калибровочного раствора готовят

рабочие калибровочные растворы путем разведения водой во столько же раз, во сколько разводят и исследуемую плазму или сыворотку, желательно с использованием тех же пипеток, дозаторов и мерных колб.

5. Если чувствительность пламенного фотометра такова, что исследуемую плазму крови для определения надо разводить в 20 раз, рабочие калибровочные растворы для определения калия могут быть приготовлены также более простым способом. Для этого в мерную колбу вместимостью 1 л вносят 7 мл исходного калибровочного раствора NaCl с концентрацией 1000 ммоль/л и 2,5 мл исходного раствора CaCO₃ с концентрацией 100 ммоль/л и доводят объем до 1 л водой. Получают фоновый раствор с концентрацией натрия и кальция 7 и 0,25 ммоль/л. Готовят также калибровочный раствор калия с содержанием 5 ммоль/л, для чего исходный раствор с концентрацией 100 ммоль/л разводят водой в 20 раз в мерной колбе вместимостью 100 мл. Смешивают оба раствора, согласно приведенной ниже таблице.

Раствор KCl 5 ммоль/л	Фоновый раствор, содержащий 7 ммоль/л Na и 0,25 ммоль/л Ca, мл	Если исследуемый материал, разведенный 1:20, соответ- ствует содержанию в плазме, ммоль/л		
		K	Na	Ca
6,0	До 100	6,0	140,0	2,5
5,0	> 100	5,0	140,0	2,5
4,0	» 100	4,0	140,0	2,5
3,0	» 100	3,0	140,0	2,5

6. Основной калибровочный раствор для определения натрия готовят, помещая в мерную колбу вместимостью 100 мл 12—18 мл исходного раствора с концентрацией Na 1000 ммоль/л, затем доводят водой до метки. Получается серия основных калибровочных растворов, которые содержат натрий в концентрациях от 120 до 180 ммоль/л. Для построения калибровочного графика каждый из этих растворов разводят в 100 раз, желательно с помощью тех же пипеток или дозаторов и мерных колб, которые используются при разведении исследуемого материала.

7. Рабочий калибровочный раствор для определения натрия в плазме крови можно приготовить также по следующей прописи: 2 мл исходного калибровочного раствора с содержанием натрия 1000 ммоль/л вносят в мерную колбу вместимостью 200 мл и доводят до метки водой. Из этого раствора, содержащего 10 ммоль/л, берут по 12—18 мл и вносят в мерные колбы вместимостью 100 мл и доводят водой, до метки. Получается серия растворов, содержащих натрий в концентрациях от 1,2 до 1,8 ммоль/л, т. е. в таких, которые соответствуют содержанию натрия в плазме крови от 120 до 180 ммоль/л, при условии, что исследуемый материал разводился перед определением в 100 раз.

Исходный калибровочный раствор, мл			Вода, мл	Концентрация, ммоль/л		
KCl, 100 ммоль/л	NaCl, 1000 ммоль/л	CaCO ₃ , 100 ммоль/л		K	Na	Ca
6,0	14,0	2,5	До 100	6,0	140	2,5
5,5	14,0	2,5	> 100	5,5	140	2,5
5,0	14,0	2,5	> 100	5,0	140	2,5
4,5	14,0	2,5	» 100	4,5	140	2,5
4,0	14,0	2,5	» 100	4,0	140	2,5
3,5	14,0	2,5	» 100	3,5	140	2,5
3,0	14,0	2,5	» 100	3,0	140	2,5

Основной калибровочный раствор, содержащий 80 ммоль/л Na и 20 ммоль/л K, мл	Вода, мл	Содержание в 100 мл, ммоль		Соответствует содержанию в моче при условии, что она была разведена 1:100, ммоль/л	
		Na	K	Na	K
4,0	До 100	320	80	320	80
3,5	» 100	280	70	280	70
3,0	» 100	240	60	240	60
2,5	» 100	200	50	200	50
2,0	» 100	160	40	160	40

Ход определения. При определении калия в плазме крови очень важно, чтобы не было гемолиза, так как эритроциты значительно богаче этим элементом, чем плазма, и разрушение даже небольшого их количества приводит к завышенным результатам. Если есть хоть малейшее сомнение в том, что эритроциты удалены полностью, плазму или сыворотку надо повторно центрифугировать. В связи с тем, что калий, хотя и медленно, но выходит из эритроцитов через неповрежденную мембрану, предпочтительнее использовать для исследования плазму, которую получают центрифугированием в течение 15 мин при 3000 об/мин не позднее чем через 45–60 мин после взятия крови.

Обычно для определения калия исследуемую плазму разводят водой в 20 раз, а для определения натрия в 100 раз, но разведения могут быть и другими в зависимости от чувствительности прибора. Определение начинают с того, что сжигают серию калибровочных растворов, затем исследуемые пробы и снова калибровочные растворы, определение считают успешным, если калибровка, полученная вначале, совпадает с полученной в конце.

Результаты рассчитывают по калибровочному графику. После окончания анализа надо с особой тщательностью промыть и просушить распылитель, согласно заводской инструкции. Это очень ответственная и легко повреждаемая деталь прибора, коррозия которой или засорение делает невозможным выполнение анализа.

Содержание натрия в плазме крови определяют так же, как и содержание калия, с той разницей, что исследуемый материал разводят, как правило, в 100 раз и используют калибровочный раствор для определения натрия.

Нормальные величины. Содержание натрия в плазме 130–156 ммоль/л, содержание калия 3,4–5,3 ммоль/л.

Клиническое значение. Значительное увеличение или уменьшение содержания натрия в плазме или сыворотке наступает потому, что человек в процессе дегидратации непропорционально теряет воду и соли. Это состояние требует неотложных лечебных мероприятий. Увеличение выведения натрия с мочой — обычно благоприятный симптом, оно бывает при рассасывании отеков или выпотов, а также под влиянием мочегонных диуретиков.

Содержание калия в плазме или сыворотке возрастает при ацидозе, печеночной недостаточности, передозировке некоторых лекарств. Содержание его уменьшается чаще всего в результате неправильного применения диуретиков, а также при истощении калиевых запасов организма при некоторых поражениях почечных канальцев и при альдостеронизме.

Унифицированный метод определения в моче. Принцип. Определение натрия и калия в моче аналогично их определению в плазме крови с той разницей, что размах физиологических колебаний здесь больше, а различие между концентрациями Na и K не так велико, как в плазме, поэтому требования к точности меньше и можно работать с общим калибровочным раствором.

Приготовление калибровочного раствора. Используют те же исходные калибровочные растворы, что и при анализе плазмы. Для приготовления основного калибровочного раствора в мерную колбу вместимостью 100 мл вносят 8 мл исходного калибровочного раствора хлорида натрия, содержащего 1000 ммоль/л¹, и 20 мл раствора хлорида калия, содержащего 100 ммоль/л², и доводят водой до метки 100 мл. Получается раствор, содержащий 80 ммоль/л Na и 20 ммоль/л K. Из него готовят разведения согласно приведенной выше таблице.

Ход определения. Если в исследуемом материале имеется осадок, его тщательно перемешивают, 0,5 мл мочи вносят в мерную колбу вместимостью 50 мл и доводят до метки водой либо 1 мл вносят в колбу вместимостью 100 мл и доводят водой до метки. На пламенном фотометре сжигают сначала калибровочные растворы, затем исследуемые и снова повторяют калибровку.

Нормальные величины. Содержание натрия в моче может колебаться от ничтожных величин до 320–340 ммоль/л, калия — до 80–100 ммоль/л.

Клиническое значение. Выведение натрия возрастает при спадении отеков, уменьшается при их развитии. Высокое выведение ка-

¹ Реактив 1, с. 262.

² Реактив 2, с. 262.

лия бывает при неправильно подобранной гипотензивной терапии.

Унифицированный метод определения в эритроцитах. Принцип. Эритроциты отделяют центрифугированием, гемолизируют водой и определяют содержание электролитов методом фотометрии пламени. В связи с тем что между эритроцитами всегда остается некоторое количество плазмы, большое значение имеет единообразие режимов центрифугирования; приведенный ниже режим рекомендован в качестве унифицированного.

Приготовление калибровочных растворов. В качестве исходных используют те же растворы, что и при определении натрия и калия в плазме.

1. Рабочий калибровочный раствор для определения калия в эритроцитах. В мерную колбу вместимостью 100 мл вносят 3,84 мл исходного калибровочного раствора KCl, содержащего 100 ммоль/л¹, и доводят объем водой до 100 мл; получается основной калибровочный раствор с концентрацией 3,84 ммоль/л. Из него готовят разведения согласно приведенной ниже таблице.

Раствор KCl 3,84 ммоль/л, мл	Вода, мл	Концентрация калия, ммоль/л	Соответствует содержанию калия в эритроцитах при разведении 1:260, ммоль/л
7,5	До 100	0,288	75
8,0	» 100	0,308	80
8,5	» 100	0,327	85
9,0	» 100	0,346	90
9,5	» 100	0,365	95

2. Рабочий калибровочный раствор для определения натрия в эритроцитах. В мерную колбу вместимостью 1 л вносят 33 мл исходного калибровочного раствора KCl, содержащего 100 ммоль/л¹, и доводят до 1 л; получается фоновый раствор, содержащий 3,3 ммоль/л KCl. В колбу вместимостью 100 мл вносят 1 мл исходного калибровочного раствора NaCl, содержащего 1000 ммоль/л², и доводят до объема 100 мл фоновым раствором, содержащим 3,3 ммоль/л KCl; получается раствор, содержащий 10 ммоль/л NaCl и 3,3 ммоль/л KCl. Из полученных растворов готовят разведение, согласно следующей таблице.

Ход определения. Кровь для исследования берут с гепарином из расчета 5 мг (650 ЕД) на 1 мл, центрифугируют 15 мин при 3000 об/мин, отсасывают плазму с верхним слоем эритроцитов и снова центрифугируют 30 мин при 3000 об/мин и удаляют верхний слой.

¹ Реактив 2, с. 262.

² Реактив 1, с. 262.

Раствор, содержащий 10 ммоль/л NaCl и 3,3 ммоль/л KCl, мл	Фоновый раствор KCl 3,3 ммоль/л	Концентрация, ммоль/л		Соответствует содержанию натрия в эритроцитах при разведении 1:26, ммоль/л
		K	Na	
5	До 100	3,3	0,5	13,0
6	» 100	3,3	0,6	15,6
7	» 100	3,3	0,7	18,2
8	» 100	3,3	0,8	20,8

Из упакованного слоя эритроцитов берут пробу, которую разводят для определения калия в 260 раз, а для определения натрия — в 26 раз водой. Пробы сжигают одновременно с калибровочными растворами. Расчет проводят по калибровочному графику.

Нормальные величины: натрий 13—22 ммоль/л, калий 77—96 ммоль/л.

Клиническое значение. Высокое содержание натрия в эритроцитах бывает у лиц с наследственной предрасположенностью к гипертонической болезни.

5.8.2. Кальций

Около 40 % всего кальция плазмы крови связано с белком, еще примерно 5 % образуют комплексы с лимонной, фосфорной или угольной кислотой, остальной кальций находится в физиологически активном, ионизированном состоянии. Доля кальция, связанного с белками (так называемый неультрафильтруемый кальций), зависит от содержания протеина в плазме крови, поэтому четкой количественной связи между общим и ионизированным кальцием не существует, и тот, и другой параметр имеют клиническое значение. Во многих физиологических и патологических ситуациях представляет интерес именно содержание ионизированного кальция, но, к сожалению, он может быть определен лишь с помощью специальных кальциевых электродов, аналогичных электродам для определения pH, которые недоступны практическим лабораториям. Содержание общего кальция точнее всего может быть определено методом атомной абсорбционной спектроскопии; в данном случае этот метод может быть принят в качестве референтного.

Предложено много химических методов определения кальция в сыворотке крови и в моче; они основаны главным образом на способности образовывать окрашенные соединения с комплексоном, т. е. веществами, образующими прочные комплексы с металлами. Здесь можно выделить две подгруппы — либо общее количество комплекса непосредственно определяется фотометрией, либо окрашенный комплекс используется лишь как индикатор конца титрования, методы второй группы сейчас практически не находят применения.

К сожалению, ни один из описываемых ниже методов не обладает бесспорными преимуществами, чтобы полностью вытеснить все остальные. Большинство работников отдаст предпочтение методу с крезолфталеинкомплексом, который принят в качестве унифицированного. Принятый ранее в качестве унифицированного метод сглиоксаль-бис-2-оксианилином, видимо, менее точен, но для этого метода чехословацкое предприятие «Лаксма» выпускает готовые наборы реактивов, которые продолжают совершенствоваться. Самый старый метод с мурексидом также продолжает использоваться в некоторых лабораториях, наконец, самый чувствительный метод с флурексоном имеет то преимущество, что позволяет обходиться минимальным количеством исследуемого материала. Описанный ниже метод унифицирован в 1979 г.

Унифицированный метод по цветной реакции с крезолфталеинкомплексом. Принцип. Крезолфталеинкомплекс образует с кальцием в щелочной среде комплекс красно-фиолетового цвета, интенсивность окраски пропорциональна концентрации кальция. В реакционную смесь добавляют 8-оксихинолин, который связывает металлы, мешающие определению, но образует с кальцием менее прочный комплекс, чем крезолфталеинкомплекс.

Реактивы. 1. Боратный буфер: 200 г борной кислоты (H_3BO_3 , ортоборная кислота) растворяют при нагревании в 300 мл воды, добавляют 580 мл 5 н. КОН, объем доводят водой в мерной колбе до 1 л, при температуре ниже $56^\circ C$ из раствора могут выпадать кристаллы. 2. Глицин 2 моль/л: 7,5 г глицина растворяют в 40 мл воды, переносят в мерную колбу и доводят объем до 50 мл. Для консервации добавляют 2 капли хлороформа, хранят в холодильнике. 3. 8-Оксихинолин (оксин), 1 % раствор: 500 мг препарата растворяют в 50 мл абсолютного спирта. 4. Рабочий буферный раствор: к 300 мл воды добавляют 12,5 мл боратного буфера и 5 мл раствора глицина, перемешивают и устанавливают величину pH в пределах 10,5—10,6 с помощью 5 н. КОН, добавляют 50 мл 1 % раствора оксихинолина, переносят в мерную колбу вместимостью 500 мл и доводят до метки водой, после чего снова проверяют pH. 5. Крезилфталеинкомплекс, 0,1 % раствор: 10 мг крезилфталеинкомплекса растворяют в 100 мл основного буферного раствора. При хранении в холодильнике реактив стоек не более 2—3 дней. 6. Калибровочный раствор. Основной калибровочный раствор, содержащий кальций в концентрации 25 ммоль/л, готовят, растворяя 250 мг кальция карбоната ($CaCO_3$) в 5 мл 1 н. HCl. Раствор переносят в мерную колбу вместимостью 100 мл и доводят водой до метки. Для консервации добавляют 2 капли хлороформа. Одновременно готовят раствор солей магния 3 мг/мл, растворяя 2,5 г хлорида магния ($MgCl_2 \cdot 6H_2O$) в 100 мл воды. Из этих растворов готовят рабочие калибровочные растворы, согласно приведенной ниже таблице.

Ход определения. К 3 мл рабочего раствора крезолфталеинкомплекса добавляют 0,05 мл исследуемой сыворотки, перемешивают.

Основной калибровочный раствор 25 ммоль/л Ca, мл	Раствор магния 3 мг/мл, мл	Вода, мл	Концентрация кальция, ммоль/л
6,0	1,0	До 100	1,5
8,0	1,0	» 100	2,0
10,0	1,0	» 100	2,5
12,0	1,0	» 100	3,0
14,0	1,0	» 100	3,5

Через 5 мин фотометрируют в кювете с длиной оптического пути 0,5 см при длине волны 500—560 нм (зеленый светофильтр) против рабочего раствора крезолфталеинкомплекса. Одновременно обязательно ставят хотя бы одну калибровочную пробу. Расчет ведут по калибровочной кривой либо по правилу пропорций.

Примечание. Некоторые сорта стекла могут выщелачиваться, отдавая в раствор соли кальция, поэтому лабораторную посуду, особенно пробирки, желательно предварительно прокипятить в соляной кислоте. Определение желательно проводить в сыворотке или в плазме, полученной из гепаринизированной крови, так как щавелевая, лимонная кислота и другие антикоагулянты, связывающие кальций, могут помешать определению.

Литература. Boross M., Szilagyil L. Kisrl. Orvostud, 1974, vol. 24, p. 96—102.

Метод определения кальция по цветной реакции сглиоксаль-бис-2-оксианилом. Принцип. Глиоксаль-бис-2-оксианил образует с кальцием в щелочной среде окрашенный комплекс красного цвета, интенсивность которого пропорциональна концентрации кальция.

Реактивы. 1. Метиловый спирт (метанол) х. ч., безводный. 2. Глиоксаль-бис-2-оксианил (ГБОА), 0,05 % раствор в метаноле, 50 Мл-препарата растворяют в 100 мл этанола. Раствор нестойкий. 3. Боратный буфер pH 12,6. Растворяют в воде 10 г едкого натра ($NaOH$) и 10 г тетрагидробората натрия ($Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$), объем доводят до 1 л в мерной колбе. 4. Ацетон х. ч. 5. Смесь метанола и ацетона 9:1 (по объему). 6. Калибровочные растворы. Основной калибровочный раствор, содержащий 25 ммоль/л Ca, готовят, растворяя 100 мг карбоната кальция ($CaCO_3$) в 5 мл 1 н. HCl и доводя объем раствора до 100 мл водой в мерной колбе. Из этого раствора готовят рабочие калибровочные растворы с концентрацией 1,5—3,5 ммоль/л, отбирая 6—14 мл в мерную колбу вместимостью 100 мл и доводя объем водой до метки (приготовление аналогично методу, описанному в предыдущем методе, но без солей магния).

Ход определения. К 1,5 мл боратного буферного раствора прибавляют 0,02 мл исследуемой сыворотки и через 1/2 мин 0,5 мл 0,05 % раствора ГБОА в метаноле и еще через

1 1/2 мин 1 мл смеси метанола и ацетона. Фотометрируют точно через 5–10 мин после добавления 0,05 % раствора ГБОА при длине волны 540–550 нм в кювете с длиной оптического пути 1 см против холостой пробы, в которую вместо исследуемой сыворотки берут воду. Одновременно ставят также калибровочную пробу.

Расчет выполняют по калибровочному графику либо по правилам пропорции.

Примечание. ГБОА в щелочной среде распадается с образованием анилина и глиоксаля, который затем окисляется в глиоксальевую кислоту, способную образовывать комплексы с кальцием. Даже в растворе абсолютного метанола на протяжении нескольких недель реактив разрушается. Накапливающаяся глиоксальевая кислота в значительной степени сказывается на экстинкции опытных, нежели калибровочных, проб. Поэтому измерение оптической плотности должно проводиться в совершенно определенное время, причем при длине волны 540–550 нм показания стабильнее, чем при длине 530 нм, при которой наблюдается максимум пика.

Нормальные величины и клиническое значение те же, что и в предыдущем методе.

Литература. Mayer M., Farese G. Clin. Chem., 1966, vol. 12, p. 234. Kao N., Rose Ch. F. Lab. Pract., 1971, vol. 20, N 3, p. 217–219.

Метод определения кальция по цветной реакции с мурексидом в присутствии глицерина. Принцип. Мурексид образует с кальцием в щелочной среде окрашенный комплекс, устойчивость которого повышается путем добавления в раствор глицерина.

Реактивы. 1. Мурексидглицериновый реактив: 20 мг мурексида растворяют в 10 мл 4 н. КОН, 1 мл этого раствора смешивают с 20 мл смеси из 10 мл воды и 10 мл глицерина. 2. Калибровочные растворы готовят так же, как и в предыдущем методе.

Ход определения. В 0,3 мл воды вносят 0,1 мл исследуемой сыворотки, затем туда же добавляют 3 мл мурексидглицеринового реактива, перемешивают и через 5 мин фотометрируют в кювете с длиной оптического пути 1 см при длине волны 490 нм против холостой пробы, в которую вместо исследуемой сыворотки берут воду. Одновременно ставят калибровочную пробу, в которую вместо сыворотки берут 0,1 мл калибровочного раствора.

Расчет производят по калибровочному графику.

Литература. Вишневская Т. М., Ляшевская Т. Н. Лаб. дело, 1976, № 7, с. 444.

Нормальные величины для всех приведенных методов 2,3–2,75 ммоль/л (9–11 мг в 100 мл).

Клиническое значение. Содержание кальция в сыворотке повышается при массив-

ных распадах костей, гиперпаратиреозидизме, гипервитаминозе D. Оно уменьшается при нарушении всасывания в кишечнике в результате стеатореи или гиповитаминоза D, а также при некоторых почечных тубулопатиях и главным образом недостаточности паразитовидных желез.

5.8.3. Магний

Методы определения магния во многом близки методам определения кальция, так как и в том, и в другом случае на первом месте по точности стоит атомная абсорбция, на втором — химические методы, основанные на образовании окрашенных комплексных соединений. Хотя магний, подобно кальцию, только частично находится в плазме крови в ионизированном состоянии, а частично связан с белками и низкомолекулярными комплексообразователями — лимонной и фосфорной кислотами, однако клиническое значение имеет только определение общего магния.

Известно много веществ, образующих окрашенные или флюоресцирующие комплексы с магнием, аналитическая пригодность их определяется чувствительностью и главной способностью избирательно реагировать с магнием в присутствии кальция. К сожалению, абсолютной избирательности достичь очень трудно, поэтому приходится использовать составные калибровочные растворы, в которых присутствует несколько веществ.

Давно известен не очень чувствительный метод определения с титановым желтым, который достаточно специфичен, но требует предварительной депротенизации, благодаря чему может быть использован для определения магния в эритроцитах. Значительно чувствительнее метод с магоном (ксилидиновым синим II) или его сульфопроизводным (ксилидиновый синий I). В кислой среде это вещество существует в виде окрашенного в красный цвет недиссоциированного соединения, в слабощелочной — в виде однозарядного иона синего цвета, а в сильнощелочной — в виде двухзарядного иона красного цвета. С ионом магния образуют устойчивый окрашенный в красный цвет комплекс два однозарядных иона. Методы с титановым желтым и магоном унифицированы в 1974 г.

Определение магния по цветной реакции с титановым желтым. Принцип. Магний в щелочной среде образует комплекс красного цвета с титановым желтым, присутствие гидроксиламина стабилизирует окраску. При анализе сыворотки или эритроцитов белки осаждают волфраматом натрия, моча предварительно разводится до нужной концентрации.

Реактивы. 1. 0,075 % раствор титанового желтого: 18,7 мг вещества растворяют в 25 мл воды, хранят в холодильнике в темной склянке; реактив очень светочувствителен, годен не более 10 дней. 2. 2 % раствор гидрохлорида гидроксиламина: 2 г гидроксиламинагидрохлорида (H₂NOH-HCl) растворяют в 100 мл воды. 3. 0,1 % раствор метилового красного в 95 %

этиловом спирте, индикатор с зоной перехода рН 4,4—6,2. 4. 0,2 н. NaOH. 5. 1,5 н. NaOH. 6. 10 % раствор вольфрамво-кислого натрия: 10 г вольфрамата натрия (Na_2WO_4) растворяют в воде, объем доводят до 100 мл. 7. 0,67 н. серная кислота. 8. Калибровочный раствор магния сульфата 1 ммоль/л: 246,5 мг сульфата магния ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) растворяют в воде, объем доводят в мерной колбе до 1 л.

Ход определения. К 2 мл воды добавляют 1 мл исследуемой сыворотки и 1 мл 10 % вольфрамата натрия, затем 1 мл 0,67 н. серной кислоты. Перемешивают стеклянной палочкой, а затем через 10—15 мин центрифугируют или фильтруют. В градуированную пробирку или мерный цилиндр с отметкой 10 мл отмеривают 2,5 мл безбелкового фильтрата, добавляют каплю индикатора метилового красного и 0,2 н. NaOH до установления желтой окраски. После этого прибавляют 1 мл 2 % гидрохлорида гидроксилamina, 1 мл 0,075 % титанового желтого и 2 мл 1,5 н. NaOH и доводят объем водой до 10 мл. Фотометрируют в кювете с длиной оптического пути 1 см при длине волны 500—560 нм против холостого опыта, в который вместо сыворотки крови берут 1 мл воды.

Для построения калибровочного графика в серию пробирок вносят от 0,2 до 1 мл калибровочного раствора 1 ммоль/л, доводят водой до объема 6 мл, прибавляют по 1 мл 2 % гидрохлорида гидроксилamina, 0,075 % титанового желтого и 2 мл 1,5 н. NaOH. Окраска раствора, в который добавлено 0,2 мл калибровочного раствора, соответствует содержанию магния в плазме 0,4 ммоль/л, раствора, в который добавлено 0,5 мл, — концентрации 1 ммоль/л и т. д.

Примечания. 1. При определении содержания магния в эритроцитах 0,5 мл эритроцитарной взвеси, полученной так же, как и при определении в клетках калия и натрия¹, вносят в 2,5 мл воды, через несколько минут, когда взвесь просветлеет (станет лаковой), что свидетельствует о завершении гемолиза, добавляют вольфрамат натрия, серную кислоту и т. д. аналогично определению в плазме. 2. Метод пригоден также для определения магния в моче. В этом случае ее разводят водой в 10 или 20 раз (так как концентрация может сильно колебаться), к 0,5 мл приливают 5,5 мл воды, по 1 мл растворов гидрохлорида гидроксилamina и 0,075 % титанового желтого, а также 2 мл 1,5 н. NaOH и фотометрируют.

Литература. Лаб. дело, 1977, № 5, с. 303—304.

Определение магния по цветной реакции с магоном. **Принцип.** Магний дает с магоном (ксилитидиловый синий II) яркое окрашивание, белки сыворотки не препятствуют его развитию. В связи с тем что на интенсивности окраски сказывается присутствие других катионов, используют комплексный калибровочный раствор.

¹ См. с. 261.

Примечание. Чехословацкая фирма «Лакхем» выпускает набор реактивов для работы этим методом.

Реактивы. 1. Раствор магона, содержащий 0,28 ммоль/л: 115,4 мг магона при нагревании растворяют в 50 мл диметилформамида, объем доводят до 1 л 96 % этиловым спиртом. 2. 0,02 М боратный буфер рН 9,5: примерно в 800 мл воды растворяют 7,63 г буры ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$), прибавляют 79 мл 0,1 н. NaOH и проверяют рН, добавляют столько щелочи, сколько необходимо, чтобы рН был 9,5, после чего водой доводят объем до 1 л. 3. Рабочий раствор магона. В день определения смешивают равные части раствора магона и боратного буфера. Реактив нестойк, годен в течение одного рабочего дня. 4. Комплексный калибровочный раствор: 200 мг металлического магния в виде стружки промывают разбавленной HCl, водой, спиртом и эфиром, высушивают сначала в токе азота, затем под вакуумом и растворяют в 15 мл концентрированной HCl, добавляют около 200 мл воды и 2,5 г кальция карбоната (CaCO_3), 2,86 г калия хлорида (KCl) и 65,4 г натрия хлорида (NaCl); после растворения всех ингредиентов объем доводят водой до 1 л. Получается раствор, содержащий 200 мг магния в 1 л, перед употреблением его разводят водой в 10 раз, получается рабочий калибровочный раствор, содержащий 0,823 ммоль/л магния (2 мг%).

Ход определения. К 4 мл рабочего раствора магона прибавляют 30 мкл исследуемой сыворотки или спинномозговой жидкости, перемешивают и фотометрируют в кювете с длиной оптического пути 1 см при длине волны 505 нм против холостого опыта, в который вместо сыворотки берут воду. Одновременно ставят калибровочный опыт, в который вместо сыворотки берут 30 мкл рабочего калибровочного раствора, содержащего 0,823 ммоль/л магния. Расчет ведут по правилу пропорций.

Литература. *Chromy V., Svoboda V., Stepanova I. Biochem. Med., 1973, vol. 7, N 2, p. 208—217.*

Нормальные величины: содержание магния в сыворотке 0,7—1,2 ммоль/л.

Клиническое значение определения магния в сыворотке ограничено. Повышение его концентрации бывает при уремии, гипотиреозе и диабетическом ацидозе, понижение — при нарушении всасывания, тиреотоксикозе, хроническом алкоголизме и альдостеронизме.

5.8.4. Железо

Подавляющая часть всего железа человеческого организма находится внутри эритроцитов и входит в состав гемоглобина. Каждая его молекула содержит 4 атома двухвалентного железа, на долю которых приходится 0,334 %

ее массы, что при концентрации гемоглобина в крови 140 г/л соответствует содержанию железа 500 мг/л крови. Определение содержания железа в цельной крови не имеет практического значения, так как определять гемоглобин значительно проще. Иное дело плазма крови, содержание железа в которой примерно в 300 раз ниже и составляет около 1,5 мг/л. Его большая часть находится в окисленном состоянии, т. е. трехвалентна и связана с белком трансферрином (сидерофилином); кроме того, в плазме имеются геминное железо, ферритин и внутрисосудистый гемоглобин. Так называемое геминное железо входит в состав молекул, содержащих только по одной порфириновой группе. Это продукты неполного синтеза или распада гемоглобина и дыхательных ферментов, они связаны с транспортным сывороточным белком гемопексином. Ферритин — самый богатый железом сывороточный белок, в его составе находится мицелла, содержащая до 4300 атомов окисленного железа. Молекулы гемоглобина, образовавшиеся в результате внутрисосудистого гемолиза, содержат 4 порфириновых кольца, они связываются не с гемопексином, а с гаптоглобином. Разрушение эритроцитов и увеличение содержания в плазме свободного гемоглобина почти неизбежны при взятии крови. Считается, что при соблюдении всех предосторожностей (игла с широким просветом, свободное вытекание крови, осторожное отслоение сгустка, центрифугирование в течение 45 мин при 2500 об/мин, отсасывание сыворотки и повторное центрифугирование) удается уменьшить количество свободного гемоглобина в сыворотке лишь до уровня около 30 мг/л, что соответствует содержанию железа 100 мкг/л или примерно 1/15 всего железа сыворотки. Используемые при получении плазмы антикоагулянты сами связывают железо, поэтому рекомендуется исследовать содержание железа именно в сыворотке.

Железо поступает в организм через желудочно-кишечный тракт, а выводится почти исключительно калом (конечно, если нет кровотечения или гематурии), поэтому содержание его в моче у здоровых очень мало — 0,7—5,7 нмоль/сут (0,04—0,3 мкг), это количество не может быть уловлено обычными методами. После приема некоторых железосодержащих препаратов или комплексобразователя десферала, который способствует опустошению депо, выведение железа с мочой значительно увеличивается и может быть измерено.

Состояние обмена железа лучше всего характеризует количество негеминного сывороточного железа, т. е. железо трансферрина и ферритина, так как это основной резерв, который используется организмом в случае необходимости. Общее количество трансферрина, связанного с железом и свободного, может быть определено также иммунологическими методами, определяют и количество свободного трансферрина по его способности связывать радиоактивное железо. Для практических лабораторий, использующих обычные биохимические методы, наибольшее значение имеет определение негемин-

нового железа сыворотки, а также ее железосвязывающей способности, т. е. того максимального количества трехвалентного железа, которое может связаться с белками сыворотки.

Прочность комплекса трансферрин — железо максимальна при pH 7,0 и зависит от природы буферного раствора. При увеличении кислотности, а также восстановлении железа комплекс распадается. Другие соединения, например гемоглобин, в этих условиях не разрушаются или разрушаются лишь незначительно, поэтому кислотноотщепляемое или негеминное железо лучше других компонентов плазмы характеризует резервы железа в организме. Существует несколько вариантов методов определения негеминного железа, в частности некоторые рекомендуют проводить нагревание на водяной бане для лучшего разрушения комплекса, но при этом всегда существует угроза, что разрушатся и другие железосодержащие соединения, поэтому результаты анализа будут завышенными.

Известно много цветных реактивов как на восстановленное (Fe^{++}), так и на окисленное (Fe^{+++}) железо; лучшие результаты получаются с батофенантролином, который образует наиболее прочный и яркоокрашенный комплекс. Но батофенантролин нерастворим в воде, поэтому его надо предварительно обработать хлорсульфоновой кислотой либо использовать спиртовой раствор. При определении железа после минерализации с серной кислотой надо всегда иметь в виду, что почти неизбежно образующаяся в этих условиях пиррофосфорная кислота, связывая железо, мешает проведение цветной реакции, поэтому ее надо разрушать, нагревая на водяной бане слегка разбавленный минерализат.

Условия взятия материала. Определение сывороточного железа обычно проводят для выявления железодефицитного состояния, поэтому, как правило, информативно уменьшение его содержания. Обследуемые по крайней мере 2 нед перед взятием крови не должны получать железосодержащих препаратов. Кровь надо брать широкими иглами, по возможности новыми. Сыворотка должна быть свободна от видимых следов гемолиза.

Батофенантролиновый метод определения железа унифицирован в 1974 г.

Определение железа по цветной реакции с сульфонируемым батофенантролином. Принцип. Белки осаждают трихлоруксусной кислотой, которая при прогревании разрушает также комплекс железа с трансферрином. Для установления оптимальной величины pH 4,8—5,0 добавляют аммония ацетат, а для восстановления всего железа гидразин. Двухвалентное железо образует окрашенный комплекс с батофенантролином, который переведен в сульфатированную форму добавлением хлорсульфоновой кислоты.

Реактивы. 1. Трихлоруксусная кислота, 20 %. 2. Аммония ацетат: 70 г ацетата аммония (CH_3COONH_4) растворяют в воде, объем доводят до 100 мл. Препарат гигроскопичен. 3. Гидразина сульфат, насыщенный раствор, готовят,

заливая 2,5 г препарата 100 мл воды. 4. Раствор сульфонированного батофенантролина: в пробирке к 100 мг батофенантролина (4,7-дифенил-1,10-фенантролина) приливают 0,5 мл хлорсульфоновой кислоты, нагревают на кипящей водяной бане 30 с, охлаждают и медленно приливают 10 мл воды, после чего снова нагревают на водяной бане 5 мин и разбавляют 100 мл воды. Добавляя 5 н. NaOH, устанавливают рН 4,0 и доводят объем водой до 200 мл. 5. Калибровочный раствор железа, содержащий 30 мкмоль/л. Сначала готовят раствор соли Мора (железоаммиачные квасцы, аммонийжелезо II сернокислое), $\text{FeSO}_4 \cdot (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, содержащий 3 ммоль/л, растворяя 1,178 г в 5 мл 0,3 н. HCl и доводя объем до 1 л водой, содержащей в 1 л 1 мл концентрированной серной кислоты. Этот раствор разводят подкисленной водой в 100 раз; получается раствор, содержащий 30 мкмоль/л, или 1,67 мкг/мл.

Ход определения. К 2 мл исследуемой сыворотки прибавляют 2,5 мл воды и 1,5 мл 20 % раствора трихлоруксусной кислоты, перемешивают и ставят на 15 мин на водяную баню температуры 90—95 °С. Затем центрифугируют 20 мин при 2000 об/мин и отбирают 4 мл прозрачного слоя, к которым приливают 0,35 мл 70 % раствора аммония ацетата и 0,3 мл раствора сульфата гидразина. Смесь фотометрируют при длине волны 535 нм в кюветах с длиной оптического пути 1 см, затем прибавляют 0,4 мл раствора сульфонированного батофенантролина, оставляют на 1 ч и снова фотометрируют при той же длине волны. Обе фотометрии выполняют против холостого опыта, в который берут вместо исследуемой сыворотки 2 мл воды.

Калибровку проводят так же, как и основной опыт, но вместо сыворотки берут 2 мл калибровочного раствора.

Расчет сывороточного железа (мкмоль/л) выполняют по формуле:

$$\frac{E_{\text{он1}} - E_{\text{он2}}}{E_{\text{к1}} - E_{\text{к2}}} \cdot 30,$$

где $E_{\text{он1}}$ и $E_{\text{он2}}$ — отсчеты опытной пробы до и после прибавления раствора сульфонированного батофенантролина; $E_{\text{к1}}$ и $E_{\text{к2}}$ — соответственно результаты фотометрии калибровочной пробы; 30 — содержание железа в калибровочном растворе, мкмоль/л.

Примечания. 1. Надо тщательно следить за содержанием железа в дистиллированной воде и реактивах, используя в случае необходимости бидистиллированную воду, приготовленную в стеклянном перегонном аппарате. 2. Если после удаления белков не удастся набрать точно 4 мл надосадочной жидкости, можно взять меньшее ее количество и сделать поправку при расчете или же взять точно такое же количество калибровочного раствора.

Литература. Лаб. дело, 1977, № 5, с. 302—303.

Определение железа по цветной реакции со спиртовым раствором батофенантролина. Принцип. Сывороточное железо восстанавливают тиогликолевой кислотой, белки осаждают трихлоруксусной кислотой, в фильтрате устанавливают нужную величину рН, добавляя ацетат натрия, и проводят цветную реакцию с батофенантролином. В связи с тем что он в воде нерастворим, используют спиртовой раствор.

Реактивы. 1. Кислота тиогликолевая. 2. Кислота трихлоруксусная, раствор 400 г/л. 3. Натрия ацетат, насыщенный раствор: в случае необходимости его очищают от следов железа, растворяя 500 г в 1 л воды при 37 °С. К прозрачной надосадочной жидкости добавляют раствор батофенантролина из расчета 10 мл на 1 л и этиловый спирт в количестве, равном количеству надосадочной жидкости; на холоду выпадают кристаллы $\text{C}_6\text{H}_5\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$. 4. Батофенантролин, 40 мг в 100 мл этанола. 5. HCl 1 н. раствор. 6. Калибровочный раствор железа: 100 мг мягкой железной проволоки растворяют в 4 мл концентрированной HCl и разводят до 1 л водой, получается раствор, содержащий 100 мкг/мл. Из него разведением в 60 раз получают раствор, содержащий 30 мкмоль/л (1,67 мкг/л).

Примечание. Учитывая, что метод определения очень чувствительный, необходимо принять все меры, чтобы реактивы и посуда не содержали железа, присутствие которого выявляется при постановке холостых проб. Посуду, в том числе пробирки для взятия крови, необходимо обрабатывать разбавленной HCl; должна использоваться только деионизированная или перегнанная в стеклянной посуде вода; реактивы очищаются перекристаллизацией.

Ход определения. К 0,7 мл сыворотки прибавляют 2 капли тиогликолевой кислоты, взбалтывают, а затем еще 0,35 мл 1 н. HCl, опять перемешивают и прибавляют 0,2 мл раствора трихлоруксусной кислоты. Энергично размешивают стеклянной палочкой в течение 45 с, а затем центрифугируют при 2500 об/мин. В пробирку с притертой пробкой отбирают из надосадочной жидкости 0,7 мл, к которым прибавляют 0,6 мл насыщенного раствора аммония ацетата и 0,7 мл раствора батофенантролина. Окраска развивается за 20—30 с. Фотометрируют в кювете с длиной оптического пути 1 см при длине волны 536 нм против холостой пробы, в которую вместо сыворотки берут 0,7 мл воды. Одновременно обрабатывают и калибровочную пробу, в которой вместо сыворотки используют 0,7 мл калибровочного раствора, содержащего 30 мкмоль железа в 1 л.

Расчет проводят по правилу пропорций.

Нормальные величины. Негеминное железо плазмы 12—32 мкмоль/л (65—175 мкг/100 мл), у женщин на 10—15 % ниже, чем у мужчин.

Клиническое значение. Уменьшение негеминного железа сыворотки свидетельствует об истощении резервов и бывает при железодефицитных состояниях. Железосвязи-

вающая способность сыворотки, т. е. общее количество трансферрина, при этом возрастает.

Определение железосвязывающей способности сыворотки крови. Принцип. Исследуемую сыворотку выдерживают с раствором трехвалентного железа, при этом весь трансферрин насыщается. Избыток солей железа удаляют адсорбцией на карбонате магния и определяют содержание железа в надосадочной жидкости одним из приведенных выше методов.

Реактивы. 1. Железо хлорное, 5 мг/мл: 2,42 г $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ растворяют в 100 мл 0,005 н. HCl . 2. Магния карбонат в порошке. 3. Все реактивы, необходимые для определения сывороточного железа одним из описанных выше методов.

Ход определения. К 2 мл исследуемой сыворотки добавляют 4 мл раствора хлорного железа и тщательно перемешивают. Через 5 мин прибавляют порошок магния карбоната в объеме примерно 0,5 мл, встряхивают 10—15 с и центрифугируют. В надосадочной жидкости определяют железо одним из описанных выше методов. Полученный результат умножают на 3 (разведение сыворотки).

Нормальные величины. Железосвязывающая способность сыворотки 45—75 мкмоль/л (250—400 мкг/100 мл), у женщин на 10—15 % ниже, чем у мужчин.

Литература. Caraway W. T. Clin. Chem., 1963, vol. 9, N 2, p. 188—189.

Клиническое значение. Железосвязывающая способность возрастает при железодефицитных состояниях.

Определение железа в моче по цветной реакции с сульфонируемым батофенантролином. Принцип. Моча минерализуется с серной кислотой, образовавшийся пирофосфат железа разрушается гидролизом на кипящей водяной бане, раствор нейтрализуется ацетатом аммония, железо восстанавливается сульфатом гидразина и проводится цветная реакция с сульфонируемым батофенантролином.

Реактивы. 1. Кислота серная концентрированная. 2. Перекись водорода, 30 % раствор в воде (пероксид). 3. Сульфат гидразина, насыщенный раствор: 2,5 г вещества заливают 100 мл воды. 4. Аммония ацетат, насыщенный раствор: к 148 г соли добавляют 100 мл воды. 5. Раствор сульфонируемого батофенантролина — см. определение в сыворотке крови. 6. Калибровочный раствор железа, содержащий 30 мкмоль/л, см. определение в сыворотке крови.

Ход определения. В колбу Кьельдаля помещают 5 мл исследуемой мочи и 1 мл концентрированной серной кислоты и нагревают на электрической плитке с закрытой спиралью или на песчаной бане, не должно быть бурного кипения и образования пены, которая поднималась бы в горлышко колбы, в конце сжигания должны образовываться тяжелые белые пары, занимающие нижнюю часть колбы. Когда материал потемнеет и объем его уменьшится примерно наполовину, добавляют несколько капель пергидроля, что способствует просветлению пробы. Сжигание проводят до тех пор, пока раствор не станет совсем светлым. После охлаждения доли-

вают 10 мл воды и ставят на кипящую водяную баню на 5—10 мин, после чего объем пробы доводят до 20 мл водой. Отбирают 4 мл, к которым прибавляют 0,3 мл насыщенного раствора сульфата гидразина и 1,2 мл насыщенного раствора ацетата аммония, после чего фотометрируют при длине волны 535 нм в кювете с длиной оптического пути 1 см и прибавляют 0,5 мл раствора сульфонируемого батофенантролина и оставляют на 1 ч, затем повторно фотометрируют в тех же условиях.

Нормальные величины. В норме этим методом железо в моче не определяется.

Клиническое значение. Железо в моче определяется после приема железосодержащих препаратов, а также при проведении десферальной терапии (удаление избытка железа из организма с помощью комплексообразователей).

5.8.5. Фосфор и фосфорсодержащие вещества

Помимо неорганического фосфора, концентрация которого в плазме и эритроцитах практически одинакова, в крови различают еще фракцию кислоторастворимого фосфора и липидного фосфора. Кислоторастворимый фосфор весь находится в клетках, липидный — в эритроцитах, и в плазме.

Результаты определения неорганического фосфора во многом зависят от используемого метода (см. ниже). Концентрация его может значительно уменьшаться, например при алкоголизме, причем это реально не сказывается на каких-то физиологических процессах. Клинически падение неорганического фосфора наиболее информативно у детей при рахите, когда оно наступает из-за нарушения всасывания. Повышение также нельзя трактовать всегда одинаково, поскольку оно может быть и признаком высокой тренированности спортсмена, и наступать при тяжелой уремии, когда почки не могут выводить соли фосфорной кислоты, образующиеся при окислении пищевых белков и фосфолипидов.

Кислоторастворимый фосфор — это низкомолекулярные, органические соединения, которые остаются в надосадочной жидкости после осаждения белков кислотами — трихлоруксусной, хлорной и т. д. Это в основном промежуточные продукты гликолиза, моно- и динуклеотиды, которые находятся в эритроцитах. Ядросодержащие клетки, кроме того, богаты и полинуклеотидами — ДНК и РНК, но этих клеток в крови мало, поэтому суммарный их вклад невелик. Примерно $\frac{2}{3}$ всего кислоторастворимого фосфора крови входят в состав молекул дифосфоглицериновой кислоты эритроцитов — 2,3-ДФГ, количество которой увеличивается при всех заболеваниях, сопровождающихся хронической гипоксией; остальное — это главным образом фосфор АТФ и АДФ. Фосфорилированных Сахаров — гексозо- и пентозофосфатов — относительно немного. Поэтому клиническое

значение определения кислоторастворимого фосфора крови примерно такое же, как 2,3-ФДГ эритроцитов.

Во фракцию липидного фосфора входят те соединения, которые можно экстрагировать не смешивающимися с водой растворителями — эфиром, хлороформом и т. д. В эритроцитах они участвуют в образовании оболочки, в плазме частиц липопротеидов. Большая часть липидного фосфора приходится на долю производных фосфатидиловой кислоты — фосфатидилхолинов (лецитинов) и фосфатидилэтаноламинов (кефалинов).

При определении неорганического фосфора в плазме белки осаждают трихлоруксусной или хлорной кислотой и в безбелковом экстракте определяют фосфор. Результат в значительной мере зависит от используемого метода. При этом играют роль два обстоятельства. Во-первых, отщепление остатка фосфорной кислоты от органических соединений; по этой причине при осаждении белков трихлоруксусной кислотой результаты выше, чем при осаждении хлорной кислотой. Во-вторых, во всех методах определения фосфора на первом этапе образуется фосфорно-молибденовая гетерополиокислота, количество которой чаще всего определяют путем восстановления до молибденового синего. Гетерополиокислоты образуют не только неорганический фосфор, но и некоторые его органические производные. Варьируя восстановитель, условия протекания реакции и длину волны при фотометрии, можно в значительной мере изменить чувствительность и специфичность реакции. При определении неорганического фосфора в крови или тканях самые точные результаты получаются, если восстанавливать фосфорно-молибденовую гетерополиокислоту эйконогеном, другие вещества — аскорбиновая кислота, гидрохинон и т. д. — в той или иной степени завышают результаты, так как на них сказывается присутствие фосфорных эфиров Сахаров и глицерина. Иное дело после минерализации, тут годится любой восстановитель.

Некоторые методы определения ферментов — фосфатаз и фосфокиназ (например, креатинкиназы), а также фосфорсодержащих соединений (например, АТФ) — в конечном итоге сводятся к анализу содержания отщепившегося в определенных условиях фосфора. Очень важно, чтобы неорганический фосфор в этих случаях определялся таким методом, на результаты которого не влияют другие фосфорсодержащие вещества.

Наилучшие результаты с точки зрения точности и чувствительности дают методы, в которых фосфорно-молибденовая гетерополиокислота не восстанавливается до молибденового синего, а образует окрашенный комплекс с каким-либо основным красителем, лучше всего с малахитовым зеленым. В образовании комплекса на один атом фосфора может приходиться до 3 молекул красителя, поэтому чувствительность и точность получаются очень хорошими.

При определении кислоторастворимого и липидного фосфора исследуемый материал ми-

нерализуют (сжигают). Некоторые авторы рекомендуют для этого нагреватель с серной кислотой, так же как и при анализе азотистых соединений. В этом случае температура должна быть около 300 °С, при этом образуются пиррофосфаты, которые надо разрушить, прокипятив разбавленный минерализат. Поэтому лучше минерализовать нагреванием с хлорной кислотой, когда температура около 200 °С (дигидрат хлорной кислоты кипит при 203 °С), и пиррофосфаты не образуются.

Нормальные величины: неорганический фосфор в плазме или сыворотке 1–2 ммоль/л (3–6 мг/100 мл), в эритроцитах 1–1,5 ммоль/л (3–4 мг/100 мл).

Кислоторастворимый фосфор в эритроцитах 7–14 ммоль/л (22–44 мг в 100 мл).

Липидный фосфор в плазме или сыворотке 2–3,5 ммоль/л (7–11 мг/100 мл), в эритроцитах 3–5 ммоль/л (10–16 мг/100 мл).

5.8.6. Неорганический фосфор

Унифицированный метод определения фосфора по восстановлению фосфорно-молибденовой гетерополиокислоты (метод унифицирован в 1972 г.). Принцип. Белки осаждают трихлоруксусной кислотой, в кислой среде фосфорная кислота образует с молибденовой кислотой фосфорно-молибденовую гетерополиокислоту, которая восстанавливается эйконогеном с образованием ярко окрашенного молибденового синего.

Реактивы. 1. Кислота трихлоруксусная, раствор 100 г/л (10%). 2. Кислота серная 5 н. 3. Аммоний молибденовокислый, 5% раствор. Готовят, растворяя 5 г $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ в 100 мл 5 н. серной кислоты. 4. Натрий кислый сернистокислый NaHSO_3 . В такой форме соль существует только в растворе, это скорее коммерческое, нежели химическое, название. При кристаллизации выпадает пирсернистокислый натрий $(\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5)$, который называют также метабисульфитом. Все три названия — бисульфит, пиросульфит и метабисульфит — синонимы; препараты с этими названиями могут быть с равным успехом использованы для определения фосфора. 5. Натрий сернистокислый безводный, сульфид натрия Na_2SO_3 . 6. Эйконоген, раствор. Растворяют полностью 6 г бисульфита натрия в 20–25 мл воды, вносят в этот раствор 0,1 г эйконогена (аминоафтолсульфоновой кислоты), который также должен полностью раствориться, на что уходит некоторое время. Отдельно в небольшом объеме растворяют 1,2 г безводного серноокислого натрия, оба раствора смешивают, доводят объем до 50 мл, дают отстояться несколько часов и фильтруют. 7. Калибровочный раствор. Основной калибровочный раствор, содержащий 50 ммоль фосфора в 1 л, готовят, растворяя 702,2 мг высушенного до постоянной массы при 120 °С однозамещенного фосфата калия KH_2PO_4 в 100 мл воды. Из него готовят рабочие калибровочные растворы, со-

держание 1; 2 и 3 ммоль/л. Для этого 1; 2 или 3 мл основного раствора доводят водой до объема 50 мл.

Ход определения. К 1 мл прибавляют 4 мл воды и 5 мл раствора трихлоруксусной кислоты, через 10 мин центрифугируют или фильтруют. К 5 мл безбелкового фильтрата добавляют 1 мл раствора молибденовокислого аммония, 0,2 мл раствора эйконогена и 1,8 мл воды. Через 20 мин фотометрируют при длине волны 630—690 нм в кюветках с длиной оптического пути 1 см против холостого опыта. Одновременно ставят холостой опыт, в который вместо исследуемой сыворотки берут воду, и калибровочные опыты, в которые вместо сыворотки берут рабочие калибровочные растворы.

Расчет проводят по калибровочному графику или правилу пропорций.

Примечания. 1. Чувствительность метода можно значительно повысить, если после добавления эйконогена пробы нагревать 7 мин на кипящей водяной бане и фотометрировать при длине волны 830 нм. В этом случае вместо 5 % раствора молибденового аммония берут 0,5 % раствор в 0,5 н. серной кислоте, остальные реактивы те же. 2. Согласно унифицированному методу окончательный объем фотометрируемых проб составляет 8 мл, если объем кюветы меньше, все дозировки можно пропорционально уменьшить.

Литература. *Fiske C., Subbarow I.* J. Biol. Chem., 1925, vol. 66, p. 375; *Bartlett G. R.* J. Biol. Chem., 1959, vol. 234, N 3, p. 466.

Метод определения фосфора по образованию окрашенного комплекса малахитового зеленого с фосфорномолибденовой кислотой. Принцип. Неорганический фосфор образует с молибденовой кислотой фосфорномолибденовую гетерополикислоту, которая, реагируя с основным красителем — малахитовым зеленым, дает зеленовато-синее окрашивание. Если фосфора нет, то малахитовый зеленый в кислой среде окрашен в желто-коричневый цвет. Белок не мешает проведению реакции, поэтому депротеинизацию не проводят, для обеспечения коллоидной устойчивости образовавшегося комплекса в раствор добавляется твин 20.

Реактивы. 1. Малахитовый зеленый. 2. Аммоний молибденовокислый. 3. Цветной реактив. 1,5 г малахитового зеленого растворяют в 250 мл воды, одновременно растворяют 10,3 г молибденовокислого аммония в 250 мл 5 н. HCl. Оба раствора смешивают, дают отстояться и фильтруют, за это время цвет реактива меняется. 4. Твин 20, 1,5 % раствор. 0,15 мл твина 20 разводит 10 мл воды. 5. Калибровочный раствор. Основной калибровочный раствор, содержащий 50 ммоль/л., готовят, растворяя 702,2 мг однозамещенного кислого фосфата калия KH_2PO_4 , высушенного при 120 °С до постоянной массы, в 1 л воды. Из него готовят калибровочный раствор, содержащий 20 мкмоль/л.

Ход определения. 0,02 мл сыворотки вносят в 1,5 мл воды, к раствору добавляют 2 мл цветного реактива и 1 каплю 1,5 % раствора твина. Через 10—15 мин фотометрируют при длине волны 600—650 нм против холостого опыта, который ставят так же, как и основной опыт, но без сыворотки.

Для построения калибровочного графика берут 0,5; 1 и 1,5 мл рабочего калибровочного раствора, т. е. 10; 20 и 30 ммоль фосфора, доводят объем до 1,5 мл, добавляют цветной реактив и раствор твина так же, как в основном опыте. Калибровочная проба, в которую взято 20 ммоль фосфора, по окраске соответствует опытной пробе, у которой взята сыворотка, содержащая фосфор в концентрации 1 ммоль/л. Калибровочные пробы, в которые взято 10 и 30 ммоль, соответствуют сывороткам, содержащим 0,5 и 1,5 ммоль фосфора в 1 л. По этим данным строится калибровочная кривая, которая и используется для расчета.

Литература. *Грибанов Г. А., Базанов Г. А.* Лаб. дело, 1976, № 9, с. 527—530.

Нормальные величины. В сыворотке или плазме содержится 1—2 ммоль/л (3—6 мг в 100 мл) неорганического фосфора.

Клиническое значение. Неорганический фосфор увеличивается при почечной недостаточности, гипопаратиреозидизме, передозировке витамина D, уменьшается при нарушении кишечного всасывания, рахите, почечных тубулопатиях, гиперпаратиреозидизме.

5.8.7. Липидный фосфор

Унифицированный метод определения фосфора после осаждения белков трихлоруксусной кислотой (метод унифицирован в 1972 г.). Принцип. При осаждении белков крови трихлоруксусной кислотой все фосфолипиды осаждаются вместе с белковым сгустком, а неорганический и кислоторастворимый фосфор остаются в растворе. Белковый сгусток минерализуется нагреванием с хлорной кислотой и фосфор определяется эйконогеновым методом. В связи с тем что белки плазмы не содержат фосфора, весь осаждаемый трихлоруксусной кислотой фосфор входит в состав фосфолипидов.

Реактивы. 1. Кислота хлорная 57 %. Ее концентрация должна быть 5,7 н., что проверяется титрованием. Если концентрация значительно ниже, что часто случается, так как продажный препарат может содержать 40 или 50 % HClO₄, соответственно увеличивается количество реактива, используемого при минерализации (см. ниже). 2. Кислота трихлоруксусная, 100 г/л (10 %). 3. Аммоний молибденовокислый, раствор 40 г/л. Готовят, растворяя 4 г (NH₄) Mo₇O₂₄·4H₂O в 100 мл воды. 4. Натрий кислый сернистокислый. 5. Натрий сернисто-

кислый безводный¹. 6. Эйконоген, раствор². 7. Калибровочный раствор. Основной калибровочный раствор, содержащий 50 ммоль фосфора в 1 л³, разводят водой в 50 раз; получается раствор, содержащий 1 мкмоль/мл.

Ход определения. К 0,2 мл исследуемой сыворотки добавляют 3 мл воды и медленно 3 мл 10 % раствора трихлоруксусной кислоты, через 1—2 мин центрифугируют, надосадочную жидкость сливают — пробирку переворачивают и дают стечь жидкости. К осадку добавляют 1 мл 57 % хлорной кислоты; если ее концентрация ниже, соответственно увеличивают количество кислоты, переносят в колбу или в большую пробирку для сжигания и минерализуют.

Минерализация — наиболее ответственный этап определения. Дигидрат хлорной кислоты $\text{HClO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ кипит при 203 °С, при более низкой температуре из пробы удаляют воду, а при повышении температуры начинает улетучиваться сама хлорная кислота. Температурный режим должен быть подобран так, чтобы пары дигидрата хлорной кислоты конденсировались на стенках и в виде капелек опускались на дно, где опять испарялись, и т. д. При оптимальных условиях минерализация заканчивается за несколько часов; если температура слишком низкая, она затягивается, если слишком высокая, хлорная кислота улетучивается и проба будет испорчена. Лучше всего сжигать пробы в больших пробирках 20X200 мм, которые устанавливают в подогреваемом электричеством металлическом блоке (каждую пробирку в отдельном гнезде). Сверху пробирки прикрывают специальными затычками или колпачками, на которых также конденсируются и стекают вниз пары хлорной кислоты. Высота блока должна быть 2—3 см; большая часть пробирки, которая находится над блоком, остается свободной и относительно холодной, на ней и конденсируется хлорная кислота. Желательно, чтобы температура в блоке поддерживалась на уровне 200—210 °С с помощью электронного реле, соединенного с контактным термометром (как в термостате). Такое устройство позволяет сжигать большое количество проб с наименьшими затратами времени лаборанта, но можно работать также с круглодонными колбами с длинными горлышками (колбы Кьельдаля) на песчаной бане, но это требует больше внимания за ходом минерализации. Внешний признак того, что минерализация окончилась — просветление проб, но он может быть обманчивым, в то же время слишком длительное нагревание приводит к потерям, поэтому перед началом серийных анализов надо отработать режим сжигания, проверяя воспроизводимость в серии.

После охлаждения к минерализованной пробе прибавляют 7 мл воды, 1 мл раствора молибденовокислого аммония и 1 мл раствора эйконоге-

на, объем доводят водой до 10 мл. Через 20 мин фотометрируют в кюветках с длиной оптического пути 1 см при длине волны 630—690 нм, против холостого опыта, в который берут 0,8 мл хлорной кислоты, 7 мл воды и далее проводят цветную реакцию так же, как и в опыте.

Для построения калибровочной кривой минерализуют калибровочные пробы, содержащие 0,2—1 мкмоль фосфора. Для этого к ним прибавляют по 1 мл хлорной кислоты и ставят нагревать вместе с опытными пробами, после чего проводят цветную реакцию. По калибровочному графику вычисляют содержание фосфора в пробе, эту величину умножают на 5 и получают концентрацию мкмоль/мл или, что то же самое, ммоль/л.

Нормальные величины: в плазме или сыворотке содержится 2,0—3,5 ммоль/л (7—11 мг в 100 мл) липидного фосфора.

Литература. *Zilversmit A., Davis A. J. Lab. Med.*, 1950, vol. 36, p. 155.

Примечание. После минерализации образовавшийся неорганический фосфор может быть определен любым методом, в том числе и наиболее чувствительным с малахитовым зеленым. Иногда в процессе минерализации образуется некоторое количество пиррофосфата, что приводит к заниженным результатам анализа. В этом случае пробу после разведения водой ставят на несколько минут на кипящую водяную баню, при этом пиррофосфат гидролизуеться.

Клиническое значение. Липидный фосфор возрастает при гиперлипотеидемиях.

5.8.8. Фосфонуклеотиды

Определение нуклеотидов эритроцитов электрофоретическим методом. Принцип. Белки эритроцитов осаждают трихлоруксусной кислотой, надосадочную жидкость подвергают электрофорезу на бумаге в цитратном буфере рН 5,1. Пятна А'ГФ и АДФ идентифицируют в ультрафиолетовом свете, вырезают, элюируют и количественно определяют прямой спектрофотометрией в ультрафиолетовом свете при длине волны 260 нм.

Реактивы. 1. Натрия цитрат трехзамещенный. 2. Гепарин, ампулированный препарат, активность 5000 ЕД/мл. 3. Натрия хлорид 0,85% раствор (физиологический раствор). 4. Кислота трихлоруксусная 150 г/л (15 % раствор). 5. HCl 0,01 н. 6. Цитратный буфер рН 5,1. Готовят, растворяя в воде 17,65 г натрия цитрата трехзамещенного и 4,41 г лимонной кислоты. Объем доводят до 1 л. 7. Бумага для электрофореза, разрезанная на ленты 35 X X 200 мм.

Ход определения. Кровь берут с гепарином из расчета 0,1 мл на 5 мл крови. Эритроциты отделяют центрифугированием, плазму отсасывают, а клетки дважды промывают изотоническим раствором натрия хлорида при 4 °С, каждый раз центрифугируя, отсасывая надоса-

¹ См. с. 271.

² См. с. 271.

³ См. с. 271.

дочную жидкость и вновь ресуспендируя в новой порции раствора. К 0,5 мл эритроцитной взвеси добавляют 0,5 мл 15 % трихлоруксусной кислоты, перемешивают палочкой, выдерживают при 4 °С 10 мин и центрифугируют. Надосадочную жидкость используют для определения нуклеотидов.

Электрофоретическую камеру заполняют цитратным буфером рН 5,1 и смачивают бумагу для электрофореза, согласно правилам работы на приборе. На место старта равномерной поперечной полосой наносят 0,05 мл исследуемого трихлоруксусного экстракта и проводят электрофорез при напряжении 12—14 В/см при силе тока 0,5—1 мА на 1 см поперечного сечения ленты в течение 3 1/2 ч. После этого электрограммы высушивают в темноте и рассматривают при освещении коротким ультрафиолетовым светом (длина волны меньше 300 нм, можно пользоваться ультрахемоскопом Блюмберга или другим аналогичным прибором). Бумага слегка флуоресцирует за счет примесей, а адениловые нуклеотиды, которые сильно поглощают свет в этой области, видны в виде темных пятен. Ближе к старту находится АДФ, дальше от старта — АТФ. Контуры пятен обводят карандашом, вырезают и элюируют 5 мл 0,01 н. HCl в течение 4 ч. Одновременно экстрагируют аналогичный участок бумаги, не содержащий нуклеотидов; этот раствор используют в качестве холостого опыта. Экстинкции всех растворов измеряются при длине волн 260 и 290 нм в кюветах с длиной оптического пути 1 см, из первой величины вычитают вторую.

Расчет основывается на данных молярного коэффициента экстинкции при длине волны 260 нм, который у разных нуклеотидов несколько отличается, авторы данного метода считают возможным пренебречь этими небольшими различиями и принимают его равным $14,2 \cdot 10^3$. Это значит, что такая величина оптической плотности получится, если фотометрировать в кювете с длиной оптического пути 1 см раствор концентрации 1 моль/л и вычест из этой величины оптическую плотность при 290 нм. Для раствора концентрации 1 мкмоль/л величина будет 0,0142. В данном методе окончательное разведение пробы в 200 раз (нуклеотиды из 25 мкл эритроцитной массы оказываются в 5 мл), поэтому расчет производят по формуле:

$$E \cdot \frac{200}{0,0142} = E \cdot 14085 \text{ мкмоль/л эритроцитной массы,}$$

где E — разность оптических плотностей, измеренных при длинах волн 260 и 290 нм.

Нормальные величины: для АТФ 600—1400 мкмоль/л, для АДФ 250—800 мкмоль/л, отношение молярных концентраций АТФ/АДФ в норме 2.

Л и т е р а т у р а . Шафрова Ю. А., Бирюкова Т. В., Шаноян С. А. Электрофоретическое

определение показателей адениловой системы крови доноров.— Лаб. дело, 1976, № 2, с. 92—94.

К л и н и ч е с к о е з н а ч е н и е . Повторное донорство приводит к возрастанию содержания обоих нуклеотидов.

Определение адениловых нуклеотидов эритроцитов методом тонкослойной хроматографии. Принцип. Белки эритроцитов осаждаются хлорной кислотой, избыток которой удаляется в виде калиевой соли. Безбелковый фильтрат хроматографируется в тонком слое на пластинах «Силуфол», нуклеотиды идентифицируются в ультрафиолетовом свете и определяются по светопоглощению элюатов.

Р е а к т и в ы . 1. Диоксан. 2. Изопропиловый спирт. 3. Аммиак, концентрированный раствор. 4. Кислота хлорная, 0,8 н. (8 % HClO₄). 5. Калия карбонат, раствор 2 моль/л. Готовят, растворяя 27,6 г карбоната калия (поташ, K₂CO₃) в воде, объем доводят до 100 мл. В случае необходимости препарат предварительно сушат при 105—110 °С. 6. Подвижная фаза для хроматографии. Смешивают 40 мл диоксана, 20 мл изопропилового спирта, 40 мл воды и 10 мл концентрированного раствора аммиака. Можно использовать и более простую систему, которую готовят без изопропанола, смешивая 40 мл диоксана, 40 мл воды и 10 мл раствора аммиака. 7. HCl, 0,1 н. 8. Натрия хлорид, 0,85 % раствор (изотонический раствор). 9. Пластины для тонкослойной хроматографии «Силуфол».

Ход определения. Кровь берут с гепарином, добавляя его из расчета 12 МЕ на 1 мл крови. Эритроциты отделяют центрифугированием, плазму отсасывают, а клетки 3 раза промывают холодным изотоническим раствором натрия хлорида, каждый раз центрифугируя по 20 мин при 3000 об/мин. К 1 мл эритроцитной массы добавляют 1 мл раствора хлорной кислоты, перемешивают и через несколько минут осадок отделяют центрифугированием. К 1 мл надосадочной жидкости прибавляют 0,1 мл раствора калия карбоната и оставляют на холоде, пока полностью не выпадут кристаллы образовавшегося перхлората калия. 0,05—0,1 мл холодной надосадочной жидкости (если она согреется, кристаллы частично растворяются) наносят в виде полоски на пластину «Силуфол» и проводят восходящую хроматографию в течение 60—90 мин в смеси диоксана, изопропилового спирта и аммиака. Перед началом хроматографии камера должна быть насыщена парами растворителя, фронт растворителя должен пройти расстояние не менее ³/₄ пластины; если он не пройдет его, то наиболее вероятная причина этого — плохое насыщение камеры парами подвижной фазы или плохая герметизация камеры.

Вынутые из камеры пластины высушивают на воздухе и просматривают в коротком ультрафиолетовом свете (на ультрахемоскопе Блюмберга или другом аналогичном приборе), находят пятна нуклеотидов и обводят их острым предметом. В этой системе быстрее всего движется АМФ, медленнее АТФ. Порошок с от-

меченных мест пластины соскабливают и элюируют 3 мл 0,1 н. HCl. Определяют светопоглощение надосадочной жидкости при длине волны 260 нм.

При налаживании методики рекомендуется провести определение в калибровочном растворе, содержащем в 1 мл 30—60 нмоль (15—30 мкг) ампулированного препарата АТФ, который непосредственно наносят на хроматографическую пластину так же, как и нейтрализованный хлорный экстракт. Эти препараты обычно, помимо АТФ, содержат также АДФ и АМФ.

Расчет проводят, исходя из молярных коэффициентов экстинкции: для АТФ — 14 600, для АДФ—15000, для АМФ— 14700. Если для хроматографии было взято 0,1 мл нейтрализованного экстракта и окончательный объем после элюции был 3 мл, разведение составляет 1:63, поэтому, для того чтобы выразить концентрацию АТФ в мкмоль/л, надо величину умножить на 4315, для АДФ коэффициент составляет 4200, для АМФ 4286. Если же для хроматографии берут 0,05 мл нейтрализованного экстракта, коэффициенты должны быть в 2 раза выше.

Нормальные величины: содержание АТФ 726 ± 2,4 мкмоль/л, содержание АДФ 262 ± 1,2 мкмоль/л, АМФ 4,1 ± 1,3 мкмоль/л.

Л и т е р а т у р а. Захаров Н. В., Рубин В. И. Тонкослойная хроматография нуклеотидов эритроцитов на пластинках силуфол.— Лаб. дело, 1980, № 12, с. 735—738.

Клиническое значение то же, что и в предыдущем методе.

5.8.9. Хлор

Хлор, как и натрий, — внеклеточный элемент, поэтому их определение имеет аналогичное клиническое значение с той разницей, что физиологические механизмы поддерживают концентрацию натрия в значительно более узких пределах. Происходит это потому, что натрий — основной катион внеклеточных жидкостей, на его долю приходится 92—93 % всех положительных зарядов, в то время как главных анионов три: хлор, бикарбонат и органические кислоты, причем на долю хлора приходится лишь $\frac{2}{3}$ их общего количества. Хотя сумма анионов также постоянна, как и сумма катионов, но колебания хлора относительно больше, чем натрия, так как уравновешиваются изменениями других анионов.

Определение натрия в биологических жидкостях на пламенном фотометре просто и надежно; для хлора аналогичного метода нет, поэтому натрий определяют в биохимических лабораториях значительно чаще, чем хлор. Однако в некоторых случаях, если речь идет об анализе отдельных проб в небольших лабораториях, особенно при исследовании мочи, определение хлора предпочтительнее, так как не требует почти никакого оборудования. Одновременное определение и хлора, и натрия вместе с другими неорганическими ионами плазмы иногда используют

для того, чтобы вычислить содержание органических кислот, которое соответствует разности между суммами неорганических катионов и анионов.

Хлор чаще всего определяют титрованием, так как, подобно другим галоидам, Cl⁻ образует плохо растворимые соли с ионами серебра и ртути. Основная методическая проблема — как установить конец титрования, т. е. появление избытка серебра или ртути. Для этого используются электрохимические методы или обратное титрование, когда ионы хлора осаждаются ионами серебра, а их избыток затем оттитровывается роданид-ионами, используя в качестве индикатора конца титрования соли железа. Однако практичнее всего прямой метод, при котором к исследуемому раствору добавляются соли ртути и в осадок выпадает нерастворимая каломель. Эти методы стали возможны потому, что появились эффективные индикаторы на ртуть — органические вещества, ртутные соли которых окрашены. Когда весь хлор удален из раствора, новые порции титранта окрашивают его. На этом основан унифицированный метод, в котором в качестве индикатора на ртуть используется дифенилкарбазон.

Самые перспективные методы определения хлора аппаратурные, в которых используется кулометрическое титрование. Оно заключается в том, что измеряется количество электричества, необходимое для того, чтобы удалить весь хлор из раствора. Анализ сводится к тому, что небольшое количество исследуемой жидкости (порядка 0,01—0,02 мл) — плазмы, сыворотки, мочи или пота — разводится буферным раствором, содержащим соли азотной кислоты. В раствор погружены три электрода: рабочий, индикаторный и индифферентный. К рабочему (серебряному) электроду прилагается положительный электрический потенциал, в результате чего через раствор течет ток, количество которого измеряется специальной электронной схемой — кулонометром. Атомы серебра на рабочем электроде превращаются в ионы Ag⁺, которые сразу же реагируют с ионами Cl⁻, в результате чего выпадает нерастворимое хлорное серебро. Когда весь хлор удален из раствора, концентрация в нем резко возрастает; это улавливается индикаторным электродом, сигнал с которого останавливает титрование. Содержание хлора в пробе вычисляется по формуле Фарадея, которая связывает количества электрического тока и выделившегося серебра, потребовавшегося, чтобы связать весь хлор.

Унифицированный меркуриметрический метод определения хлора. П р и н ц и п. Исследуемая биологическая жидкость титруется раствором азотной кислоты, образующаяся каломель выпадает в осадок. Когда весь хлор связан, избыток ионов ртути образует с индикатором дифенилкарбазоном темное, сине-лиловое окрашивание, что служит признаком конца титрования.

Р е а к т и в ы. 1. Ртуть азотная, раствор 6 ммоль/л. 2 г Hg (NO₃)₂ · 0,5 H₂O растворяют в 200 мл воды, добавляют 20 мл 2 н. азотной

кислоты и доводят водой до 1 л. 2. Дифенилкарбазон, спиртовой раствор: 100 мг дифенилкарбазона растворяют в 100 мл 96 % этилового спирта, хранят в посуде из темного стекла в холодильнике. Стоек в течение месяца. 3. Азотная кислота, 2 н: 14 мл продажной концентрированной азотной кислоты (плотность 1,4) разводят в 100 мл воды. 4. Калибровочный раствор, 10 ммоль/л. Хлорид натрия (поваренная соль) высушивают до постоянной массы при 120 °С, 584 мг препарата растворяют в воде и доводят объем до 1 мл.

Ход определения. Сначала устанавливают величину фактора раствора для титрования (титранта). Для этого в маленький стаканчик или колбочку вносят 2 мл калибровочного раствора и 4 капли (0,2 мл) раствора фенолкарбазона, постоянно перемешивая, титруют раствором азотной кислоты до появления темного окрашивания. Фактор титранта вычисляют, разделив 20 (количество микромолей хлорид-ионов в калибровочной пробе) на число миллилитров, пошедших на титрование. Фактор указывает, какому количеству микромолей хлорид-ионов соответствует 1 мл титранта.

При исследовании опытной пробы поступают аналогично: в маленький стаканчик или колбочку наливают 1,8 мл воды и вносят 0,2 мл исследуемой биологической жидкости, добавляют

4 капли (0,2 мл) раствора дифенилкарбазона и титруют раствором азотной кислоты при постоянном перемешивании до появления темной окраски. Удобнее всего перемешивать магнитной мешалкой. На титрование сыворотки должно пойти примерно 3 мл титранта.

Примечания. 1. Раствор азотной кислоты можно приготовить из красной окиси ртути. Для этого 1,3 г HgO растворяют в 11 мл концентрированной азотной кислоты и доводят объем водой до 1 л. 2. Раствор дифенилкарбазона должен быть красно-оранжевого цвета; если окраска становится желтой или вишнево-красной, реактив непригоден.

Нормальные величины: содержание в сыворотке или плазме 97–108 ммоль/л, выведение с мочой 150–2500 ммоль/сутки.

Литература. *Schales D., Schales S. J. Biol. Chem., 1941, vol. 140, p. 879.*

Клиническое значение определения хлора такое же, как и натрия. Его увеличение в плазме крови — признак выраженной дегидратации, уменьшение — признак значительного избытка воды в организме. Выведение с мочой увеличивается при спадении отеков, уменьшается при их развитии.

Раздел 6

МЕТОДЫ КЛИНИЧЕСКОЙ ИММУНОЛОГИИ

6.1. ОСОБЕННОСТИ МЕТОДОВ КЛИНИЧЕСКОЙ ИММУНОЛОГИИ

Широкое внедрение иммунологического анализа в клинику внутренних болезней, характеризующее последнее десятилетие, отражает значительные успехи развития иммунобиологии. Фундаментальные исследования функциональных клеточных взаимодействий в процессе иммунного ответа, развитие концепции иммунологического надзора, генетических механизмов детерминации и регулирования иммунных реакций организма изменили представление об иммунитете как о системе защиты, расширив его роль в сложном механизме адаптации к постоянно меняющимся внешним условиям обитания, в охране генетического постоянства внутренней среды организма. Осмысливание с этих позиций реакций иммунитета обусловило активное внедрение в клиническую практику многих новых, в том числе клеточных, реакций, заставило по-иному взглянуть на ставшие уже рутинными «старые» методы, совершенствовать их. Были разработаны методы определения концентрации фракций компонента. Описаны способы выявления прямого, «классического» и альтернативного путей его активации. Вновь усилилось внимание к фагоцитозу с позиций существующих представлений о клеточных кооперациях в распознавании антигена и реализации иммунного ответа, взаимодействия его с гуморальными компонентами. Особый интерес представляют сывороточные факторы регуляции, значение которых возрастает с установлением их диагностической информативности. Новое значение приобретают и неспецифические факторы реактивности, сывороточные бактериолитические и статические факторы, система пропердина, лизоцима и т. д.

Число методов иммунологического анализа очень быстро растет. И клиницисту, и сотруднику лабораторного подразделения все чаще приходится останавливаться перед выбором, решающую роль в котором играет диагностическая информативность того или другого теста. Такой своеобразно утилитарный подход, отличающий клиническое использование лабораторных исследований, значительно усложняет условия проведения анализа и, самое главное, его интерпретации. В отличие от экспериментальных условий, когда исследователь сам определяет время введения антигена, знает его характеристики, строго контролирует условия проведения реакции, врач-лаборант работает со сложными биологическими композициями,

взаимосвязь компонентов которых ему недостаточно известна, чаще предполагается. Именно поэтому в условиях клинико-лабораторной практики должны использоваться высококачественные диагностические сыворотки и препараты. На решение этой проблемы направлено постановление ЦК КПСС и Совета Министров СССР о развитии биотехнологии.

Клиническая иммунология развивается на лучших традициях теоретических исследований. Однако далеко не всегда можно и нужно экстраполировать результаты взаимодействия чистых систем, полученных в условной среде на таковые в сложных, мало еще изученных средах целостного организма. Причинно-следственные взаимоотношения, установленные в эксперименте и прямо перенесенные на больного, могут привести к возникновению серьезных диагностических ошибок и как следствие этого к неправильному лечению активными препаратами — иммуномодуляторами, развитию ятрогений.

Методы иммунологических исследований широко используются специалистами практически всех клинических дисциплин. Опыт централизованных клинико-иммунологических лабораторий указывает, что наибольший удельный вес в их работе занимают исследования для клиник терапевтического профиля, в которых создаются отделения иммунопатологии, иммунодефицитов. Эти патологические состояния, объединяемые чаще по синдромному признаку, нередко не имеющие четких нозологических границ, вызывают необходимость проведения наибольшего числа иммунологических тестов. Правильно подобранный комплекс последних отражает изменение иммунной реактивности, помогает выявить достаточно точно характер и уровень этих изменений. Иммунологические методы при этих заболеваниях определенно характеризуют активность процесса, отражают эффективность применяемой иммунодепрессантной или модулирующей терапии, но диагностическая информативность их далеко не равнозначна. При врожденных (первичных) иммунодефицитных состояниях значение иммунных показателей определяет диагноз. При иммунокомплексных заболеваниях типа системной красной волчанки они могут подтверждать логику диагностического процесса, а при ряде других диффузных заболеваниях соединительной ткани (системная склеродермия,

узелковый периартериит и др.) изменения иммунных показателей сопровождаются поражением органов и не имеют определенной диагностической информативности. Можно выделить группу заболеваний неинфекционной этиологии, развитие которых специфически проявляется в иммунных реакциях (I группа). Существуют заболевания, в диагностике которых иммунологические тесты играют существенную, но не определяющую роль (II группа).

Группа I. 1. Первичные иммунные дефициты.

2. Парпротеинемия.

3. Гепатома, тератобластома яичка (а-фетопротемин).

4. Сывороточный HB гепатит (HBs-антиген).

5. Рак желудочно-кишечного тракта (канцеро-эмбриоспецифический антиген).

6. Аутоиммунная гемолитическая анемия.

7. Тиреоидит Хашимото.

Группа II. 1. Системные заболевания соединительной ткани (ревматические болезни).

2. Хронический активный гепатит, болезнь Шегрена.

3. Некоторые болезни почек (иммуно-комплексный нефрит).

Таким образом, очевидно, что диагностическая информативность иммунологического анализа ограничена нешироким кругом заболеваний. В то же время применение иммунных методов позволяет специфически определять и выделять биологически активные вещества, играющие определенную роль в патогенезе заболеваний, устанавливать эффективность иммуномодулирующей терапии, объективизировать обоснованность ее назначения.

В основе иммунной реакции лежит специфическое взаимодействие антигена с антителом. Именно оно обуславливает правильность полученного ответа. Но необходимо строгое выполнение всех требований к ингредиентам реакции, технике ее постановки и учета.

Иммунный ответ целостного организма — это сложная, взаимосвязанная, генетически детерминированная система последовательных реакций. В лабораторной практике при изучении составных компонентов этой системы исторически сложилось и сохраняется сейчас условное разделение на гуморальные и клеточные факторы иммунитета. Поэтому в изложении материала мы будем придерживаться этой традиции.

6.2. ИССЛЕДОВАНИЕ ФАКТОРОВ ГУМОРАЛЬНОГО ИММУНИТЕТА — РЕАКЦИЯ АГГЛЮТИНАЦИИ

Общие принципы. Агглютинация — склеивание частиц — носителей антигенных детерминант антителами, находящимися в реакционной смеси. В результате образуются конгломераты частиц, которые в среде электролита выпадают в осадок и становятся видимыми для глаза. Частицами — носителями антигена могут быть естественные клетки: клетки крови — эритроциты, лейкоциты, реже тромбоциты, бактериальные клетки, а также созданные искусственно: латекс, полистирол, бентонит, частицы угля и т. д. Основные требования, предъявляемые к этим носителям, — возможность прочно присоединять антигены и не давать спонтанной агглютинации. Широкое распространение (доступность, удобство использования, легкость учета) в лабораторной практике получило применение в качестве носителей специально обработанных эритроцитов (человека или животных).

Реакции агглютинации, в которых в качестве субстрата использованы эритроциты, получили название реакций гемагглютинации.

6.2.1. Антитела к эритроцитам

Реакция Кумбса. Принцип. При наличии неполных (блокирующих) антител на поверхности эритроцитов исследуемого пациента происходит агглютинация эритроцитов при инкубации их с антиглобулиновой сывороткой (прямой тест Кумбса) или с разведениями сыворотки

пациента в реакции с предварительно сенсибилизированными эритроцитами донора (непрямой тест).

Посуда. 1. Пробирки химические. 2. Пастеровские пипетки. 3. Мелкие белые тарелочки.

Реактивы. 1. Раствор 5 % цитрата натрия. 2. 0,9 % раствор хлорида натрия. 3. Антиглобулиновая сыворотка (сыворотка Кумбса) С титром преципитинов не ниже 1:256—1:512.

Прямая реакция Кумбса. Ход определения. 3 мл крови берут из локтевой вены исследуемого в одну пробирку с предварительно внесенным 1 мл 5 % раствора цитрата натрия. Эритроциты трижды отмывают в большом объеме изотонического раствора натрия хлорида путем центрифугирования при 1500 об/мин, в течение 10 мин. Из отмывтых эритроцитов готовят 5 % взвесь на изотоническом растворе (1 капля отмывтых эритроцитов и 19 капель изотонического раствора). На сухую чистую белую тарелку наносят каплю антиглобулиновой сыворотки, к ней добавляют каплю 5 % взвеси эритроцитов исследуемого. Сыворотку перемешивают с эритроцитами стеклянной палочкой. Рядом ставят контроль, используя вместо сыворотки изотонический раствор. Каждую новую серию антиглобулиновой сыворотки ставят аналогичным путем со стандартными сенсибилизированными эритроцитами и с интактными донорскими эритроцитами различной группы. Перемешанные эритроциты с сывороткой слегка покачивают не более 10 мин.

Учет реакции. Появление агглютинации указывает на наличие неполных антител на поверхности эритроцитов. Реакция может быть проведена в пробирках. В этом случае 2 капли (0,1 мл) различного разведения антиглобулиновой сыворотки (в зависимости от титра преципитинов) помещают в пробирки и добавляют каплю отмытых эритроцитов. Осторожно встряхивают и инкубируют 30 мин при 37 °С.

Учет реакции проводят после центрифугирования при 1500 об/мин в течение 1 мин (центрифуга ЦЛК-1).

Непрямая реакция Кумбса. Ход определения. Из локтевой вены исследуемого берут 3 мл крови в чистую сухую пробирку.

Реакция идет в два этапа: первый — сенсibilизация стандартных эритроцитов неполными антителами, предположительно находящимися в исследуемой сыворотке; второй — агглютинация сенсibilизированных эритроцитов антиглобулиновой сывороткой.

Необходимо использовать трехкратно отмытую в изотоническом растворе смесь эритроцитов различных аллотипов 0(1) группы резусположительных. Каплю этих эритроцитов вносят в пробирку и на них наслаивают 3 капли исследуемой сыворотки. Пробирки энергично встряхивают и помещают в термостат при 37 °С на 40 мин. Параллельно опыту ставят контрольные пробы. Первая: в пробирку с 2 каплями стандартных отмытых резусположительных эритроцитов 0(1) группы вносят 3 капли антирезусной сыворотки АВ (IV); вторая: в пробирку с 2 каплями отмытых стандартных резусотрицательных эритроцитов 0(1) вносят 3 капли сыворотки АВ(IV). Контрольные пробирки помещают, так же как и опытные, в термостат при 37 °С на 40 мин.

После термостатирования из пробирок осторожно отсасывают сыворотку. Эритроциты трижды отмывают в изотоническом растворе натрия хлорида. На сухую чистую тарелку наносят в 3 точках по 1 капле антиглобулиновой сыворотки. В первую каплю добавляют эритроциты, сенсibilизированные сывороткой пациента, во вторую и третью — эритроциты контроля 0(1) резусположительных с антирезусной сывороткой АВ(IV) и 0(1) резусотрицательных с антирезусной сывороткой АВ(IV). Эритроциты тщательно перемешивают стеклянной палочкой с антиглобулиновой сывороткой. После этого осторожно покачивают тарелку в течение 10 мин, но не более.

Учет реакции. При наличии в сыворотке пациента неполных антител в опытной смеси будет наблюдаться агглютинация. Контроль с резусположительными 0(1) эритроцитами должен дать агглютинацию. В контроле с резусотрицательными 0(1) эритроцитами агглютинации не должно быть. В ряде случаев неполные антитела вступают в реакцию при низкой температуре (4 °С), о чем необходимо помнить в исследовании при подозрении на холодовую иммунную цитопению.

Клиническое значение. Выявление антител к эритроцитам играет ведущую роль

в диагностике аутоиммунных гемолитических анемий, эссенциальных или вторичных.

При системных заболеваниях (системная красная волчанка, хронический активный гепатит, болезнь Шегрена) бывает чаще положительной непрямая реакция Кумбса.

6.2.2. Резус-фактор

Реакция конгломинации с применением желатина. Принцип. Эритроциты с наличием резус-антигена агглютинируют в среде с неполным антирезус-антителами в присутствии антиглобулиновой сыворотки.

Реактивы. 1. Групповые (по системе АВО) антирезусные сыворотки. 2. Стандартные эритроциты всех групп системы АВО. 3. 10 % раствор желатина (ампулированный).

Ход определения. Кровь из локтевой вены необходимо брать в две пробирки. В одну пробирку с предварительно внесенным 1 мл 5 % раствора цитрата натрия — 3 мл, в другую — только 3 мл крови. Пробирки должны быть тщательно промаркированы. В сопроводительном направлении указывают полностью фамилию, имя, отчество и группу крови пациента.

Кровь, смешанная с цитратом натрия, служит источником эритроцитов. По одной капле (0,05 мл) исследуемых эритроцитов вносят в 3 химические пробирки. В первые две добавляют 0,1 мл антирезусной сыворотки различной серии соответствующей группы крови. Далее во все три пробирки доливают 0,1 мл (2 капли) 10 % раствора желатина, предварительно прогретого на водяной бане температуры 40—45 °С. Таким образом, 3-я пробирка, в которой находится только эритроциты и желатин, служит контролем на спонтанную агглютинацию в присутствии желатина. В целях одновременного определения резус-антител используются стандартные эритроциты 0(1) группы резусположительные, в которые добавляют сыворотку крови из пробирки без раствора цитрата и то же (что и в трех предыдущих пробирках) количество желатина. В качестве контроля необходимо использовать стандартные резусположительные и отрицательные эритроциты всех 0(1), А(II), В(III), АВ(IV) групп крови. Содержимое всех пробирок осторожно перемешивают, встряхивают и помещают в термостат при 46—48 °С на 30 мин. После термостатирования во все пробирки вносят по 8 мл 0,85 % раствора хлорида натрия и перемешивают осторожным ротированием.

Учет результатов. Результат можно считать достоверным только при совпадении его в обеих пробирках разных серий антирезусной сыворотки и правильно прошедших контролях. Агглютинация эритроцитов в первых двух пробирках, видимая в проходящем свете или под микроскопом (в сомнительных случаях), указывает на наличие резус-антигена. Склеивание эритроцитов в 4-й пробирке документирует неполные резус-антитела в сыворотке исследуемого. Если происходит агглютинация в 3-й пробирке, содержащей только эритроциты и желатин, результат реакции в первых двух пробир-

ках не может быть учтен вследствие возможности неспецифической агглютинации.

Резус-антитела. Определение в грудном молоке (молозиве). Грудное молоко в количестве 10—15 мл, взятое в пробирку, центрифугируют 10 мин при 1000 об/мин. Со дна пробирки отсасывают небольшое количество и 2—3 капли накладывают на стандартные эритроциты 0(1) группы. Затем добавляют 0,1 мл 10 % раствора желатина и ставят в термостат при 46 °С на 30 мин. Дальнейший ход реакции и учет результатов уже описан выше.

Источник ошибок. Раствор желатина: наличие помутнения, хлопьев, утрата способности «застывать» при температуре 4—8 °С может приводить к ложноположительным результатам. Антирезусные сыворотки: снижение титра антител при длительном или неправильном хранении (определяется в контрольных исследованиях каждый раз при использовании новой серии). Ошибки при использовании иногруппных сывороток.

Клиническое значение. Определение резус-фактора обязательно при переливании крови и у беременных. В последнем случае необходимо исследование резус-фактора у отца будущего ребенка.

Прогноз гемолитической болезни зависит от динамики резус-антител, которые необходимо исследовать в течение беременности.

6.2.3. Антитела к лейкоцитам

Принцип метода. При наличии в исследуемой сыворотке антител к лейкоцитам последние образуют агглютинаты, видимые под микроскопом.

Реактивы. 1. Гепарин кристаллический (предпочтительнее) или готовый (во флаконах) раствор (Гедеон Рихтер). 2. Среда 199 (или фосфатный буфер рН 7,4). 3. 0,35 % и 5 % растворы хлорида натрия.

Ход определения. Выделение лейкоцитов. В пробирку с предварительно внесенным раствором гепарина (25 ЕД на 1 мл крови) из локтевой вены донора вносят 10 мл крови, перемешивают и помещают в термостат при 37 °С в наклонном (45°) положении на 1 ч. После отстаивания плазму с прилегающим к эритроцитам слоем лейкоцитов осторожно отсасывают пастеровской пипеткой и переносят в центрифужную пробирку. После 5 мин центрифугирования при 1000 об/мин надосадочную жидкость удаляют. К клеточному осадку для лизирования примеси эритроцитов добавляют 5 мл 0,35 % раствора NaCl и осторожно ресуспендируют клетки пастеровской пипеткой, не допуская образования пены, в течение 30—45 с. Вслед за этим немедленно добавляют 0,6 мл 5 % раствора NaCl и тщательно перемешивают (раствор становится изотоничным). Полученную взвесь лейкоцитов трижды отмывают средой 199 или фосфатным буфером.

Проводят пробу на жизнеспособность выделенных клеток (см. в разделе «Методы исследования клеточного иммунитета»).

Постановка реакции лейкоагглютинации. Готовят ряд (кратных двум) разведений исследуемой сыворотки (5—8 пробирок), которую предварительно инактивируют 30 мин при 56 °С. К 0,1 мл (2 капли) сыворотки добавляют по капле взвеси лейкоцитов. Пробирки интенсивно встряхивают и термостатируют в течение полутора часов при 37 °С. После извлечения из термостата пробирки центрифугируют 10 мин при 1000 об/мин. Надосадок удаляют, а к клеточному слою добавляют 2 капли 3 % уксусной кислоты для удаления примеси эритроцитов и осторожно перемешивают. Каплю клеточной взвеси помещают на предметное стекло и рассматривают под малым увеличением микроскопа.

Учет реакции проводят по двум критериям: выраженности агглютинации (интенсивная, т. е. крупные агломераты, значительная площадь свободной жидкости, — 4 плюса; выраженная агглютинация, когда наряду с агломератами лейкоцитов в жидкости можно видеть небольшое количество свободных клеток, — 3 плюса; степень агглютинации, при которой среди взвешенных клеток выявляются островки агглютинатов, — 2 плюса и слабая мелкоглыбчатая агглютинация, когда в поле зрения преобладают свободные клетки, но встречаются небольшие комочки склеившихся клеток, — 1 плюс) и величина разведения сыворотки, в которой еще отмечается агглютинация.

Возможные источники ошибок. Часто встречается неспецифическая агглютинация, особенно при крупноглыбчатой интенсивной реакции. В каждом случае необходимы контроли выделенных лейкоцитов с нормальной совместимой референтной сывороткой. Спонтанная агглютинация наблюдается при высокой концентрации в выделенном клеточном осадке нежизнеспособных лейкоцитов.

Более информативен в клинической практике учет крайних разведений сыворотки с агглютинацией.

Литература. *Лимфоциты:* выделение, фракционирование и характеристика/Под ред. Дж. Б. Натвича, П. Перлманна, Х. Вигзелля.— М.: Медицина, 1980; *Руководство по иммунологии*/Под ред. О. Е. Вязова и Ш. К. Ходжаева.— М.: Медицина, 1973; *Тодоров Йордан.* Клинические лабораторные исследования в педиатрии.— София, 1963.

6.2.4. ДНК и антитела к ДНК

Реакция пассивной гемагглютинации.
Принцип. Формализированные эритроциты барана с присоединенными к их поверхности прочной ковалентной связью ДНК агглютинируют в сывороточной среде с наличием антител к ДНК. В зависимости от конформации молекулы антигена, используемого в реакции (нативная, высокополимерная ДНК, денатурированная кипячением в стандартном солевом растворе — ССР, прогретая в присутствии формальдегида), различают 3 типа антител

к ДНК. Антитела I типа — к формализированной однополой ДНК, антитела II типа — к термоденатурированной ДНК, в которой около 60 % нуклеотидов организовано в спирализованные участки, антитела III типа — антитела к нативной высокополимерной ДНК.

Определение типов антител к ДНК более информативно в клинической практике, так как может быть использовано в целях дифференциальной диагностики.

Реактивы. 1. Препарат нативной ДНК («Реаким». Олайнский завод химреактивов. «Реанал», Венгрия). 2. Препараты ДНК с модифицированной первичной и вторичной структурой. Денатурированную ДНК получают кипячением 50—200 мкг/мл ДНК в стандартном солевом растворе (0,15 М NaCl и 0,015 М раствор трехзамещенного цитрата натрия) в течение 10 мин с последующим охлаждением в ледяной бане. Однополовую формализированную ДНК получают прогреванием раствора ДНК 400 мкг/мл 10 мин при 100 °С в присутствии 1,3 % формальдегида. Формальдегид взаимодействует с освобождающимися при денатурации аминокгруппами азотистых оснований, препятствуя восстановлению разделившихся при нагревании цепей ДНК. 3. Формализированные и танированные бараньи эритроциты. 4. Фосфатно-цитратный буфер pH 5,2.

Ход определения. В лунки полистироловых титровочных пластин разливают 0,9 мл в первую лунку, а в остальные — по 0,4 мл и добавляют 0,1 мл исследуемой сыворотки, предварительно инактивированной при 56 °С 30 мин.

Формализация бараньих эритроцитов. Эритроциты барана отделяют от фибринового сгустка и несколько раз промывают изотоническим раствором натрия хлорида (0,15 М NaCl). 12,5 % взвесь эритроцитов в изотоническом растворе pH 7,0 помещают в сосуд, в который опускают целлофановый мешок, содержащий нейтрализованный формалин, — 1/4 объема взвеси эритроцитов. Диализ проводят при 4 °С в течение 2 сут и далее при комнатной температуре в течение 2—5 сут против изотонического раствора. Взвесь эритроцитов периодически встряхивают. После окончания диализа эритроциты отмывают в 10-кратном объеме изотонического раствора хлорида натрия с повторным центрифугированием. Отмытые эритроциты суспендируют в равном объеме изотонического раствора. 50 % взвесь эритроцитов при 4 °С сохраняется в течение года.

Обработка эритроцитов танином. Обработку формализированных эритроцитов танином проводят перед их использованием. 2,5 % взвесь формализированных эритроцитов с равным объемом танина, растворенного в ССР в соотношении 1:200000. Смесь инкубируют в течение 15 мин при 37 °С, после чего эритроциты отмывают от избытка танина 10-кратным количеством ССР.

Сенсибилизация эритроцитов. Формализированные и танированные эритроциты сенсибилизируют ДНК, денатурированной в присутствии формальдегида. 2,5 % взвесь

свежетанированных эритроцитов в фосфатно-цитратном буфере pH 5,2 смешивают с равным объемом ДНК в концентрации 10—20 мкг/мл в том же буфере. Смесь выдерживают в течение 30 мин при комнатной температуре, а затем собранные центрифугированием эритроциты отмывают трехкратно ССР в разведенной в нем нормальной кроличьей сывороткой, предварительно инактивированной в соотношении 1:250. Приготовленные эритроциты хранят при 4 °С с добавлением 0,4 % раствора формальдегида в ССР с разведенной в нем кроличьей сывороткой. Срок годности — до 4 мес.

В каждом случае перед сенсибилизацией серии эритроцитов необходимо определять количество ДНК, адсорбированной на эритроцитах.

Методика постановки РПГА. Для постановки используют полистироловые пластины с лунками. В каждую лунку разливают по 0,4 мл, а в первую лунку 0,9 мл ССР и 0,1 мл исследуемой сыворотки. Пассажем из лунки в лунку равных объемов готовят двукратные разведения, после чего во все лунки добавляют по 0,05 мл 2,5 % взвеси эритроцитов, сенсибилизированных ДНК. Пластинки энергично встряхивают и оставляют при комнатной температуре на 4 ч.

Если эритроциты агглютинируют, то они равномерно устилают все дно лунки. В отсутствие агглютинации эритроциты собираются на самом дне лунки, образуя компактный диск или небольшое кольцо.

В качестве контроля одновременно с той же самой сывороткой при тех же разведениях закапывают формализированные эритроциты, не сенсибилизированные ДНК.

Клиническое значение. Выявление антител к ДНК может служить характеристикой процессов аутоиммунитета. В сочетании с определением типа антител исследователь может оценить активность репаративных процессов, способность организма к адаптивным реакциям (например, нарастание антител к ДНК I типа после оперативных вмешательств). Антитела к ДНК I типа широко встречаются как в норме, так и при различных инфекционных процессах (например туберкулезе), вирусных заболеваниях (грипп). Антитела II типа, особенно в титрах 1:160 и выше, отражают активность ревматических болезней. Антитела III типа преобладают при системной красной волчанке и служат дифференциально-диагностическим критерием.

В ряде случаев антитела к ДНК III типа можно выявить при выраженной активности хронического активного гепатита или болезни Шегрена.

Литература. Поверенный А. М. и др.— *Вопр. мед. химии*, 1966, № 12, с. 117—119. Поверенный А. М. и др.— *Вести. АМН СССР*, 1967, № 2, с. 62—64. Белокриницкий Д. В. и др.— *Вопр. ревмат.*, 1971, № 12, с. 62—65. Гольдфарб Д. М., Замчук Л. А. Антитела к нуклеиновым кислотам.— М.: Наука, 1975.

6.2.5. Ревматоидный фактор

Унифицированный метод определения реакции геммагглютинации. Принцип. Ревматоидный фактор, находящийся в сыворотке крови больных, обладает свойством агглютинировать эритроциты барана, предварительно сенсibilизированные кроличьим иммуноглобулином.

Реактивы. 1. Кроличья гемолитическая сыворотка (амбоцептор). Используют сухую или жидкую прогретую гемолитическую сыворотку с разными титрами, как готовую, так и полученную в лаборатории путем иммунизации кроликов эритроцитами барана. 2. Фосфатно-солевой буфер рН 7,4. А. Натрия фосфат однозамещенный — 24,6 г и до 1 л дистиллированной воды. Б. Натрия фосфат двузамещенный — 22,4 г и до 1 л дистиллированной воды. В. Хлорид натрия — 8,5 г и до 1 л дистиллированной воды. Перед опытом смешивают раствор А с раствором Б в отношении 1:9, рН раствора доводят до 7,4. Затем одну часть смеси добавляют к 9 частям раствора В. 3. Эритроциты барана: а) свежая дефибринированная кровь барана, срок использования до 7 дней, хранение при 2—8 °С; б) эритроциты, консервированные в растворе Олсвера; срок хранения до 2 мес при температуре 2—8 °С. 4. Раствор Олсвера: глюкоза — 20,5 г, натрия цитрат — 8 г, лимонная кислота — 0,552 г, хлорид натрия — 4,2 г, дистиллированная вода — до 1 л; рН раствора 6,1. Раствор стерилизуют дробно (кипятят на водяной бане 3 дня по 20 мин). Срок хранения до 1 мес при температуре 2—8 °С.

Ход определения. Постановке основного опыта предшествует подготовительная работа.

1. Приготовление 1 % и 25 % взвеси бараньих эритроцитов: дефибринированную кровь барана или бараньи эритроциты в растворе Олсвера центрифугируют и удаляют надосадочную жидкость. Осадок трижды отмывают 5—6 объемами изотонического раствора хлорида натрия.

200	0,5	мл гемолитической сыворотки
300	0,5	То же
400	0,5	» »
500	0,5	» »
600	0,5	» »
700	0,5	» »
800	0,5	» »
900	0,5	» »
1000	0,5	» »

Из каждой пробирки с данным разведением переносят в каждую пробирку второго ряда по 0,5 мл сыворотки, затем добавляют равный объем 1 % бараньих эритроцитов (0,5 мл). Пробирки оставляют при комнатной температуре на 15 мин, затем встряхивают и оставляют на 2 ч при 4 °С, после чего учитывают результат. Агглютинационным титром гемолитической сыворотки считается наибольшее ее разведение, при котором происходит агглютинация на 1+.

Для постановки основного опыта используют кроличью гемолитическую сыворотку в разведе-

Надосадочная жидкость при последнем промывании должна быть бесцветной. Из плотного осадка готовят 1 % и 25 % взвесь эритроцитов в фосфатно-солевом буфере рН 7,4.

2. Обработка исследуемой сыворотки: кровь, взятую из локтевой вены больных в количестве 2—3 мл, ставят на 1 ч в термостат. Затем сыворотку отделяют от сгустка (центрифугируют 20 мин при 1000 об/мин, отсасывают надосадочный слой) и инактивируют в водяной бане при 56 °С в течение 30 мин. Хилезные и гемолизированные сыворотки непригодны для исследования.

3. Разведение сывороток: сыворотки больных разводят фосфатно-солевым буфером рН 7,4 в соотношении 1:5 (0,2 мл сыворотки и 0,8 мл буфера).

4. Адсорбция исследуемой сыворотки: проводят с целью устранения гетероагглютининов. 1 мл 25 % взвеси эритроцитов барана центрифугируют 15 мин при 1000 об/мин. Надосадочную жидкость удаляют и к осадку добавляют 0,75 мл исследуемой сыворотки, предварительно разведенной в фосфатно-солевом буфере в соотношении 1:5. Пробирки со смесью встряхивают и оставляют при комнатной температуре на 1 ч, а затем на 1 ч в холодильнике при 4 °С. После этого центрифугируют 15 мин при 1000 об/мин и осторожно сливают находящуюся сверху надосадочную жидкость. Далее эту надосадочную жидкость, которая является сывороткой в разведении 1:5, используют для приготовления разведений при постановке реакции геммагглютинации в основном опыте.

5. Титрование кроличьей гипериммунной сыворотки (амбоцептор): проводят для определения ее агглютинирующей способности к бараньим эритроцитам. Готовят серию разведений амбоцептора в фосфатно-солевом буфере. Для этого первоначально готовят разведение сыворотки 1:100 (0,1 мл сыворотки и 9,9 мл фосфатно-солевого буфера) и из него готовят дальнейшие разведения:

1:100 + 0,5	мл фосфатно-солевого буфера
1:100+1,0	То же
1:100+1,5	» »
1:100+2,0	» »
1:100+2,5	» »
1:100+3,0	» »
1:100+3,5	» »
1:100+4,0	» »
1:100 + 4,5	» »

нии 1:4 от концентрации конечного разведения сыворотки, давшего положительную реакцию агглютинации.

6. Приготовление сенсibilизированных эритроцитов: к разведенной кроличьей сыворотке прибавляют равный объем 1 % эритроцитов барана. После тщательного встряхивания смесь оставляют при комнатной температуре на 15 мин; так как при добавлении кроличьей иммунной сыворотки взвесь эритроцитов разводится вдвое, то конечная ее концентрация 0,5 % и ее используют для основной реакции.

Таблица 42. Схема реакции

	№ пробирки											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
Разведение 1	5	10	20	40	80	160	320	640	1280	2560	—	0,2
Сыворотка 1:5, мл	0,2	0,2	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Фосфатно-солевой буфер, мл	—	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	—
Из каждой пробирки, начиная со 2-й, последовательно переносят по 0,2 мл в следующую пробирку; из 10-й пробирки 0,2 мл выливают												
0,5 % взвесь сенсibilизированных эритроцитов, мл	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	—
0,5 % взвесь несенсибилизированных эритроцитов, мл	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0,2

Основной опыт (титрование исследуемых сывороток). 1. Готовят последовательные двойные разведения исследуемой сыворотки фосфатно-солевым буфером в объеме 0,2 мл, учитывая исходное разведение 1,5.

2. В каждую пробирку вносят по 0,2 мл 0,5 % сенсibilизированных бараньих эритроцитов. Разведения, схему реакции см. в табл. 42.

3. Таким же образом для контроля ставят реакцию с сывороткой клинически здорового человека и с сывороткой больного с известным высоким титром.

4. Пробирки встряхивают и помещают в холодильник при 4 °С на 18 ч. На другой день оставляют их на полчаса при комнатной температуре и макроскопически учитывают наличие агглютинации. Для обозначения интенсивности агглютинации пользуются системой четырех плюсов. В реакции гемагглютинации определяется конечное разведение исследуемой сыворотки, дающее положительный результат агглютинации на 1+.

Нормальные величины. Наличие агглютинации до титра 1:20 считается нормой. Реакция с титром 1:40 и выше — положительная.

Источники ошибок. 1. Плохая консервация эритроцитов барана.

2. Несоблюдение правил при сенсibilизации эритроцитов.

3. Неполная инактивация исследуемой сыворотки.

Литература. *Иммунохимический анализ*. Под ред. Л. А. Зильбера. — М., 1968; *Методические указания по применению унифицированных клинических лабораторных методов исследований*. — М., 1973, с. 149—153.

Унифицированный метод определения ревматоидного фактора в сыворотке крови капелльной латекс-глобулиновой пробой (латекс-тест в модификации Сперанского). Принцип. Ревматоидный фактор, находящийся в сыворотке больных, обладает свойством вступать в реакцию преципитации с инактивированным человеческим гамма-глобулином, адсорбированным на нейтральных частицах латекса.

Реактивы 1. Латекс СКИ-3 — полистироловые частицы величиной 0,8 мкм. Срок хранения 1 год. Диагностикум латексовый для обнаружения ревматоидного фактора (каунасское предприятие бактериальных препаратов). 2. Гамма-глобулин (готовый препарат 10 % гамма-глобулина). Хранить при 2—8 °С. 3. Глициново-боратный буфер: борная кислота — 3,1 г, глицин — 7 г, хлорид натрия — 8,5 г, дистиллированная вода — до 1 л; рН 8,2. Хранить в холодильнике при 2—8 °С. Срок хранения 1 мес.

Ход определения. Постановке основного опыта предшествует подготовительная работа.

1. Приготовление латекс-глобулинового реагента: 10 % готовый препарат гамма-глобулина инактивируют при 60 °С 15 мин или при 56 °С 30 мин. Затем разводят изотоническим раствором натрия хлорида до 1 % концентрации (1 мл 10% гамма-глобулина и 9 мл изотонического раствора).

Латекс разводят в дистиллированной воде из расчета 1:30 (1 мл латекса и 29 мл дистиллированной воды). Полученную взвесь тщательно взбалтывают. К 30 мл суспензии латекса добавляют 24 мл прогретого и разведенного 1 % гамма-глобулина (5 мл латекса и 4 мл гамма-глобулина).

Суспензию латекса и гамма-глобулина тщательно смешивают перевертыванием пробирки и оставляют в термостате при температуре 37 °С в течение 30 мин, периодически перемешивая. Затем добавляют 3 мл раствора человеческого альбумина (100 мг сухого альбумина растворяют в 10 мл изотонического раствора хлорида натрия), оставляют на 30 мин при комнатной температуре и на 18 ч в холодильнике, после чего смесь фильтруют через тонкий слой гигроскопической ваты и суспензия готова.

2. Обработка исследуемой сыворотки: кровь, взятую из пальца или из локтевой вены больных в количестве не менее 1 мл, ставят на 1 ч в термостат. Затем сыворотку отделяют от сгустка, центрифугируют 20 мин при 1000 об/мин, осторожно отсасывают сыворотку и инактивируют ее на водяной бане 56 °С в течение 30 мин. Хилезные, гемолизированные и проросшие сыворотки непригодны для использования.

Ход определения. Сыворотку исследуемого больного разводят в 20 раз глициново-боратным буфером (0,1 мл цельной сыворотки и 1,9 мл буфера). 0,2 мл разведенной сыворотки наносят на предметное стекло и добавляют пастеровской пипеткой 1 каплю латекс-глобулинового реагента (сенсibilизированной суспензией латекса). После тщательного перемешивания стеклянной палочкой смесь оставляют на 3 мин, затем осторожно покачивают стекло в течение 10—15 с. Окончательный результат учитывают через 5—6 мин в проходящем свете от настольной лампы.

Параллельно проводят исследование суспензии латекса со стандартной положительной и отрицательной сыворотками для контроля годности реагентов.

При количественной постановке пробы готовят различные разведения сыворотки— 1:20, 1:40, 1:80 и далее. Пробу ставят указанным выше способом.

Оценка результатов реакции. Реакцию считают положительной, если наблюдается агглютинация частиц латекса. Величину реакции учитывают в плюсах: 4 плюса — все частицы агглютинированы, раствор прозрачен; 3 плюса — 1/4 частиц агглютинированы, раствор прозрачен по краю; 2 плюса — 1/2 частиц агглютинирована, раствор мутноватый; 1 плюс — слабая агглютинация, раствор мутный.

Норма. Проба положительная при титре 1:20. При положительном результате в более высоких титрах оценка производится согласно титру.

Источники ошибок. 1. Потеря преципитирующей способности частиц при длительном их хранении. 2. Испортившаяся при долгом или неправильном хранении контрольная сыворотка. 3. Грязная, плохо обезжиренная посуда.

Клиническое значение. Ревматоидный фактор выявляется часто при ревматоидном артрите. Величина титра коррелирует с активностью процесса. В то же время отсутствие ревматоидного фактора в сыворотке не может служить основанием для изменения клинического предположения. Существуют серонегативные формы ревматоидного артрита. «Ревматоидная активность» фактора может быть секвестрирована в иммунных комплексах и быть выявлена после их диссоциации.

Ревматоидный фактор (факторы) может быть выявлен и при других заболеваниях. В высоких титрах он встречается при хроническом активном гепатите, болезни Шегрена, в 30 % случаев подострого бактериального эндокардита, при системных заболеваниях соединительной ткани. Наличие ревматоидного фактора даже в низких титрах может быть информативным при диагностике латентных форм ревматического процесса.

Литература. *Механизмы иммунопатологии*/Под ред. С. Колна, П. А. Уорда, Р. Т. Мак-Класки.— М.: Медицина, 1983; *Сперанский А. И.*— В кн.: Материалы докладов на научной сессии, посвященной десятилетию Института ревматизма АМН СССР. М., 1968, с. 75; *Цончев В., Попов П., Коларов С., Каракашова А.* Лабораторная диагностика ревматических заболеваний.— София, 1964.

6.3. РЕАКЦИЯ ИММУННОГО ЛИЗИСА

6.3.1. Гемолитическая активность комплемента

Унифицированный метод определения гемолитической активности комплемента по 50 % гемолизу. Принцип. Комплемент, содержащийся в исследуемой сыворотке, вызывает гемолиз сенсibilизированных бараньих эритроцитов в присутствии сыворотки кролика, иммунизированного бараньими эритроцитами (гемолитическая сыворотка).

Активность комплемента выражают в гемолитических единицах. За одну 50 % гемолитическую единицу комплемента (C_{50}) принимают такое его количество, которое вызывает гемолиз 50 % 0,5 мл стандартной суспензии сенсibilизированных эритроцитов при 37 °С за 45 мин. Эта единица условная, величина ее зависит от

концентрации бараньих эритроцитов, количества антител, использованных для сенсibilизации, величины рН, ионной силы системы. В связи с тем что присоединение к иммунному комплексу первого компонента комплемента не происходит в отсутствие Ca^{++} , а для присоединения 4-го компонента (следующего за активацией C1) необходимо наличие Mg^{++} , важно строго соблюдать концентрацию этих веществ в буферных растворах. Необходимо стандартизировать время реакции, температуру.

Реактивы. 1. Гемолитическая сыворотка (гемолизин). Выпускаются стандартные серии препарата в ампулах с титром гемолитической сыворотки, указанным на этикетке. Такие сыворотки имеют длительный срок годности при

комплемента в зависимости от его количества выявило сигмовидный характер кривой корреляции, причем полный гемолиз наступает в широкой зоне верхней части кривой, когда сенсibilизированные эритроциты малочувствительны к количественному возрастанию комплемента.

хранении при температуре 2—8 °С. 2. Эритроциты барана. 3. Веронал-мединаловый буфер. Состав буфера (в граммах): 85 — NaCl; 5,75 — веронал; 3,75 — медиал; 0,22 — CaCl₂·2H₂O; 1 — Mg₃Cl₂·6H₂O; pH 7,3—7,8 (6,75 г веронала растворяют в 500 мл горячей дистиллированной воды, смесь охлаждают до +20 °С, добавляют другие компоненты и доводят дистиллированной водой до объема 2 л. Буфер хранят при температуре 3—5 °С).

Ход определения. Постановке основного опыта предшествует подготовительная работа.

1. Приготовление буфера: в день постановки опыта к одной части буферного раствора добавить 4 части дистиллированной воды. Разведенный буферный раствор пригоден в течение 12 ч.

2. Обработка исследуемой сыворотки больного: кровь, взятую из вены больного в количестве 2—3 мл, оставляют на 2 ч при комнатной температуре, затем центрифугируют 10—15 мин при 1500 об/мин. Сыворотку осторожно отсасывают и исследование проводят в тот же день.

Приготовление гемолитической системы. Приготовление 3 % взвеси бараньих эритроцитов: дефибринированную кровь барана отмывают 3 раза 5—10-кратными объемами изотонического раствора хлорида натрия, который после третьего отмывания должен быть бесцветным. Из плотного осадка эритроцитов готовят 3 % (по объему) взвесь в изотоническом растворе.

Стандартизация взвеси эритроцитов барана. Густота взвеси эритроцитов барана оказывает значительное влияние на титр комплемента и поэтому имеет существенное значение. Наиболее точным методом стандартизации эритроцитов является фотометрирование. Используют для этой цели ФЭК М-56.

Методика. За 15—20 мин до начала исследования включают ФЭК и устанавливают зеленый светофильтр; 1 мл 3 % взвеси отмыханных бараньих эритроцитов добавляют в пробирку к 9 мл дистиллированной воды, полученную лизированную кровь вливают в 10-миллиметровую кювету, в другие две кюветы (такого же объема) наливают растворитель, т. е. смесь из 1 мл изотонического раствора и 9 мл дистиллированной воды.

В левый кюветдержатель ставят кювету с растворителем, в правый — кювету с лизированной кровью. Величину оптической плотности раствора отсчитывают по правой части барабана. Определенной концентрации эритроцитов соответствует определенный показатель шкалы оптической плотности. Если 3 % взвесь бараньих эритроцитов приготовлена правильно, то шкала оптической плотности показывает 0,4.

Если показатель оптической плотности менее 0,4, то к приготовленной взвеси следует добавить соответствующее графику количество эритроцитов. Если же показатель оптической плотности выше 0,4, то к приготовленной взвеси бараньих эритроцитов следует прибавить соответствующее количество изотонического раствора хлорида натрия (рис. 9).

После приготовления 3 % взвеси эритроцитов готовят гемолитическую сыворотку.

Разведение гемолитической сыворотки. Перед опытом ампулу вскрывают, содержащийся в ней лиофильный препарат разводят стерильным изотоническим раствором хлорида натрия согласно инструкции. Гемолитическую сыворотку берут в разведении, которое в 3 раза превышает ее исходную концентрацию. Так, если титр гемолитической сыворотки равен 1:1200, готовят разведение 1:400. Исходя из необходимого для постановки реакции объема гемолитической системы, отмеривают нужное количество гемолитической сыворотки. После этого ампулу запаивают и остаток гемолитической сыворотки сохраняют до следующего опыта в холодильнике при 4—8 °С. Только после приготовления 3 % взвеси бараньих эритроцитов и разведения по титру гемолитической сыворотки можно приступить к приготовлению гемолитической системы.

Гемолитическая система — это смесь равных объемов разведенной по трехкратному титру гемолитической сыворотки и 3 % взвеси бараньих эритроцитов от объема плотного осадка (100 мл 3 % взвеси и 100 мл разведенной гемолитической сыворотки: 0,1 мл гемолитической сыворотки и 99,9 мл изотонического раствора хлорида натрия).

Смешивание гемолитической сыворотки (0,1 мл и 99,9 мл изотонического раствора натрия хлорида) с эритроцитами производят по возможности быстро, причем гемолитическую сыворотку примешивают к взвеси эритроцитов, а не наоборот. Смесь выдерживают при 37 °С в термостате 30 мин для сенсibilизации эритроцитов.

Титрование комплемента. Исследуемую сыворотку, разведенную 1:10 буферным раствором, разливают в 2 пробирки: 0,1 и 0,25 мл. Разлитую сыворотку (1:10) доводят веронал-мединаловым буфером до объема 1,5 мл. Затем в каждую пробирку прибавляют 1,5 мл стандартизированной гемолитической системы.

Одновременно с опытными пробирками ставят контроль на отсутствие гемолиза сенсibilизированных эритроцитов: 1,5 мл гемолитической системы и 1,5 мл веронал-мединалового буфера. Пробирки встряхивают и помещают в термостат при 37 °С на 45 мин. После инкубации их охлаждают в холодильнике при 2—4 °С в течение 18—19 ч. На следующий день проводят фотометрирование надосадочной жидкости из каждой пробирки (против изотонического раствора хлорида натрия или дистиллированной воды в контрольной кювете колориметра).

Для учета степени гемолиза необходимо использовать шкалу стандартных разведений лизированных эритроцитов по А. П. Конникову, которую готовят для каждой партии эритроцитов и гемолитической сыворотки, как указано на с. 286.

Для вычисления 50 % единицы гемолиза строят калибровочную кривую. Контролем служит оптическая плотность пробирки № 4 из шкалы Конникова, которая соответствует 50 %

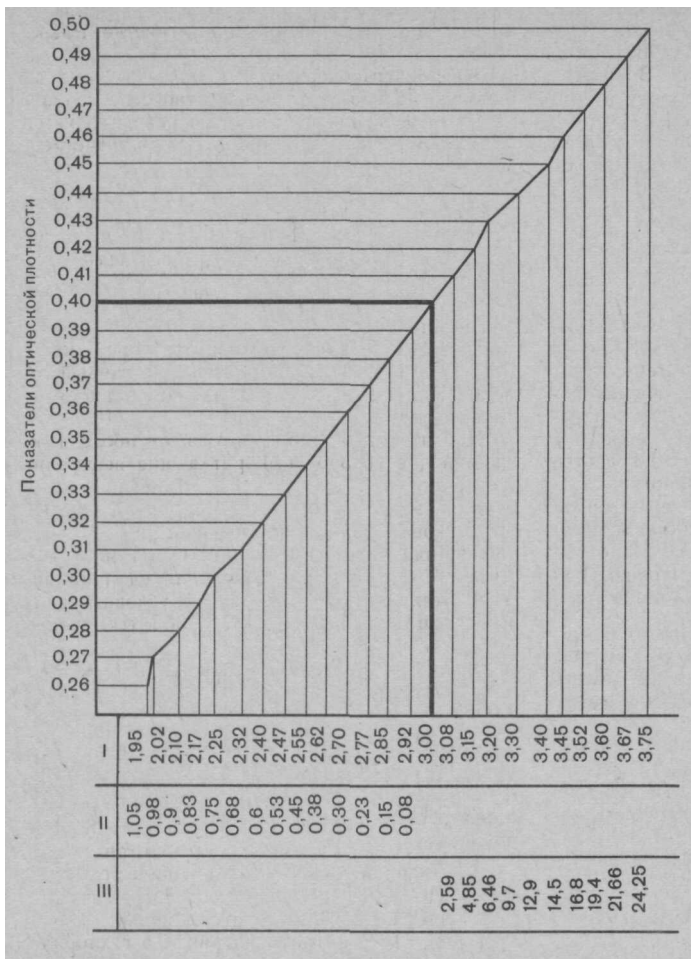


Рис. 9. Кривая стандартизации взвеси бараньих эритроцитов по ФЭК-М. Кювета 10 мл. Светофильтр зеленый. I — взвесь бараньих эритроцитов (%); II — бараньи эритроциты (мл), которые нужно добавить к 100 мл взвеси, чтобы получить 3 % взвесь; III — изотонический раствор хлорида натрия (мл), который нужно добавить к 100 мл взвеси, чтобы получить 3 % взвесь.

гемолizu. На оси ординат откладывают величину оптической плотности, измеренной на ФЭКе, как контроля, так и исследуемого материала, и проводят горизонталь, параллельную оси абсцисс, до пересечения с перпендикулярами, восстановленными на оси абсцисс в соответствующих 0,1 и 0,25 разведениях сыворотки.

Пример: пробирка из шкалы Конникова № 4, отражающая 50 % гемолizu, соответствует показаниям ФЭК-13.

Результаты исследования: фотометрирование первой пробирки, которая содержит 0,1 мл сыворотки, показывает 0,07; второй пробирки, содержащей 0,25 мл, — 0,12. Соединяют эти две точки и линию соединения продолжают до пересечения с линией 50 % гемолizu. Из точки пересечения опускают перпендикуляр на линию абсцисс, где отмечены показания разведения сыворотки (например 0,25).

Расчет ведут по формуле: 0,25 мл (1:10): $C_{H50} = 1 \text{ мл} : x$.

$$x = \frac{1 \cdot 1}{0,25} = \frac{100}{25} = 4 C_{H50}$$

В связи с тем что 0,25 мл — это испытуемая сыворотка, разведенная 1:10, результат надо умножить на 10, т. е. в 1 мл исследуемой сыворотки будет 40 C_{H50} . В сыворотках здоровых доноров обычно содержится 20–40 гемолитических единиц компонента. Уровень компонента у женщин ниже, чем у мужчин, в пределах 10 %.

	№ пробирки					
	1	2	3	4	5	6
Гемологическая система разведения вдвое, мл	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7
Дистиллированная вода, мл	0,8	0,7	0,6	0,5	0,4	0,3
Гемолиз, %	20	30	40	50	60	70

Литература. *Иммунохимический анализ/Под ред. Л. А. Зильбера.*— М., 1968; *Лабораторная иммунология/Под ред. О. Б. Вязова.*— М., 1967; *Резникова Л. С.* Комплемент и его значение в иммунологических реакциях.— М., 1967; *Бойд У.* Основы иммунологии.— М.: Мир, 1969; *Kabat E., Mayer M.* Experimental Immunochimistry. 2 ed., 1964.

6.3.2. Антистрептолизин-О

Унифицированный метод определения в сыворотке крови. П р и н ц и п. Если исследуемая сыворотка содержит антитела к антигену стрептококка — стрептолизину-О, то добавление последнего к сыворотке способствует специфическому связыванию антител и отмене феномена гемолиза эритроцитов, добавленных в качестве индикатора реакции к той же сыворотке.

Посуда и оборудование. 1. Термостат на 37 °С. 2. Пробирки химические. 3. Штативы.

Реактивы. 1. Препарат стрептолизина-О (предприятие по производству бактериологических препаратов Ленинградского научно-исследовательского института вакцин и сывороток). 2. Фосфатный буфер рН 6,5—6,7. На 1 л дистиллированной воды добавляют 7,4 г $\text{NaH}(\text{PO}_4)_2$; 3,17 г K_2HPO_4 ; 1,81 г $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ и NaOH до рН 6,5—6,7. Хранить буфер в рефрижераторе при температуре от 3 до 8 °С. 3. Взвес эритроцитов: дефибринированную или взятую с цитратом натрия кровь кролика или человека (любой группы) наливают в центрифужные пробирки, отмечают уровень крови, центрифугируют и удаляют надосадочную жидкость. Эритроциты трехкратно промывают 0,85 % раствором NaCl , добавляют до метки 0,85 % раствор NaCl , взвес тщательно размешивают и к 5 мл такой взвеси добавляют 95 мл фосфатного буфера рН 6,5—6,7. Взвес эритроцитов готовят в день постановки опыта.

4. Сыворотка больных: кровь, взятую из пальца или локтевой вены в количестве не менее 0,5 мл, ставят на 15 мин в термостат при 37 °С, а затем в холодильник. Через 2—24 ч стояния при температуре от 3 до 8 °С сыворотку отделяют от сгустка, прогревают при 56 °С в течение 30 мин и используют для титрования антител. Хилезные, гемолизированные и проросшие сыворотки непригодны для титрования. При титровании антител можно использовать сыворотку или кровь, смешанную с растворителем.

Ход определения. 1. Разведением сывороток. Сыворотки больных разводят фосфатным буфером рН 6,5—6,7. А. 1:50—0,1 мл сыворотки плюс 4,9 мл буфера. Б. 1:250—0,5 мл из разведения 1:50 плюс 2 мл буфера. В. 1:1000—0,5 мл из разведения 1:250 плюс 1,5 мл буфера.

2. Приготовление стрептолизина-О. Высушенный лиофильным методом стрептолизин-О непосредственно перед добавлением в пробирку осторожно, не вспенивая, растворяют в фосфатном буфере, рН 6,7—6,5, ис-

ходя из данных, указанных на этикетке. Разведенный таким образом препарат стрептолизин-О должен содержать в объеме 0,3 мл одну рабочую дозу, т. е. то количество стрептолизина-О, которое почти полностью нейтрализуется половиной международной единицы антистрептолизина-О стандарта ГИСК.

3. Титрование антител. Разведенную сыворотку или разведенную надосадочную жидкость из крови в растворителе и другие ингредиенты разливают по пробиркам, как это указано в табл. 43.

Результаты титрования обозначают: плюс (+) — положительная реакция — отсутствие гемолиза, в осадке эритроциты; плюс-минус (±) — сомнительная реакция — частичный гемолиз; минус (—) — отрицательная реакция — полный гемолиз.

При чтении реакции учитывают последнюю пробирку, в которой сыворотка еще нейтрализует рабочую дозу стрептолизина-О (0,3 мл). Гемолиз эритроцитов в этой пробирке должен отсутствовать. Титр сыворотки выражают числом единиц антистрептолизина-О в 1 мл.

АЕСТ-О — интернациональная единица антистрептолизина-О — равна двум условным единицам антистрептолизина-О, принятым ранее в Советском Союзе.

В табл. 43 приведено число АЕСТ-О в 1 мл при нейтрализации стрептолизина-О различными разведениями сыворотки.

4. Контроль. Пробирки № 12 и 13 служат для контроля эритроцитов и стрептолизина-О. Эритроциты не должны при учете реакции быть гемолизированы. Стрептолизин-О в дозе 0,3 мл рабочего разведения должен вызывать полный гемолиз 0,2 мл 5 % взвеси эритроцитов.

Унифицированный метод определения в малом объеме крови. П р и н ц и п тот же.

Реактивы. Растворитель крови: 2,05 г глюкозы, 0,16 г цитрата натрия, 0,5 г хлорида натрия, до 100 мл дистиллированной воды, рН 6,1—6,3.

После автоклавирования к растворителю добавляют мертиолат натрия до концентрации 1:20000, затем равномерно разливают в стерильных условиях по пробиркам и сохраняют в холодильнике (при температуре от 4 до 8 °С).

Ход определения. Кровь в количестве 0,3 мл, взятую из пальца, смешивают с 2,7 мл растворителя (на 0,5 мл крови 4,5 мл растворителя). После тщательного перемешивания разведенную в растворителе кровь помещают в холодильник. На следующий день форменные элементы крови (осадок) удаляют центрифугированием, надосадочную жидкость пастеровской пипеткой отсасывают в другую пробирку, прогревают при 56 °С в течение 30 мин, затем пробирки плотно закрывают резиновыми пробками и сохраняют в холодильнике до проведения опыта. Определение антител в малом объеме крови может быть произведено после длительного хранения (в течение 25 дней) крови, разведенной в растворителе.

Разведение надосадочной жидкости, полученной из крови в растворителе. Все разведения надосадочной жидкости, полученной из крови,

Таблица 43. Схема титрования антистрептолизина-О в сыворотках

Разведение сыворотки	1:50			1:250						1:1000		Контроль			
	№ пробирки													эритроцитов	стрептолизина-О
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13		
Доза сыворотки, мл Фосфатный буфер рН 6,5—6,7, мл Стрептолизин-О, мл	0,4	0,2	0,15	0,1	0,4	0,3	0,25	0,2	0,1	0,25	0,15	—	—		
	0,1	0,3	0,35	0,4	0,1	0,2	0,25	0,3	0,4	0,25	0,35	0,8	0,5		
	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	—	0,3		
5 % взвесь эритроцитов, мл	Термостат, 15 мин при 37 °С														
	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2		
	Термостат, 1 ч при 37 °С														
Число интернациональных единиц в 1 мл	63	125	165	250	313	413	500	625	1250	2000	3000	Контроль			

предварительно смешанной с растворителем, делают на фосфатном буфере рН 6,5—6,7. Исходное разведение крови в растворителе 1:10 соответствует разведению сыворотки 1:20. Исходя из этого, из надосадочной жидкости готовят следующие разведения.

А. 1:50 — 1 мл надосадочной жидкости и 1,5 мл буфера.

Б. 1:250 — 0,5 мл надосадочной жидкости, разведенной 1:50, и № мл буфера.

В. 1:1000 — 0,5 мл надосадочной жидкости, разведенной 1:50, и 1 мл буфера.

Разведенную надосадочную жидкость из крови в растворителе и другие ингредиенты разливают по пробиркам, как это указано в табл. 43.

Клиническое значение. Титр антистрептолизина-О до 250 АЕСТ-О в 1 мл обнаруживается у практически здоровых лиц (титры антистрептолизина-О приведены в интернациональных единицах). В связи с этим титр антител до 250 в 1 мл следует считать в пределах нормы. Повышенные титры антистрептолизина-О обнаруживаются при ряде стрептококковых инфекций (скарлатина, ангина, хронический тонзиллит, ревматизм, гломерулонефрит и др.). Повышение титра этих антител является показателем перенесенной стрептококковой инфекции. Особенно высокие титров достигают эти антитела при ревматизме и нефрите. Характерной особенностью этих двух заболеваний является обнаружение антистрептолизина-О в высоких титрах (500 АЕСТ-О и выше) с первых дней заболевания, что может быть использовано в качестве вспомогательного метода диагностики.

Определение антистрептолизина-О имеет особенно большое значение при дифференциации ревматизма от ревматоидного артрита, так как при последнем эти антитела, как правило, обнаруживаются в низких титрах.

Определение антистрептолизина-О может быть использовано для выявления скрыто протекающих форм ревматизма, а также для оценки степени активности ревматического процесса. Определение антистрептолизина-О у больных с целью диагностики ревматизма рекомендуется производить параллельно определению титра антигиалуронидазы. Обычно у больных ревматизмом антигиалуронидаза обнаруживается в высоких титрах (1000 единиц и больше) чаще, чем высокие титры антистрептолизина-О. Однако в некоторых редких случаях, при низких титрах антигиалуронидазы, обнаруживаются высокие титры антистрептолизина-О.

Литература. Анохин В. Н., Черкасова В. Л.— Лаб. дело, 1964, № 7, с. 406; Лямперт И. М. Серологические методы исследования.— М., 1962: МРТУ-42-139-66. Наставление по применению сухого препарата стрептолизина-О для определения антистрептолизина-О в сыворотках больных.— М., 1973.

6.3.3. Антигиалуронидаза

Унифицированный метод определения в сыворотке крови. Принцип. Специфические антитела сыворотки больного вступают в реак-

цию с вносимым в нее антигеном — ферментом гиалуронидазой и ингибируют ее активность, что проявляется в сохранении сгустка муцина, образованного гиалуроновой кислотой в кислой среде.

Посуда и оборудование. 1. Термостат на 37 °С. 2. Пробирки химические. 3. Штативы.

Реактивы. 1. Препарат (лиофилизированный) стрептококковый гиалуронидазы (производства Института эпидемиологии и микробиологии им. Н. Ф. Гамалеи АМН СССР).

2. Гиалуроновая кислота. Для приготовления гиалуроновой кислоты используют пупочные канатики новорожденных. Освобожденные от сосудов канатики измельчают до кашецеобразного состояния, взвешивают, заливают двойным объемом дистиллированной воды и помещают на 2—10 ч в холодильник при 3 °С. После этого смесь нагревают, доводят до кипения, фильтруют через стеклянную вату и сохраняют при температуре 3 °С.

При титровании антигиалуронидазы в крови больных рекомендуется использовать раствор гиалуроновой кислоты с относительной вязкостью, равной 3. С этой целью сопоставляют время истечения дистиллированной воды и раствора гиалуроновой кислоты при температуре 36—37 °С в вискозиметре Оствальда. Расчет относительной вязкости раствора гиалуроновой кислоты производят следующим образом. Например, время истечения гиалуроновой кислоты равно 27 с, а время истечения воды — 9 с, следовательно, относительная вязкость раствора гиалуроновой кислоты равна 3 (27:9). В том случае, если эта величина больше 3, следует раствор развести дистиллированной водой до нужной вязкости и в качестве рабочей дозы взять 0,3 мл.

При отсутствии вискозиметра Оствальда за рабочую дозу гиалуроновой кислоты принимают ту дозу, которая при подкислении жидкости уксусной кислотой образует отчетливый сгусток при полном просветлении среды. Рабочая доза гиалуроновой кислоты обычно равна 0,3 мл. В том случае, если рабочая доза гиалуроновой кислоты больше 0,3 мл, она не может быть применена для титрования гиалуронидазы. Определение рабочей дозы гиалуроновой кислоты следует производить перед каждым титрованием гиалуронидазы. При использовании гиалуроновой кислоты, вязкость которой неизвестна, необходимо в каждом опыте в качестве контроля титровать сыворотку с известным титром антигиалуронидазы.

Приготовление 15 % раствора уксусной кислоты: 15 мл ледяной уксусной кислоты х. ч. прибавляют к 85 мл дистиллированной воды.

Ход определения. Обработка сыворотки больных и крови с растворителем. При титровании антител можно использовать сыворотку или кровь, смешанную с растворителем.

А. Сыворотка больных: кровь, взятую из пальца или из локтевой вены в количестве не менее 0,5 мл, ставят на 15 мин в термостат, а затем в холодильник. Через 2—4 ч стояния при температуре от 3 до 8 °С сыворотку отделяют от сгуст-

ка, прогревают при 56 °С в течение 30 мин и используют для титрования антител. Хилезные, гемолизированные и проросшие сыворотки непригодны для титрования.

Разведение сывороток. Сыворотки больных разводят 0,85 % раствором хлорида натрия: 1) 1:50—0,1 мл сыворотки и 4,9 мл 0,85 % хлорида натрия; 2) 1:250—0,5 мл сыворотки, разведенной 1:50; и 2 мл 0,85% хлорида натрия; 3) 1:1000—0,5 мл сыворотки, разведенной 1:250; и 1,5 мл 0,85 % хлорида натрия.

Б. Кровь с растворителем: для приготовления растворителя крови к 100 мл дистиллированной воды добавляют 2,05 г глюкозы, 0,16 г нитрата натрия и 0,5 г хлорида натрия рН 6,1—6,3. После автоклавирования к растворителю крови добавляют мертиолат до концентрации 1:20 000, затем равномерно в стерильных условиях разливают по пробиркам и сохраняют в холодильнике при температуре от 4 до 10 °С.

Кровь в количестве 0,3 мл, взятую из пальца, смешивают с 2,7 мл растворителя (на 0,5 мл крови 4,5 мл растворителя). После тщательного перемешивания разведенную растворителем кровь помещают в холодильник. На следующий день форменные элементы крови (осадок) удаляют центрифугированием, надосадочную жидкость пастеровской пипеткой отсасывают в другую пробирку, прогревают при 56 °С в течение 30 мин, затем пробирки плотно закрывают резиновыми пробками и сохраняют в холодильнике до проведения опыта. Определение антител в малом объеме крови может быть произведено после длительного хранения (в течение 25 дней) крови, разведенной растворителем.

Разведения надосадочной жидкости, полученной из крови с растворителем. Все разведения надосадочной жидкости, полученной из крови, предварительно смешанной с растворителем, делают на 0,85 % растворе хлорида натрия. Исходное разведение крови в растворителе 1:10 соответствует разведению сыворотки 1:20.

Исходя из этого, из надосадочной жидкости готовят следующие разведения:

- а) 1:50—1 мл надосадочной жидкости и 1,5 мл 0,85 % хлорида натрия;
- б) 1:250—0,5 мл надосадочной жидкости, разведенной 1:50; и 2 мл 0,85 % хлорида натрия;
- в) 1:1000—0,5 мл надосадочной жидкости, разведенной 1:250; и 1,5 мл 0,85% хлорида натрия.

Приготовление раствора стрептококковой гиалуронидазы: высушенный лиофильным методом препарат стрептококковой гиалуронидазы перед добавлением в пробирки растворяют в изотоническом растворе натрия хлорида, как это указано на этикетке. Разведенный таким образом препарат должен содержать в объеме 0,2 мл одну опытную дозу, т. е. то количество гиалуронидазы, которое нейтрализуется одной единицей рабочего стандарта антигиалуронидазы ГКИ.

Титрование антител. Разведенную сыворотку или разведенную надосадочную жидкость из крови в растворителе и другие ингредиенты разливают по пробиркам (табл. 44).

Примечание. Общий объем ингредиентов в пробирке равен 1 мл, он складывается из

Таблица 44. Схема титрования антигиалуронидазы в сыворотках или в надосадочной жидкости

	Разведение сывороток или надосадочной жидкости										Контроль гиалуронидазы	Контроль гиалуроново́й кислоты	
	1:50			1:250			1:1000						
	№ пробирки												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Количество сыворотки или надосадочной жидкости	0,4	0,2	0,15	0,1	0,4	0,3	0,25	0,2	0,1	0,25	0,15	—	—
0,85% раствор NaCl Одна опытная доза гиалуронидазы	До общего объема 1 мл В объеме 0,2 мл в каждую пробирку, кроме пробирки № 13												
Гиалуроно́вая кислота	Термостат, 37 °С — 30 мин По одной рабочей дозе в каждую пробирку												
Уксусная кислота	Термостат, 37 °С — 30 мин Холодильник +3 °С — 10 мин												
Число АЕHyS в 1 мл	125	250	330	500	625	825	1000	1250	2500	4000	600	Контроль	

количества сыворотки больного, гиалуронидазы, гиалуроново́й кислоты и 0,85 % раствора NaCl.

Результаты титрования обозначают: плюс (+) — положительная реакция — сгусток и просветление среды; плюс и минус (±) — сомнительная реакция — хлопья и нити; минус (—) — отрицательная реакция — мутная среда без сгустка.

Титр сыворотки выражают числом единиц антигиалуронидазы (АЕHyS) в 1 мл сыворотки.

За 1 АЕHyS принимают то минимальное количество сыворотки, которое нейтрализует одну опытную дозу гиалуронидазы.

В табл. 44 приведено число АЕHyS в 1 мл при нейтрализации стрептококковой гиалуронидазы различными разведениями сыворотки.

Контроль. 1. Пробирки № 12, 13 служат для контроля гиалуроново́й кислоты и гиалуронидазы. Гиалуроно́вая кислота при учете реакции при подкислении уксусной кислотой должна образовать полный сгусток. Гиалуронидаза должна разрушать гиалуроново́ую кислоту, которая при этом теряет способность образовывать сгусток при добавлении уксусной кислоты.

2. Для контроля условий опыта используют эталон стрептококковой антигиалуронидазы, 2 ампулы которой вложены в коробку со стрептококковой гиалуронидазой.

Содержимое ампулы с эталоном разводят 1:50, растворяя его в 10 мл изотонического раствора, и титруют одновременно с сыворотками больных (см. табл. 44). Результаты титрования сывороток могут быть учтены, если титр эталона соответствует указанному на этикетке или откло-

няется на ± одно разведение. В последующих опытах при отсутствии эталона для контроля можно использовать одну из сывороток больных, титр которой был установлен по эталону.

Унифицированный метод определения в малом объеме крови. Принцип тот же.

Реактивы. Растворитель (модифицированный раствор Олсвера — Эйсли): глюкоза — 2,05 г, нитрат натрия — 0,16 г, хлорид натрия — 0,5 г, дистиллированная вода — 100 мл, pH 6,1. Раствор автоклавируют, добавляют мертиолат (1:20000) и разливают в пробирки.

Обработка крови больных. Определенный объем цельной крови больных, взятой из пальца пипеткой, смешивают с растворителем (на 0,1 мл крови 0,9 мл растворителя). После тщательного перемешивания смесь помещают в холодильник при 5—10 °С. На следующий день ее центрифугируют и удаляют осадок. Надосадочную жидкость прогревают при 56 °С в течение 30 мин.

Исходное разведение крови в растворителе 1:10 соответствует разведению сыворотки 1:20. Дальнейшее разведение сыворотки делают на изотоническом растворе хлорида натрия (см. раздел «Разведение сывороток»).

Определение антигиалуронидазы — см. табл. 44.

Оценка полученных результатов. Титр антигиалуронидазы до 300 единиц (АЕHyS) обнаруживают у практически здоровых людей. Активность фермента, не превышающая эти цифры, считается нормой.

Клиническое значение. Определенные титра антигиалуронидазы широко используют в диагностике ревматического процесса. Количественная характеристика антител — их титр — служит критерием активности ревматического процесса. Однако, оценивая этот показатель, необходимо всегда помнить, что уровень антител в крови пациента прямо указывает на состояние иммунореактивных систем и косвенно — на активность патологического процесса. У больных ревматизмом титры антигиалуронидазы достигают 1000 единиц и более. Данные литературы, а также опыт работы лаборатории иммунологии I ММИ им. Сеченова указывают, что высокие ревматизмом с высокими функциональными показателями иммунокомпетентных систем хорошо поддаются терапии. Высокие титры противострептококковых антител и в большей степени антигиалуронидазы у больных ревматизмом могут служить показанием к назначе-

нию умеренных доз стероидных гормонов. В трудных дифференциально-диагностических случаях, когда необходимо оценить характер лихорадки у больных ревматизмом, значительное повышение титров антигиалуронидазы позволяет врачу склониться в пользу активации ревматизма и применить соответствующую терапевтическую тактику.

Литература. *Иоффе В. И.* Иммунология ревматизма.— Л., 1962; *Лямперт И. М.* Серологические методы исследования.— М., 1962; *МРТУ-42* № 136-66 на стрептококковую гиалуронидазу. *Наставление* по применению стрептококковой гиалуронидазы для определения антигиалуронидазы в сыворотках больных.— М., 1966; *Сачков В. И., Кузнецова Н. И., Анохин В. Н., Токмачев Ю. К.* Иммунологические методы изучения реактивности при ревматизме.— В кн.: Вопросы ревматизма. М.: Медгиз, 1961, с. 34—48.

6.4. РЕАКЦИИ ПРЕЦИПАЦИИ

6.4.1. С-реактивный белок

Унифицированный метод кольцепреципитации в капиллярах. Принцип. Сыворотка крови, эксудат или асцитическая жидкость, содержащие белок острой фазы — С-реактивный протеин, образуют хлопьевидный преципитат при взаимодействии со специфической преципитирующей иммунной сывороткой к этому антигену.

Приборы и оборудование. 1. Стеклообразные капилляры (комплектуются в наборе с антисывороткой). 2. Штатив — брусок пластилина.

Реактивы. Антисыворотка к С-реактивному белку (предприятие по производству бактериальных препаратов Московского научно-исследовательского института вакцин и сывороток им. И. И. Мечникова).

Исследуемый материал. Сыворотку крови получают обычным путем из 0,5 мл крови. Можно набирать в отдельный капилляр из пальца или уха и отслоившуюся сыворотку отламывать, отбрасывая оставшиеся в другом конце капилляра форменные элементы. Подобный метод мы рекомендуем для получения сыворотки из малых объемов крови при радиальной иммунодиффузии, иммуноэлектрофорезе, методе Оухтерлони и других методах с необходимым объемом исследуемого материала 2—5 мкл. Серозную цереброспинальную жидкость набирают предварительно в пробирку, а из нее в капилляр. Необходимо следить, чтобы жидкость была прозрачной, без примеси крови.

Ход определения. *Постановка реакции.* Стеклообразный капилляр берут посередине двумя пальцами и, держа под углом 40—45°, опускают концом во флакон с антисывороткой, набирая ее на 1/3 длины капилляра (3 см). Капилляр протирают ватой и опускают тем же

концом в исследуемую сыворотку или серозную жидкость (последние набирают также на 1/3 длины капилляра — 3 см).

Капилляр протирают ватой (при заполнении капилляра не должно быть воздуха между реагентами). Затем капилляр, заполненный на 1/3 длины, покачивают, перемещая жидкость от одного его конца к другому, вследствие чего реагенты перемешиваются (необходимо произвести 10—12 таких перемещений жидкости).

Перед установлением капилляра в штатив следует наклонить его с тем, чтобы конец, через который набирали сыворотку, был свободен на 15 мм. Затем этот конец капилляра погружают в пластилин так, чтобы уровень жидкости в нем был выше поверхности пластилина на 10 мм (сыворотка находится на воздушном столбике). Чтобы не вылить содержимое капилляра при фиксации, его следует держать горизонтально, а штатив вертикально. Реакция проходит при комнатной температуре. Предварительный учет результата реакции производят через 4 ч, после чего капилляр со штативом оставляют на сутки при комнатной температуре или ставят на то же время в холодильный шкаф (температура от 2 до 8 °С).

Через 24 ч производят окончательный учет результата реакции. Выпадение преципитата (хлопья, осадок) в капилляре указывает на наличие С-реактивного белка в исследуемой сыворотке или серозной жидкости.

Оценка реакции. Наличие преципитата в капилляре высотой 1 мм оценивают одним (+) крестом — реакция слабоположительная; преципитат высотой 2 и 3 мм оценивают соответственно двумя (++) и тремя (+++) крестами — реакция положительная; преципитат высотой 4 мм и более оценивают четырьмя (++++) крестами — реакция резко положительная (количество преципитата учитывают по всему капилляру).

Клиническое значение. Белок острой фазы неспецифичен для какого-либо определенного заболевания, но характерен для острого воспалительного процесса и может служить признаком активности.

6.4.2. Циркулирующие иммунные комплексы

Метод преципитации с 3,5 % раствором полиэтиленгликоля ПЭГ-тест ОП280. Принцип. Раствор полиэтиленгликоля (ПЭГ) способен осаждать из сыворотки агрегированные иммунные глобулины и иммунные комплексы. Изменение плотности раствора регистрируется на спектрофотометре при длине волны 250 нм.

Различные концентрации ПЭГ (2,5; 3,5; 7 и даже 10 %) вызывают преципитацию различных по молекулярной массе и размерам иммунных комплексов. Низкие концентрации ПЭГ осаждают комплексы крупных размеров, высокие концентрации вызывают преципитацию низкомолекулярных соединений, 3,5 % ПЭГ флокулирует наиболее распространенные «промежуточные» комплексы средних размеров.

Посуда и оборудование. 1. Пробирки химические и центрифужные. 2. Пипетки. 3. Центрифуга высокооборотная с ускорением не менее 2000 г. 4. Спектрофотометр.

Реактивы. 1. Буфер боратный 0,1 М, рН 8,4. 2. Полиэтиленгликоль (мол. м. 6000).

Ход определения. Готовят 7 % раствор полиэтиленгликоля на 0,1 М боратном буфере рН 8,4. 200 мкл исследуемой сыворотки смешивают с 5 мл боратного буфера указанной концентрации; 4 мл этой смеси приливают к 4 мл 7 % раствора полиэтиленгликоля (конечная концентрация 3,5 %). Пробирку ставят в холодильник при 4 °С на 18–20 ч. После инкубации смесь центрифугируют при 2000 г 10 мин. Надосадочную жидкость удаляют. Преципитат дважды отмывают 3,5 % раствором ПЭГ и растворяют затем в 5 мл 0,1 н. раствора едкого натра.

Уровень циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК) измеряют на спектрофотометре при 280 нм и выражают в единицах оптической плотности.

Учитывают только те показатели, которые превышают величину $X + 2S$ здоровых лиц.

6.4.3. Иммунные глобулины

Одномерная радиальная иммунодиффузия в агаровом геле для определения иммуноглобулинов. Принцип. Антиген, внесенный в лунку агарового слоя, содержащего специфические антитела, диффундируя в агаре, образует кольцо преципитации. Диаметр колец увеличивается до тех пор, пока весь внесенный в лунку антиген не будет связан содержащимися в геле антителами. Величина преципитата отражает количество антител в геле, эквивалентное концентрации антигена, внесенного в лунку. Площадь

преципитата, или квадрат диаметра кольца, прямо пропорциональна количеству внесенного в лунку антигена и обратно пропорциональна концентрации антител в агаре. При этом между концентрацией испытуемого антигена и площадью преципитата имеется линейная зависимость. Как показали исследования Mancini и соавт., прямая пропорциональность между площадью преципитата (или квадратом диаметра) и концентрацией антигена устанавливается лишь после прекращения роста колец. Это время различно для разных антигенов и зависит от их молекулярной массы. Так, при одной и той же концентрации рост колец преципитации прекращается для белков Бенс-Джонса через 24 ч, IgG — через неделю, а IgM — через 10 дней.

Уже через 1 ч после начала диффузии можно получить линейную зависимость между диаметром колец преципитации и логарифмом концентрации. Fahey и McKelvey (1965) предложили односуточную инкубацию. В этом случае линейная зависимость устанавливается лишь в небольшом диапазоне концентраций.

Однако использование односуточной инкубации более удобно в практической работе. Поэтому все дальнейшее описание метода радиальной иммунодиффузии относится к этому варианту.

Приборы и оборудование. 1. Стекла 9 X 12 см. 2. П-образная рамка 120 X 90 X 8 мм и толщиной 1 мм для облегчения заливки стекла агаром (при определенном навыке агар можно заливать непосредственно на стекло). 3. Водяная баня на 50–60 °С. 4. Автоматическая пипетка вместимостью 2 мкл или пастеровские пипетки с оттянутым концом. 5. Влажная камера. 6. Измеритель. 7. Миллиметровая линейка.

Реактивы. 1. Моноспецифические сыворотки к иммуноглобулинам А, М и G (выпускают в СССР, ИЭМ им. Н. Ф. Гамалеи, ИЭМ в г. Горьком и Институте биологических препаратов им. И. И. Мечникова, Москва). 2. 3 % агар «Дифко» (США) или «Серва» (ФРГ), дальневосточный агар, предварительно очищенный в 0,2 М вероналовом буфере, рН 8,56. Навеску 3 г сухого очищенного агара заливают 50 мл дистиллированной воды и ставят на небольшой огонь, постоянно помешивая в течение 40 мин, затем добавляют 50 мл 0,2 М вероналового буфера рН 8,56 и доводят на огне до полного растворения агара (не доводить до кипения!). Добавляют 2 мл 1 % раствора мертиолата. 3. Вероналовый буфер 0,2 М, рН 8,56 (5,52 г веронала растворяют в 300 мл дистиллированной воды, постоянно перемешивая при нагревании, добавляют 35,04 г медиалата; дистиллированную воду добавляют до 1 л при охлаждении раствора до 20 °С). 4. Окрашивающая жидкость: амидо-черный — 1 г, ледяная уксусная кислота — 100 мл, дистиллированная вода — до 1000 мл. Профильровать. 5. Отмывающая жидкость: ледяная уксусная кислота — 70 мл, дистиллированная вода — до 1000 мл.

См. с. 298.

Ход определения. Техника постановки опыта. Титрование антисыворотки и выбор рабочего разведения. Берут две стеклянные пластины 9X12 см, одна из которых смазана гидрофобной жидкостью (например, ГК.Ж-94), другая — тонким слоем агара (каплю горячего агара растирают на пластине пипеткой, а пластину прогревают над пламенем). Между этими пластинами устанавливают П-образную рамку толщиной 1 мм и всю систему скрепляют зажимами. Готовят ряд разведений антисывороток на 0,1 М веронал-мединаловом буфере, рН 8,6. Так, для исследования сывороточных иммуноглобулинов разведения выпускаемых в настоящее время антисывороток могут колебаться от 1/10 до 1/60.

Пробирки, содержащие по 1 мл каждого разведения антисыворотки, помещают в водяную баню при 56 °С и добавляют в них по 1 мл растопленного и охлажденного до 56 °С 3 % агара¹. Смесь агара и антисыворотки хорошо перемешивают и быстро выливают в пространство между пластинами, держа последние под углом так, чтобы в них не попали пузырьки воздуха. Начинают с большего разведения антисыворотки, добавляя каждое последующее разведение после застывания предыдущего. На пластине можно разместить 4 ряда смеси агара с антисывороткой в объеме 2 мл каждое. После застывания последнего ряда агара снимают зажимы, рамку и пластинку, смазанную гидрофобной жидкостью. В каждом ряду, соответствующем разведению антисыворотки, пробойником делают лунки, куда с помощью микрошприца добавляют разведения стандартного препарата в объеме 2 мкл. Через сутки инкубации при 1 °С, оценивают результаты. Рабочим разведением антисыворотки для каждой системы (для исследования сывороток, секретов и др.) нужно считать максимальное разведение антисыворотки, дающее со стандартом четкие кольца precipitation, интенсивность которых достаточна для их измерения.

Количественное определение иммуноглобулинов в испытуемых препаратах. Растопленный и нагретый до 56 °С 3 % агар в объеме 4 мл смешивают с равным объемом антисыворотки, разведенной веронал-мединаловым буфером 0,1 М до 1/2 рабочего разведения. Эту смесь в объеме 8 мл заливают в пространство между двумя пластинами, как описано выше (см. «Титрование антисывороток»). Пластины с залитой смесью оставляют на 10 мин при комнатной температуре. После застывания смеси агара с антисывороткой снимают зажимы, рамку и пластину, смазанную гидрофобной жидкостью. На каждой пластине пробойником делают 35 лунок диаметром 2 мм

на расстоянии 15 мм друг от друга. Для того чтобы предотвратить деформацию периферических колец, особенно IgM, за счет подсыхания агара и появления эндоосмотических потоков делают по периметру агара дополнительные лунки. Готовят разведения стандарта, меняя пипетки после каждого разведения. Для исследования сывороточных иммуноглобулинов используют стандартную сыворотку (см. ниже), неразведенную и разведенную до 1:2—1:8. В лунки микрошприцем вносят по 2 мкл каждого разведения и испытуемых препаратов. Пластины помещают во влажную камеру и инкубируют сутки при 4 °С. Через 24 ч (ровно!) пластины погружают в забуференный изотонический раствор натрия хлорида и отмывают от несвязавшихся белков в течение 2 сут с трехкратной сменой буфера. Затем пластины сушат под фильтровальной бумагой и окрашивают амидо-черным. Учет результатов возможен в неокрашенных пластинах на темном поле с косым освещением, при этом используют для измерения препаратометр с нониусом, позволяющим измерить диаметр с точностью до 0,1 мм.

Определив диаметр колец precipitation в стандартном препарате с известным уровнем иммуноглобулинов, строят кривую на полулогарифмической бумаге, где на оси ординат откладывают концентрацию иммуноглобулинов, а на оси абсцисс — диаметр колец. Такую кривую строят для каждой пластины. Далее, измерив диаметр колец в испытуемом препарате, определяют по стандартной кривой концентрацию иммуноглобулинов в этом препарате.

Чувствительность метода. Чувствительность метода характеризуется тем минимальным количеством антигена, который достаточен для образования измеримого диска precipitation. Это количество различно для разных белков и зависит от молекулярной массы антигена. По данным Манчини, для альбумина таким пределом является 1,25 мкг/мл. По данным Е. В. Чернохвостовой, при использовании варианта с одноступенчатой инкубацией предельной концентрацией для IgQ и IgA является 40—50 мкг/мл, для IgM — 150 мкг/мл. Вместе с тем пределы чувствительности метода радиальной иммунодиффузии в геле можно расширить, увеличивая диаметр колец precipitation. С этой целью можно пользоваться вместо агара 0,8 % агарозой или ацетат-целлюлозой. Наиболее простым и распространенным методом является разведение антисыворотки, поскольку при разведении антисыворотки увеличивается площадь геля, содержащего антитела, которые необходимы для связывания данного количества антигена, т. е. увеличивается размер precipitation.

Разведение антисыворотки	Диаметр колец исследуемого препарата, мм.
1: 4	9,3
1: 8	10,1
1: 16	11,2

¹ Приведена концентрация, пригодная для большинства серий агара. Для разных серий необходимая концентрация агара устанавливается эмпирически.

Таблица 45. Содержание иммуноглобулинов в стандартных препаратах ВОЗ и Института эпидемиологии и микробиологии им. Н. Ф. Гамалеи АМН СССР

	IgG		IgM		IgA	
	МЕ/мл	мг/мл ¹	МЕ/мл	мг/мл ¹	МЕ/мл	мг/мл ¹
ВОЗ (67/97)	96,2	8,04	93,5	1,42	96,2	0,85
Институт им. Гамалея ²	143,5	11,52	126,6	1,8	144,0	1,2

¹ Уровень иммуноглобулинов в весовых единицах — средний уровень, полученный в 10 лабораториях с разными реферанс-антигенами.

² Уровень иммуноглобулинов в стандарте Института им. Н. Ф. Гамалеи получен при сравнении со стандартом ВОЗ.

Однако с разведением антисыворотки уменьшается плотность преципитата и необходимы дополнительные изменения методики для того, чтобы этот преципитат можно было измерить. Так, можно усилить интенсивность колец окрашиванием их амидо-черным или нигрозином с леядной уксусной кислотой. Плотность преципитата можно повысить также с помощью ряда копреципитирующих факторов. Например, нормальная кроличья сыворотка, используемая вместо буфера для разведения антисыворотки, будет включаться в комплекс антиген — антитело, усиливая плотность преципитата. Аналогичный эффект оказывает дополнительная обработка пластин антиглобулиновой сывороткой: пластины после инкубации и отмывки погружают в раствор антисыворотки, содержащей антитела к глобулину сыворотки, включенной в агар; спустя сутки кольца преципитации можно увидеть в неокрашенных пластинах.

Наиболее эффективным способом повышения чувствительности метода радиальной иммунодиффузии является использование меченой ¹³¹I антисыворотки. В этом случае агар можно смешивать с антисывороткой, меченой ¹³¹I в таком разведении, что кольца преципитации визуально не обнаруживаются, учет результатов возможен лишь при автордиографии. Возможна и другая модификация этого метода — обычная постановка радиальной иммунодиффузии со столь высокими разведениями антисыворотки, что кольца преципитации визуально не выявляются. Последующая обработка такой пластины, меченой ¹³¹I антисывороткой к глобулину сыворотки, включенной в агар, и автордиография повышают чувствительность реакции в 32—64 раза.

Воспроизводимость метода радиальной иммунодиффузии определяется длительностью инкубации и наклоном стандартной кривой. Если результаты учитывают после прекращения роста колец, когда между всеми концентрациями антигена и площадью соответствующих им преципитатов устанавливается линейная зависимость, то ошибка метода составляет 2 %. При более короткой инкубации, когда линейная зависимость между концентрацией антигена и диаметром колец устанавливается лишь в небольшом диапазоне концентраций,

ошибка метода увеличивается до 10 %. При этом в зависимости от природы антигена и концентрации антисыворотки меняется наклон стандартной кривой, что также отражается на воспроизводимости метода. При определении IgM, дающего наименьшие кольца преципитации и наиболее крутую стандартную кривую по сравнению с другими иммуноглобулинами, ошибка определения составляет 13 %, а при определении IgG — 10 %.

Стандарт и требования к нему. Одним из важных условий количественного определения иммуноглобулинов является правильный выбор стандарта, по которому строится калибровочная кривая. Такой стандарт должен быть единым, чтобы можно было сравнивать результаты, полученные в разных лабораториях.

Использование очищенных иммуноглобулинов в качестве такого референс-препарата нецелесообразно, во-первых, потому, что очищенные белки менее стабильны при хранении и, во-вторых, потому, что при выделении иммуноглобулинов возможны изменения их структуры (расщепление, агрегирование и т. п.) и, следовательно, антигенных и диффузионных свойств. Нежелательно также использовать в качестве стандарта сыворотки больших паразитогенемических ретикулезам, так как содержащиеся в таких сыворотках IgG и IgM структурно отличаются от нормальных иммуноглобулинов. Наиболее целесообразно использовать в качестве стандарта нормальную человеческую сыворотку или плазму.

Отделение биологической стандартизации Национального института по медицинским исследованиям в Лондоне выпустило такой стандарт. Он представляет собой плазму 465 здоровых взрослых мужчин-доноров, проживающих в Англии. Часть этого препарата была использована ВОЗ как международный стандарт иммуноглобулинов G, A, M человека.

В СССР стандартная сыворотка для количественного определения иммуноглобулинов методом радиальной иммунодиффузии выпускается Институтом эпидемиологии и микробиологии им. Н. Ф. Гамалеи (Москва) и Горьковским институтом эпидемиологии и микробиологии (табл. 45, 46).

Т а б л и ц а 46. Содержание иммуноглобулинов в сыворотке здоровых людей в зависимости от возраста, мг/100 мл

Иммуноглобулин	Колебание показателей	1—15	16	4—6	7—12	13—	24—	4—5	6—8	9—11	12—	Взрослые
		сут	сут — 3 мес	мес	мес	24 мес	36 мес	лет	лет	лет	16 лет	
IgG	Верхний предел	1268	656	693	1199	1250	1185	1418	1432	4746	1432	1637
	Среднее геометрическое	852	390	392	638	789	822	883	967	945	944	1086
	Нижний предел	572	232	222	339	498	570	550	653	625	604	720
IgM	Верхний предел		69	151	161	205	207	280	313	461	469	538
	Среднее геометрическое		23	71	77	85	124	143	182	218	258	321
	Нижний предел		8	33	37	35	74	73	106	103	142	192
IgA	Верхний предел	94	107	150	157	188	128	138	164	143	160	182
	Среднее геометрическое	11	49	85	95	92	80	84	102	93	91	106
	Нижний предел	1	22	49	58	47	49	51	63	61	51	61

Выпускаемые стандарты следует использовать как референс-препараты для калибровки собственного рабочего стандарта, в качестве которого может быть использована любая смесь свежих сывороток от здоровых доноров. Рабочий стандарт следует сохранять при низкой температуре (-20°C и ниже) либо в лиофилизированном состоянии.

К л и н и ч е с к о е з н а ч е н и е. Относительная простота исполнения, доступность реактивов способствовали широкому внедрению метода в клиническую практику. Однако данные литературы и наш собственный опыт работы этим методом с сыворотками самых различных больных в течение более 10 лет позволяют рекомендовать ограничение применения этого метода довольно узким спектром нозологических форм. В первую очередь речь идет о диагностике заболеваний, сопровождающихся синтезом моноклоновых парапротеинов. Метод радиальной иммунодиффузии выступает в данной ситуации скрининговым методом, представляющим патологическую сыворотку для детального анализа в иммуноэлектрофорезе и др. Высокая диагностическая информативность метода в оценке первичных и вторичных иммунодефицитов, проявляющихся блокированием синтеза или врожденным отсутствием отдельных классов иммуноглобулинов или их всех — тип Брютона. Высокое содержание сывороточных иммуноглобулинов А, М, G наблюдается при системной красной волчанке, болезни Шегрена, хроническом активном гепатите, ювенильном ревматоидном артрите. Причину повышения уровня иммуноглобулинов отдельных классов в каждом конкретном случае необходимо анализировать отдельно и редко можно связать с определенным заболеванием; например, повышение уровня IgA патогномично для особой формы геморрагического нефрита, при поражениях печени алкогольной природы, неспецифическом язвенном колите. Высокие значения IgM характерны для ревматоидного артрита, особенно в начальном, трудном для диагностики, периоде заболевания, при обострении системной красной волчанки.

При некоторых заболеваниях повышение уровня IgM сопутствует хронизации процесса. Уровень сывороточного IgG колеблется в очень широких пределах при разных заболеваниях. Повышение его чаще сопутствует активности процесса. В клинической практике интерпретация результатов исследования иммуноглобулинов должна осуществляться в комплексе с клиническими данными, результатами других иммунологических показателей.

Определение иммуноглобулинов в других, нежели сыворотка, биологических жидкостях имеет большую диагностическую информативность. Уровень иммуноглобулинов мочи позволяет быть более объективным в оценке активности почечного процесса и глубины поражения клубочкового аппарата. Появление IgM в моче крайне редко и наблюдалось только в тяжелых случаях волчаночной нефропатии и при амилоидозе. Содержание иммуноглобулинов в бронхоальвеолярной жидкости при фиброзирующем альвеолите коррелирует с глубиной морфологических изменений альвеолярной мембраны. Уровень IgG в желчи позволяет дифференцировать воспалительные заболевания желчевыводящих путей. Большую роль в диагностике заболеваний женской половой сферы, изучении причин бесплодия играет характеристика иммуноглобулинов в шеечном секрете (шеечный фактор).

Л и т е р а т у р а. Малкина Л. А., Шаханина К. Л.— Журн. микробиол., 1975, № 3, с. 33; Стефани Д. В. Иммунология детского возраста.— м., 1981; Черновостова Е. В. Количественное определение иммуноглобулинов методом радиальной иммунодиффузии в геле: Методические рекомендации.— М., 1975; Fahey I., McKelvey E. J. Immunology, 1965, vol. 94, p. 84—102.

6.4.4. Альфа-фетопротейн

Двухмерная иммунодиффузия в геле.
Принцип и возможности метода.
Исследуемые объекты, содержащие антигены и ан-

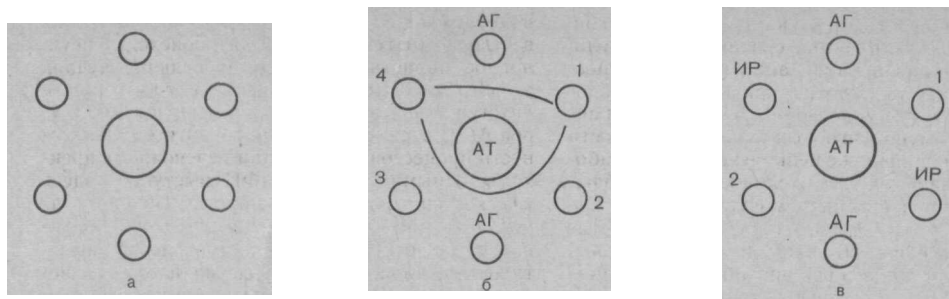


Рис. 10. Схема постановки метода двойной диффузии в геле для определения а-фетопротейна. а - схема стандартного штампа: диаметр периферических лунок 4 мм, радиус центральной лунки 9 мм; б - типы реакций; в - схема постановки опыта; АТ - кроличья моноспецифическая антисыворотка против а-фетопротейна человека; АГ - а-фетопротейн; 1,2,3,4 - испытуемые сыворотки; ИР - изотонический раствор хлорида натрия.

титела, помещенные в гель, диффундируют в его толще и, взаимодействуя друг с другом, образуют в зоне эквивалентных количественных соотношений преципитаты (рис. 10).

Метод обладает высокой специфичностью, чувствительностью и разрешающей способностью. Простота исполнения метода позволяет воспроизвести его в любых лабораториях. Двухмерная иммунодиффузия в геле позволяет не только и (учитывая композицию биологических материалов, ни и качественно и количественно охарактеризовать примеси в высокоочищенных (с химической точки зрения) препаратах. Используя возможности качественного анализа метода, можно выявить минимальные антигенные различия двух сравниваемых систем (например, появление в сыворотке или экскретатах больных белков с измененными антигенными свойствами). Характеризуя количественные стороны компонентов системы, метод позволяет произвести расчеты эквивалентных соотношений антигена и антител, без чего невозможен квалифицированный анализ специфически взаимодействующих белковых компонентов во всех методах, в основе которых лежит феномен преципитации: от одномерной диффузии в геле до радиоиммунологического анализа.

Определение антигена первичного рака печени и тератобластом в сыворотке и асцитической жидкости. П р и н ц и п. Моноспецифическая антисыворотка, помещенная в лунку агарового геля, диффундирует в нем. При наличии в исследуемой сыворотке или асцитической жидкости специфического эмбрионального антигена альфа-фетопротейна АФ11 - маркера первичного (но не вторичного или метастатического) рака печени или тератобластомы, он (антиген) образует в зоне эквивалентных количеств четкий преципитат с антителами антисыворотки.

Приборы и оборудование. Стандартный набор иммунодиагностикума (ИЭМ им. Н. Ф. Гамалеи, Москва) в комплекте со штампом для пробивания лунок.

Реактивы. 1. Агар (очищенный и готовый к употреблению). 2. 0,85 % раствор хлорида натрия, забуференный вероналовым буфером (на 85 мл изотонического раствора хлорида натрия 15 мл буфера, pH 8,4-8,6) - до pH 7,0-7,2 с консервантом (мертиолат 1:10000).

Ход определения. Подготовка иммунодиагностикума: содержимое ампул растворяют в изотоническом растворе хлорида натрия (объем растворителя указан на этикетке ампулы). Получают слегка опалесцирующий раствор.

Постановка и учет реакции. Чистую стеклянную камеру подсушивают, проводят ее несколько раз над пламенем горелки, и помещают на горизонтальную поверхность. В камеру заливают 23 мл расплавленного 1 % прозрачного агара Дифко на изотоническом растворе хлорида натрия pH 7,0-7,2, с мертиолатом 1:10 000 и закрывают покровным стеклом. Через 30-40 мин в застывшем агаре просекают контуры лунок стандартным штампом. Агаровые пробки отсасывают с помощью трубки, диаметр которой на 2,5-3 мм меньше диаметра трубок штампа, и получают лунки с ровными краями. В каждой камере можно отштамповать 6 фигур и провести анализ 12 испытуемых сывороток.

В центральную лунку фигуры заливают АТ, а в две периферические, противоположные друг другу, лунки - АТ иммунодиагностикума. Оставшиеся четыре боковые лунки заливают испытуемыми сыворотками и изотоническим раствором хлорида натрия. Реагенты вносят капиллярами в лунки вровень с поверхностью агара.

После заполнения лунок реагентами плексигласовую поверхность камеры смазывают тонким слоем технического вазелина, камеру закрывают стеклянной пластинкой и оставляют при комнатной температуре на 24-48 ч. Перед регистрацией результатов открытую камеру рекомендуется поместить на 1 ч в 10 % раствор NaCl. Такая обработка способствует исчезновению непрозрачных ореолов вокруг лунок с испытуемыми сыворотками, затрудняющих учет результатов.

Результаты реакции оценивают по плюсовой шкале. Реакцию считают положительной, если линия преципитации иммунодиагностикума сливается с линией преципитации, образованной антигеном испытуемой сыворотки и антителами иммунодиагностикума. В зависимости от места слияния полос реакцию считают: слабоположительной (+), если слияние полос наблюдается у лунки с испытуемой сывороткой. Содержание альфа-фетопротеина в сыворотке больного меньше 50 мкг/мл; положительной (++) , если линии преципитации иммунодиагностикума и испытуемой сыворотки находятся на одинаковом расстоянии от центральной лунки. Содержание альфа-фетопротеина в сыворотке больного 50 мкг/мл; резко положительной (+++), если линия преципитации испытуемой сыворотки диффузна и сдвинута в сторону центральной лунки, а линия преципитации иммунодиагностикума резко загибается вместе слияния с линией преципитации сыворотки больного. В некоторых случаях, когда реакция идет в сильном избытке антигена, содержащегося в испытуемой сыворотке, линия преципитации этого антигена с антисывороткой не образуется, а линия преципитации иммунодиагностикума резко обрывается. При таком типе реакции содержание альфа-фетопротеина в сыворотке больного больше 50 мкг/мл. В этих случаях необходимо повторно поставить реакцию с разведенной испытуемой сывороткой и установить идентичность выявляемого антигена альфа-фетопротеину иммунодиагностикума; отрицательной (—), если линия преципитации иммунодиагностикума достигает своими концами лунок с испытуемыми сыворотками, так же как и лунка с изотоническим раствором хлорида натрия.

Диагностическими считают все три описанных типа положительных реакций.

В редких случаях сыворотки больных дают неспецифическую реакцию с компонентами иммунодиагностикума. Как правило, это широкий диффузный преципитат, который образуется при взаимодействии испытуемой сыворотки как с антисывороткой, так и с антигеном иммунодиагностикума. Принципиальное отличие неспецифической реакции от специфической заключается в том, что образующийся преципитат никак не связан со специфической линией преципитации иммунодиагностикума: он либо пересекает специфическую линию преципитации, либо образуется независимо от нее. При обработке 10 % раствором NaCl неспецифический преципитат исчезает совсем или заметно ослабляется.

Клиническое значение. Выявление альфа-фетопротеина — высокоинформативный тест в диагностике гепатом. Он позволяет также дифференцировать первичные и вторичные гепатомы, установить этиологическую причину опухоли яичка. Однако в определенных ситуациях антиген может появляться в сыворотке или других биологических жидкостях вне связи с гепатомой или тератобластомой. АФП нередко и в высоких титрах может быть обнаружен при остром гепатите А. Но при этом заболевании повторные исследования выявляют нарастание

и последующее снижение (!) уровня антигена в отличие от гепатомы, когда происходит неуклонное нарастание титров. В редких случаях острого алкогольного гепатита можно выявить антиген. В подобных ситуациях нарастание титров АФП отражает, по всей вероятности, активность процессов регенерации печеночной паренхимы. Иными словами, АФП выступает здесь как косвенный признак цирротической перестройки органа. Наличие антигена в околоплодных водах беременных — достоверный признак тяжелого врожденного уродства плода, позволяющий рекомендовать прерывание беременности. Появление альфа-фетопротеина в сыворотке беременных женщин во II и III триместре — физиологическое явление: проникновение эмбрионального антигена в кровотоки беременной.

Приведенные факты свидетельствуют о необходимости повторных исследований материала при выявлении АФП.

Литература. *Абелев Г. И.* и соавт.— Биохимия, 1963, т. 28, № 4, с. 625—634; *Абелев Г. И.* и соавт.— Бюл. exper. биол. мед., 1971, № 76, с. 475; *Наставление* по применению иммунодиагностикума для первичного рака печени (ПРП) и тератобластом (ТБ).— М., 1977; *Татаринев Ю. С.*— Вопр. мед. химии, 1964, т. 10, № 1, с. 90—91.

6.4.5. Парапротенины

Иммуноэлектрофоретический анализ.

Принцип. Белки исследуемой биологической среды, предварительно разделенные в электрическом поле в соответствии с электрическим зарядом и подвижностью, зависящей от величины заряда, градиента потенциала и свойств среды-носителя, проявляются в реакции преципитации с антисывороткой, содержащей специфические антитела к исследуемым антигенам.

Метод обладает высокой разрешающей способностью, несложен в исполнении. Он позволяет получить представление об относительной концентрации компонентов в системе, определить индивидуальный антиген, не выделяя его из смеси. Изменение физических свойств одного из компонентов, ведущих к отклонениям в иммунологической специфичности, как это наблюдается при гаммапатиях, четко выявляется при использовании иммуноэлектрофоретического анализа.

Посуда и оборудование. 1. Прибор для электрофореза ПЭФ-3, выпускаемый заводом «Физприбор» в г. Фрунзе, или для иммуноэлектрофореза УЭФ, выпускаемый экспериментальными мастерскими Института физиологии им. А. Богомольца в г. Киеве. 2. Стекла 9X 12 см. 3. Пробойник лунок диаметром 1,5 мм. 4. Нож для прорезания траншей в агаре. 5. Водяная баня. 6. Эксикатор. 7. Бачки для окрашивания стекол с агаром и для последующего отмывания.

Реактивы. 1. Агар-агар. 2. Вероналовый буфер 0,05 М, рН 8,6, ионная сила 0,1 (0,05 М раствор вероната натрия, 0,01 М раствор дигидрофосфата калия, 0,05 М раствор

ацетата натрия). 3. Краситель (амидо-черный или кислотный сине-черный). Антисыворотки: а) поливалентная к сывороточным белкам человека; б) моноспецифические антисыворотки к различным классам иммуноглобулинов; в) антисыворотки к легким цепям типа каппа (κ) и лямбда (λ). Все перечисленные сыворотки выпускаются в СССР.

Ход исследования. I. Приготовление агар: предпочтительнее использовать готовый к употреблению очищенный и лиофилизированный бактоагар фирмы «Дифко» (США) или «Серва» (ФРГ). Если таковых нет, можно с успехом применять дальневосточный агар-агар (зарубежные авторы рекомендуют аналогичный дальневосточному японский агар-агар) после предварительной обработки.

Предлагаем несколько способов очистки агара.

Способ Клаузена [Clausen, 1970]. Агар предварительно отмывают в проточной водопроводной воде. После этого набухший агар, отжатый от излишков воды, растворяют при 90 °С в дистиллированной воде, добавленной из расчета 10 % (по массе или объему) раствора. К раствору добавляют безводный хлорид кальция из расчета 10 г на 100 г агара для осаждения примесей. Горячий агар фильтруют через капроновое сито или фильтр со стекловатой. После застывания его режут на маленькие блоки и помещают в широкий сосуд, закрытый капроновой сеткой, и ставят на 3 дня под проточную водопроводную воду, а затем в течение 2 дней промывают дистиллированной водой, 5 раз меняя воду, взятую в 1000-кратном объеме к объему блоков. После этого агар вновь расплавляют и фильтруют через капроновое сито. Растворы очищенного агара в буфере с добавлением мертиолата 1:100000 готовят из расчета первоначальной (взятой в обработку) массы или объема агара-сырца. Готовый агар разливают в маленькие флаконы, объем которых достаточен для разового использования, и хранят в холодильнике при температуре от 4 до 6 °С.

Специальный метод очистки агара [Грабар П., Буртэн П., 1963]. В большой сосуд (емкостью 25 л) помещают около 500 г сухого волокнистого агара и промывают не менее 1 ч проточной водой при 50 °С и столько же времени дистиллированной водой при той же температуре. Затем агар быстро расплавляют на водяной бане так, чтобы получился 3 % раствор в дистиллированной воде. К этому раствору добавляют активированный уголь (1 г на 1 л) и центрифугируют 5 мин при 60 °С. Полученной прозрачной жидкости дают застыть. Гель разрезают на мелкие кусочки и оставляют при — 10 °С до полного замерзания. После оттаивания гель отжимают в марле. Волокнистый отжим отмывают дистиллированной водой и снова отжимают, затем расплавляют и смешивают с равным исходным объемом 0,85 % раствора хлорида натрия. К охлажденному до 65 °С раствору постепенно добавляют горячий спирт до появления осадка (обычно бывает достаточно 1,1 объема спирта). Этот первый осадок после центрифугирования при той же температуре отбрасывают.

Добавляя к надосадочной жидкости 0,2—0,3 объема горячего спирта, получают белый хлопьевидный осадок, хорошо формирующийся при стоянии при 37 °С. Большую часть опалесцирующей надосадочной жидкости удаляют водоструйным насосом, а остаток — центрифугированием. Осадок промывают абсолютным спиртом, сушат при 37 °С и растирают. Получают белый порошок, который хорошо сохраняется в закрытых банках. Подобный порошок очень удобен для приготовления любых концентраций геля, прозрачен, пригоден для разделения крупномолекулярных белков.

П. Заливка пластин. Стеклянные пластины 9Х12 см (можно использовать фотографические стекла), тщательно вымытые и обезжиренные, заливают 1 % раствором агара на вероналовом буфере при 45 °С. Стекла предварительно укладывают на стол с горизонтальным уровнем. Для образования слоя агара толщиной 1 мм на пластину достаточно 10 мл раствора агара. Для разливания агара удобно использовать мерную пипетку емкостью 10 мл, предварительно прогретую. Для образования ровного слоя геля, избежания неравномерного его подсыхания и засорения поверхности стекла с агаром необходимо закрыть конической крышечкой (чтобы образующийся конденсат не стекал на агар).

III. Подготовка агаровой пластины для проведения иммуноэлектрофоретического анализа. Исследуемый материал (сыворотка, моча, лаважная жидкость, окоплодные воды и т. д.) помещают в лунки и подвергают электрофоретическому разделению. По окончании электрофореза вырезают траншею, куда вносят соответствующую цепям исследования антисыворотку.

Для исследования парапротеинов в сыворотке больных применяют лунки диаметром 2 мм на расстоянии 3 мм от траншеи, ширина которой составляет 2 мм и длина 60 мм. Однако необходимо помнить, что в зависимости от концентрации антигена и титра антител антисыворотки расстояние лунки от траншеи может изменяться, его подбирают опытным путем (пробивают ряд лунок от минимального приближения к траншее 1 мм, до максимального удаления — 10 мм). Выбирают то расстояние, которое обеспечило наиболее «контрастный» преципитат.

Лунки пробивают пробойником соответствующего диаметра, а затем агаровую пробу удаляют при помощи водоструйного насоса. Исследуемую сыворотку вносят в лунку пастеровской пипеткой. Наполнение лунки контролируют по исчезновению блика (не переливать!). Заполнение лунки требует определенного навыка. Наличие автоматической пипетки значительно упрощает технику внесения образца и повышает стандартизацию исследования.

Лунки наносят по вертикальной оси стекла, желательно по трафарету, стабилизирующему их положение на стекле относительно полюсов и пробиваемых после проведения электрофореза траншей. Число лунок определяется количеством

нявляемых параметров: общая характеристика иммунологической специфичности сывороточных белков с поливалентной антисывороткой, с моноспецифическими антисыворотками к иммуноглобулинам А, М, G, к легкой цепи каппа и ламбда (у. и Л).

Проведение электрофореза. Электролитные ванны прибора заполняют буферным раствором (катодная и анодная ванны — одинаковым количеством раствора). Перед использованием необходимо проверить pH буфера. Учитывая, что в анодной ванне во время электрофореза происходят интенсивные процессы гидролиза, может меняться pH и ионная сила, необходимо смешивать катодный и анодный растворы по окончании процедуры.

Стекла с агаром и нанесенными образцами соединяют с электродными кюветами при помощи нескольких слоев фильтровальной бумаги. Толщина слоя контактных полос, плотность прилегания бумаги к плоскости агара могут изменять величину силы тока. Наилучшее разделение фракции получают при величине подаваемого на агаровую пластину потенциала 9 В/см по оси электрофореза ($I = 40-50$ мА) в течение 3-4 ч. Контроль за скоростью миграции можно осуществлять, наблюдая движение «тени» альбумина при боковом освещении агаровой пластины или используя «свидетель-краситель», скорость движения которого равна скорости миграции альбумина (пиронин).

По окончании электрофореза в агаровой пластине вырезают траншеи в соответствии с трафаретом (размеры траншеи указаны выше) и задачами исследования. Пластины с заполненными антисывороткой траншеями помещают во влажную камеру, в качестве которой удобнее всего использовать эксикатор с небольшим количеством воды. Появление полос преципитации отмечается уже на вторые сутки. Полностью взаимодействие белков, диффундирующих из траншеи с антигенами, расположенными по оси электрофореза, заканчивается на 4-5-е сутки. Достаточно четкие полосы преципитации позволяют анализировать нативные препараты. При необходимости их можно окрасить. Для эффективного окрашивания все белки, не участвующие в специфической реакции, удаляют, промывая пластину в течение 2-3 дней изотоническим раствором, который несколько раз меняют. По окончании промывания гель накрывают смоченной в дистиллированной воде фильтровальной бумагой (можно положить небольшой груз) и оставляют сохнуть при 37 °С или комнатной температуре. Когда гель высыхает и превращается в присохшую к стеклу пленку, бумагу легко удаляют с его поверхности. Высушенную пластину помещают в кювету с красителем следующего состава: амидо-черный В — 1 мл, уксусная кислота — 450 мл, 0,1 М ацетат натрия — 450 мл, глицерин — 100 мл. Окрашивание продолжают в течение 3-4 ч. После этого пластины извлекают и помещают в кюветы с отмывающей жидкостью — 2 % уксусной кислотой, содержащей 10-15 % глицерина. Обработанную подобным образом агаровую пластину легко снимают со стекла и переносят на отмытую рентгеновскую

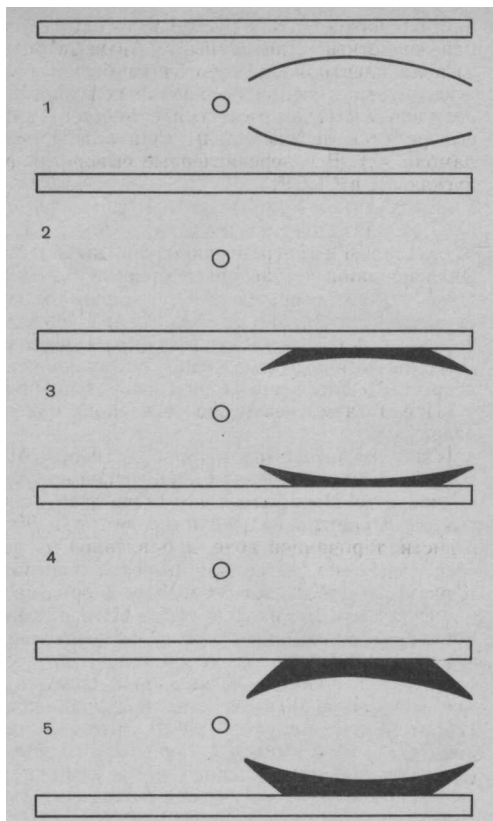


Рис. 11. Определение типа парапротеинов и белков Бенс-Джонса. Контроль специфичности антисывороток после адсорбции.

В траншеях — антисыворотка к л-цепи; в лунках: 1 — нормальная человеческая сыворотка; 2 — мочевой концентрат, содержащий белок Бенс-Джонса х-типа; 3 — мочевой концентрат, содержащий белок Бенс-Джонса Я-типа; 4 — препарат очищенного IgGx-типа в концентрации 0,1 %; 5 — препарат очищенного IgG?-типа в концентрации 1 %.

пленку. Высыхая, агар полностью сохраняет всю картину преципитации, плотно прилипает к пленке и может быть сфотографирован или сохранен как документ.

Анализ преципитационных дуг проводят в соответствии со схемой постановки, т. е. учета специфичности антисыворотки в траншеях и взаимного их расположения с лунками, содержащими антиген. Примерная схема расположения лунок и траншеи при исследовании парапротеина типа Бенс-Джонса представлена на рис. 11.

При исследовании парапротеинов сыворотки типа Q в лунку помещают цельную сыворотку. В траншеи заливают антисыворотки к легкой цепи, соответствующей типу исследуемого G-па-

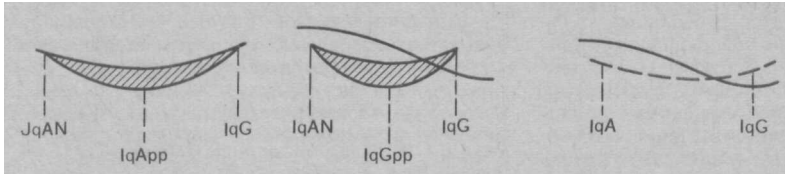
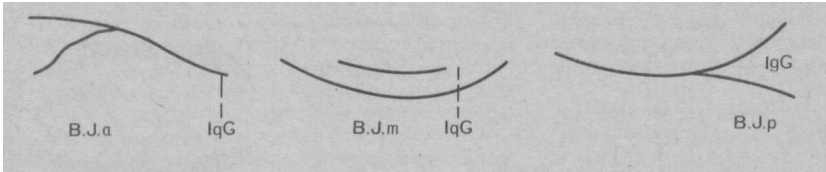
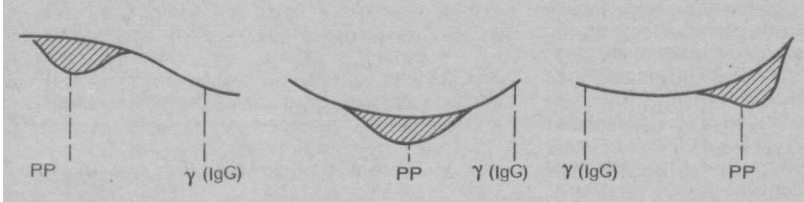
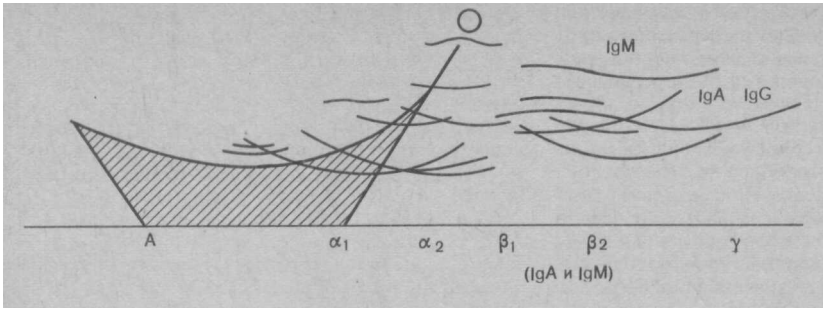


Рис. 12. Различное расположение парапротеинов типа IgG по отношению дуги IgG (по Fauvert et al., 1962, 1978).

рапротеина. Образуется так называемая мие-лая линия преципитации («ложкообразный» преципитат) с утолщением в одном ограниченном участке, идентичная по форме линии, образующейся с антисывороткой к IgG. Моноклонность парапротеина и нередко высокая его концентрация обуславливают плотность преципитата и приближенность его к траншею. Чувствительность метода позволяет рано выявлять синтезируемый парапротеин. Низкие начальные концентрации — «Disglobulinemie minima» [Greysel R. et al., 1958] — могут давать изменение конечного фрагмента дуги в виде утолщения или расщепления.

Схема различных типов преципитатов парапротеина представлена на рис. 12.

При иммуноэлектрофоретическом титровании парапротеинов другого класса — А, D, Е (которые встречаются крайне редко) — и моно-

клональных макроглобулинов необходимо исследовать разведенные сыворотки, так как в противном случае линия нормального IgG мешает титрованию.

Особого методического подхода требуют другие источники антигенов, подверженные иммуноэлектрофоретическому анализу. Все они, и моча, и промывные воды бронхоальвеолярной системы, и цереброспинальная жидкость и др., как правило (исключение составляет моча, содержащая в ряде случаев нефротического синдрома большие количества белка), имеют низкие концентрации антигенов. Поэтому иммуноэлектрофоретическому анализу должно предшествовать предварительное концентрирование белка в этих жидкостях. Необходимо избирать наиболее щадящий режим концентрации, не изменяющий структуры антигена. Наиболее удобным и приемлемым для любых лабораторий

можно считать метод испарения под вентилятором без нагревания. Быстро и эффективно проходит концентрация через полупроницаемую мембрану (диализный целлофан) в среде высокомолекулярного полиэтиленгликоля. При наличии вакуум-насоса применим метод ультрафильтрации через миллиметровые фильтры или диализный целлофан. Исчисление степени концентрации можно вести по кратности объемов (до и после концентрации). Однако более правильно будет измерение белка в конечном объеме, так как это дает возможность произвести предварительные расчеты разведений антисыворотки в тест-системе. Последняя воспроизводится для каждого типа исследуемого объекта. Так, концентрированная моча исследуется в той же системе, что и сыворотка. Но для лаважной, цереброспинальной жидкости, околоплодных вод и т. д. необходимо в предварительных опытах по раститровке антисыворотки выбрать наиболее оптимальную концентрацию антител. Это достигается при использовании метода двойной иммунодиффузии по Оухтерлони.

Клиническое значение. Иммуноэлектрофоретический анализ позволяет рано выявить низкие концентрации парапротеина и точно их титровать. Выявление парапротеина позволяет правильно и своевременно поставить диагноз больным и назначить правильную терапию. Титрование легких цепей парапротеинов позволяет дифференцированно применять терапию при амилоидозе, нередко сопутствующем парапротеинемиям. Динамическое наблюдение за концентрацией парапротеина — объективный тест оценки эффективности применяемой стероидной или цитостатической терапии.

Литература. Иммунохимический анализ / Под ред. Л. В. Зильбера.— М.: Медицина, 1968 г.— 300 с.; *Ванпаров И., Иомтов М., Сапов С.* и др. Диспротеинемия.— София, 1978; *Грабар П., Буртэн П.* Иммуноэлектрофоретический анализ.— М., 1963.

6.4.6. Поверхностный антиген гепатита В и антитела к нему

Метод встречного иммуноэлектроосмосфореза.

П р и н ц и п. Метод основан на различной подвижности антигена и антител в гелевых носителях под воздействием электрического поля. Движение антигена направлено к положительному полюсу — к аноду, антител — к катоду. При взаимодействии антигена и антител к нему по фронту встречного движения образуется вертикальный преципитат.

Посуда и оборудование. 1. Прибор для электрофореза ПЭФ-3. 2. Стекла 9X X12 см (очищенные фотопластинки). 3. Пробойники для лунок с внутренним диаметром 3 мм. 4. Водоструйный насос.

Р е а к т и в ы. 1. Агар (бактоагар «Дифко», США; «Серва», ФРГ, или дальневосточный агар, очищенный по одному из способов, описанных выше). 2. Иммунодиагностикум на антиген вирусного гепатита В (HBsAg) и антител к нему

(HBsAt) производства ИЭМ им. Н. Ф. Гамалеи. 3. Барбитал-натриевый буфер pH 8,1—8,4: 8,14 г барбитал-натрия (мединал), 6,48 г ацетата натрия, 90 мл 0,1 н. HCl, до 1 л дистиллированной воды. Перед использованием буфера необходимо строго контролировать pH и при несоответствии указанным значениям (в зависимости от отклонения) исправлять величину pH 0,1 н. HCl или 0,1 н. NaOH.

Ход определения. Готовят 1 % агар на барбитал-натриевом буферном растворе pH 8,1—8,4. Если применяют порошкообразный очищенный агар, то его растворяют в буферном растворе при постоянном помешивании, нагревая до 90 °С (не доводя до закипания). Гелизированный агар нагревают в стеклянной колбе на водяной бане при тех же условиях. 15 мл готового агара, охлажденного до 45 °С, наливают на подогретое тщательно обезжиренное стекло, уложенное на горизонтальную поверхность. Накрыв конической крышечкой, дают застыть гелю. Затем пробойником наносят 4 ряда лунок по вертикальному размеру стекла. Расстояние между лунками по вертикали в парных рядах составляет 8 мм, по горизонтали — 8 мм. Расстояние между парными рядами равно 15 мм.

Количество лунок в вертикальном ряду определяется числом сывороток, поступивших для исследования. Для стандартизации постановок удобно использовать трафарет, нанесенный на миллиметровую бумагу и имеющий размеры стекла. Накладывая стекло с агаром на трафарет, можно быстро и точно пробить лунки в агаре.

В первую и последнюю пару лунок капилляром вровень с поверхностью агара вносят компоненты иммунодиагностикума для контроля режима опыта. АГ иммунодиагностикума и контролируемые сыворотки вносят в лунки, расположенные на стороне катода. АТ иммунодиагностикума вносят в лунки, расположенные на стороне анода. После заполнения лунок стекло помещают в прибор для электрофореза. На два противоположных края стекла со стороны анода и катода кладут куски фильтровальной бумаги, сложенные вдвое и смоченные в ацетат-барбиталовом буфере. Фильтровальная бумага должна закрывать 0,5—1 см поверхности агара и плотно к нему прилегать.

Свободный конец бумаги опускают в электродный сосуд, в который налит буфер. После включения прибора устанавливают напряжение 120—160 В, а силу тока устанавливают 30 мА. Через 1/2—2 ч прибор отключают, бумажные соединители убирают и учитывают результаты. Вначале проверяют реакцию у контрольных лунок. В связи с тем что антитела обладают большей подвижностью, они проходят большее расстояние до взаимодействия с антигеном. Поэтому полоса приципитации расположена ближе к лунке с антигеном. Этим она отличается от других неспецифических полос, которые могут образовываться при проведении реакции методом встречного иммуноэлектроосмосфореза, так как в сыворотке человека может присутствовать несколько преципитирующих систем.

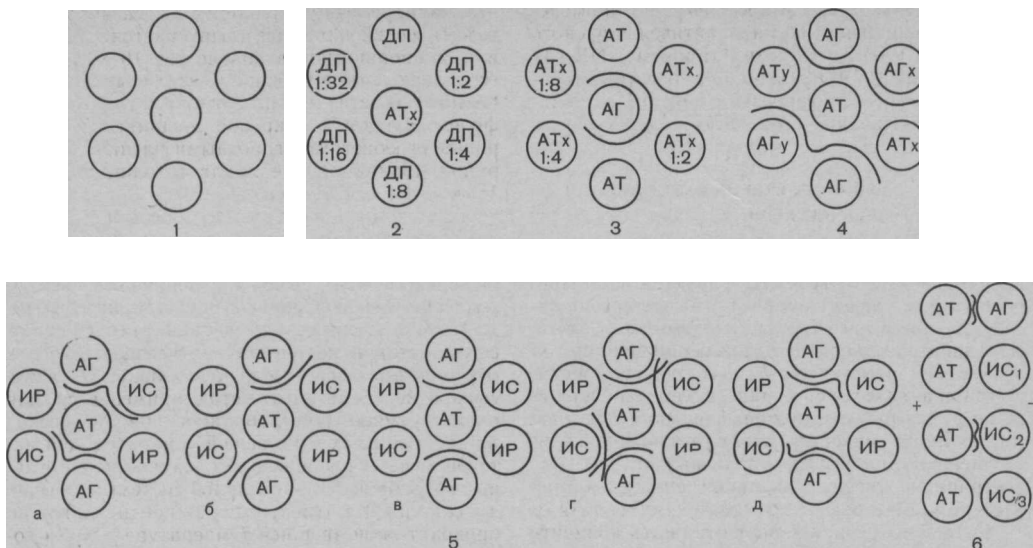


Рис. 13. Схема постановки метода двойной иммунодиффузии в геле для определения антигена вирусного гепатита (HBsAg) и метода встречного иммуноэлектроосмоса.

1 — схема стандартного штампа для пресечения контура лунок: радиус центральной лунки 8 мм, диаметр периферических лунок — 3 мм; 2 — схема внесения контролируемой антисыворотки: ДП — донорская плазма, АТх — истощенная кроличья антисыворотка; 3 — АГ и АТ — антиген и антитела эталонного иммунодиагностикума. АТх — контролируемая антисыворотка с разным титром АТ; 4 — АГ и АГ — компоненты эталонного иммунодиагностикума, АТх, АГу, АТу, АГх — компоненты контролируемого иммунодиагностикума серий «х» и «у»; 5 — АГ и АТ — компоненты иммунодиагностикума; ИС — исследуемая сыворотка, ИР — изотонический раствор натрия хлорида; 6 — схема встречного иммуноэлектроосмоса: ДТ и АГ — компоненты иммунодиагностикума, ИС₁, ИС₂, ИС₃ — исследуемые сыворотки; а, б, в, г, д — различные типы положительных и отрицательных реакций на HBsAg.

Перед учетом результатов рекомендуется пластинку с агаром поместить на 1 ч в 10 % раствор NaCl.

Положительной на присутствие HBs-антигена считается та сыворотка, которая с АТ иммунодиагностикума образует полосу преципитации, расположенную ближе к лунке с исследуемой сывороткой и находящуюся на одной прямой с полосой преципитации контрольных лунок (рис. 13).

При исследовании сывороток для обнаружения антител к HBs-антигену реакцию ставят по той же схеме: в лунки, расположенные на стороне катода, вносят АГ иммунодиагностикума, в лунки, расположенные на стороне анода, — контролируемые сыворотки. В верхнюю и нижнюю пару лунок вносят компоненты иммунодиагностикума. Специфичность положительных результатов по выявлению антигена и антител в человеческих сыворотках, полученных методом встречного иммуноэлектроосмоса, следует уточнять повторной постановкой в реакции преципитации в геле с иммунодиагностикумом на антиген и антитела вирусного гепатита В.

Клиническое значение. Поверхностный антиген гепатита В — HB_s-Ag, названный после публикации работ Блайберга австралийским, является маркером именно этого вида гепатита, его этиологической причиной. Выявление его имеет диагностическое значение и спо-

собствует дифференцированию гепатита В от гепатита А, алкогольного гепатита. Учитывая возможность носительства антигена, необходимо провести исследование на HBs-антиген донорской крови. Изучение путей передачи привело многих передовых клиницистов к пониманию необходимости обследования на HBs-антиген всех пациентов стационаров, с тем чтобы вовремя исключить возможность «шприцевого» гепатита. HBsAg является причиной вспышек гепатита в отделениях хронического гемодиализа. Клинически обосновано исследование HBs-антител в сыворотке. Наличие их при отсутствии антигена указывает на возможность секвестрирования антигена в иммунных комплексах или фиксации в тканях. Обосновано определение HB_sAg не только при установлении этиологической причины заболевания печени, но и при системных васкулитах. Так, в 45—60 % случаев узелкового периартериита реакция на HB_sAg положительна. Находят этот антиген и при некоторых формах иммунокомплексных нефритов.

Выявление этого антигена представляется важным именно потому, что современные методы терапии позволяют элиминировать его и тем самым удалить основную причину, вызывающую развитие цепи взаимообусловленных патологических изменений. HB_sAg может быть выявлен в тканях, в экссудатах.

Литература. *Наставление* по применению иммунодиагностикума на антиген вирусного гепатита В (HBsAg) и антитела к нему (HB₅At) сухого.— М., 1977; *Руководство* по количественному иммуноэлектрофорезу / Под ред. Н. Аксельсен, И. Крелль.— М., 1977.

6.4.7. Количественный анализ антигенов

Метод иммуноэлектрофореза в среде, содержащей антитела. Принцип метода. Антиген, помещенный в среду агара с антисывороткой, образует преципитат, который под действием электрического потенциала образует петлю (ракетку), вытянутую по оси электрофореза. Метод практически совмещает в себе описанную выше радиальную иммунодиффузию и электрофорез. Величина петли преципитата находится в линейной зависимости от эквивалентной концентрации антигена, связанных антител и градиента потенциала. Если последняя величина постоянна, то первая может отражать концентрацию внесенного в агар антигена.

Посуда и оборудование. 1. Стеклоянные пластины 8X12 см. 2. Пробойники для лунок в агаре с внутренним диаметром 3 мм. 3. Водоструйный насос. 4. Прибор для электрофореза ПЭФ. 5. Измеритель. 6. Измерительная миллиметровая линейка.

Реактивы. 1. Агароза (в СССР выпускается заводом химреактивов в г. Олайне). 2. Барбиталовый буфер рН 7,4 (ионная сила 0,07) с 2 М лактата кальция. 3. Антисыворотки (к иммуноглобулинам А, М, О, к легким цепям -л и К, к аF-протеину, секреторному IgAS), выпускаемые ИЭМ им. Н. Ф. Гамалеи в Москве, НИИ вакцин и сывороток им. И. И. Мечникова в Москве, ИЭМ в г. Горьком. 4. Краситель и отмывающая жидкость (прописи см. в разделе «Имуноэлектрофоретический анализ»).

Ход определения. 1% (по объему или по массе) раствор агарозы на барбиталовом буфере растворяют при подогревании на кипящей водяной бане, а затем охлаждают до 45 °С. Предварительно выбранное количество антисыворотки (титрование антисыворотки проводят аналогично описанной процедуре в иммуноэлектрофорезе) тщательно смешивают с раствором агарозы и заливают между двумя стеклянными пластинами с помещенной между ними П-образной рамкой (см. выше). Заливка агарозы и формирование слоя происходит более успешно, если форму и пипетку, которой заливают смесь агарозы с антисывороткой, предварительно нагревают до 40—45 °С. Дают остыть форме при комнатной температуре, а затем осторожно снимают верхнее стекло. По линии перпендикулярной оси электрофореза параллельно длинной стороне стекла наносят ряд лунок на расстоянии не менее 2 см между рядами. Центры соседних лунок не должны быть ближе 8 мм. При таких условиях на стекло можно поместить 24 лунки. В средние лунки вносят разведения стандарта (требования к стандарту и его разведениям см. выше), используемые для построе-

ния калибровочной кривой. Антиген вносят автоматической пипеткой (выпускается в СССР) или микропипеткой в количестве 10 мкл. Подготовленные таким образом пластины помещают на поверхности столика прибора для электрофореза. Стекла с агарозой соединяют с электродными кюветами агарозными пленками с шириной, равной ширине стекла, и толщиной 3 мм. Можно применять и соединительные полоски из фильтровальной бумаги. Во избежание подсыхания и деформации геля в месте соединения с бумажными полосами последние перед соединением их с пластинами смачивают в буферном растворе. Электрофорез ведут при потенциале 10 В/см в течение 2—10 ч в зависимости от характеристик и количества антигена, взятого в определенном отношении к используемой антисыворотке. Если этот метод применяется для определения иммуноглобулинов в биологических жидкостях с исходно низкой концентрацией антигена (цереброспинальная жидкость, промывные воды бронхоальвеолярной системы), обычно достаточно 2 ч. Электрофорез предпочтительно проводить при внешней температуре 4 °С (в холодильнике или холодной комнате). Время проведения процедуры лимитируется также высотой образующихся при реакции пиков.

После электрофореза гелевые пластины на стеклах отмывают в 0,2 М растворе хлорида натрия в течение суток. Затем высушивают и окрашивают, как это описано выше.

Пики максимальной миграции комплексов антиген—антитело измеряют миллиметровой линейкой. Ошибка измерения не должна превышать 0,2 мм при высоте пиков от 2 до 5 см. Стандартную кривую строят на соотношении величины пиков и концентраций белка в разведениях стандартов антигена обычным путем.

Клиническое значение. Метод может быть рекомендован для определения низких концентраций антигена в таких биологических жидкостях, как моча, цереброспинальная, бронхоальвеолярная жидкость, слюна и т. д. Высокая чувствительность и воспроизводимость метода дают основания для более широкого использования его в клинико-иммунологическом анализе.

Литература. *Laboratory techniques in Biochemistry and molecular biology*/Ed by T. S. Work, E. Work, 1970, p. 111: 534; *Руководство* по количественному иммуноэлектрофорезу. / Под ред. Н. Аксельсен, И. Крелль, Б. Бике.— М., 1977.

6.4.8. Возможные источники ошибок и неспецифические реакции при использовании иммунодиффузионных методов

Качественные и количественные результаты иммунодиффузионных методов прежде всего зависят от профессионального мастерства исследователя. Тем не менее ряд объективных факторов, которые необходимо знать и учитывать при критическом анализе результатов, могут вызывать определенные отклонения.

Все варианты методов указанной группы требуют использования тщательно сбалансированной системы по отношению антигена и антител. Низкая концентрация антигенов вызывает смещение преципитата к лунке с антигеном вплоть до полного слияния его с краем отверстия и невозможностью определения при двойной иммунодиффузии в геле. Аналогичная картина может наблюдаться при избытке антител (преципитат сливается с краем лунки, содержащей антитела). Число молекул антител, которое соединяется с молекулами антигена, называют эквивалентным количеством. Хейдельберг и Кендалл впервые определили это количество на основании опытов преципитации в пробирке как количество антигена, которое присоединяется к определенному количеству антител с образованием максимального количества преципитата. Необходимо знать, что при использовании количественных методов иммуноэлектрофореза в ходе реакции все увеличивающееся число молекул антител присоединяется к молекулам антигенов, образуя преципитат, который уже не продвигается в геле в ходе электрофореза. Количество антител, приводящее к преципитации в ходе иммуноэлектрофореза, меньше, чем эквивалентное количество антител, установленное по преципитации в пробирках. Следовательно, иммунные комплексы в преципитате должны быть относительно ненасыщены антителами. При дальнейшем ведении электрофореза уже образовавшиеся преципитаты остаются в геле и становятся все отчетливее по мере того, как соответствующее число молекул антител мигрирует к области преципитации из окружающего геля. Таким образом, при подборе в каждом конкретном случае соотношения в системе антиген—антитело необходимо использовать условия (характеристики электрического поля, среда, время преципитации), которые будут в дальнейшем применены в основном опыте.

Ложноотрицательные реакции могут наблюдаться в системе с избытком антигена — образование растворимых комплексов. При несбалансированном отношении антиген—антитело возможно образование нескольких полос преципитации или ложных «шпор», что затрудняет интерпретацию результатов в методе двойной иммунодиффузии.

Необходимо учитывать молекулярную массу и размер белковых субстратов, включаемых в реакцию, так как эти параметры оказывают значительное влияние на скорость диффузии и электрофоретической подвижности в гелях. Белки с молекулярной массой свыше 200 000 медленно диффундируют в агаре. Иммунный глобулин М, α_2 -макроглобулин, α_2 -липопротеин и фибриноген обладают и более низкой электрофоретической подвижностью.

Неправильная обработка сыворотки может приводить к агрегации белков и образованию крупномолекулярных агрегатов, например агрегированного IgG. Значительно меняется диффузия сыворотки, содержащей иммунные комплексы, особенно IgM с IgG. При исследовании парапротеинов могут наблюдаться двойные кольца преципитации вследствие общности ан-

тигенных характеристик легких цепей парапротеина и нормального иммуноглобулина антисыворотки.

При наличии в исследуемом материале мономерной формы можно наблюдать размытое большое кольцо диффузии без четкого кольца преципитации.

Необходимо учитывать воздействие физических и медикаментозных факторов, которые могут изменять диффузионные свойства и электрофоретическую подвижность. Так, рентгеновское или радиоактивное облучение, длительная терапия высокими дозами кортикостероидов могут вызывать расщепление белков на субъединицы с различными молекулярными размерами и массой, но с идентичными иммунологическими свойствами. Это приводит к появлению артефактов, которые могут быть неправильно интерпретированы («ложные парапротеины»).

Большое внимание необходимо уделять знанию качеств среды, применяемой для иммунодиффузии или иммуноэлектрофореза в соответствии с теми задачами, которые стоят перед исследователем. Плохая очистка геля может служить причиной электростатического взаимодействия антигенов с некоторыми ионизированными группами геля, антигены могут образовывать преципитаты в плохо очищенном геле, которые могут быть приняты за специфические. Исследователь должен творчески подходить к оценке деталей исполнения метода. Так, при изучении высокомолекулярных антигенов с большим размером молекулы, например определение высокополимерной ДНК в плазме методом встречного иммуноэлектроосмофореза, правильное использование агарозный гель с концентрацией его в буфере 0,7—0,8 %. Наоборот, применение стандартный метод радиальной иммунодиффузии для количественной оценки секреторного компонента IgAS, можно допустить применение более плотных гелей, с которыми проще работать и к очистке которых предъявляются меньшие требования.

Все иммунопреципитационные методы анализа антигенов требуют тщательного подбора антисывороток. Налаживание промышленного производства гибридных сывороток значительно повысит специфичность реакции. Все выпускаемые в настоящее время моноклоновые и очищенные сыворотки требуют обязательного контроля специфичности (особенно это касается люминесцирующих антисывороток к иммунным глобулинам, к альфа-фетопротеину и др.). При работе с каждой партией антисывороток необходимо определять концентрацию антител. Имеет значение вид животного, использованного в качестве объекта иммунизации (кролик, лошадь, коза, свинья и т.д.). Наиболее удобны для практической работы в потоковых методах козы и кролики антисыворотки. Лошадиная антисыворотка может быть причиной удвоения полос преципитации.

При использовании этой антисыворотки часто наблюдается растворение уже сформированного преципитата как в избытке антигена, так и антител (т. е. эта антисыворотка требует

очень тщательного подбора эквивалентных концентраций). В редких случаях может иметь место преципитация неиммунной природы.

Такие преципитаты часто растворяются в 10 % растворе хлористого натрия в отличие от устойчивого к этой обработке иммунного преципитата.

6.5. АНТИЯДЕРНЫЕ АНТИТЕЛА

Имунофлюоресцентный метод определения антиядерных антител. Принцип метода. Тиоизоцианат флюоресцеина или производные родамина (чаще всего применяемые метки), конъюгированные с антителами, под действием ультрафиолета светятся желто-зеленым или оранжево-красным светом, указывая на расположение антигена, с которым специфически связались меченые антитела.

Существуют два основных варианта метода Кунса: прямой, когда метится непосредственно у-глобулиновая фракция антисывороток (т. е. антитела), и непрямой, в котором используется промежуточная инкубация среза с немеченой антисывороткой (или антителами, предположительно находящимися в исследуемой сыворотке) и последующим проявлением образовавшегося комплекса антигаммаглобулиновой меченой сывороткой другого животного.

Непрямой метод более чувствителен и более применим в условиях клинических исследований. Однако он сопровождается повышением неспецифической адсорбции белков и поэтому требует обязательной постановки контролей.

Антиядерный фактор (АНФ) определяется методом иммунофлюоресценции на криостатных срезах печени крыс или мышей. Антитела к различным антигенам клеточного ядра — ДНК, нуклеогистону, рибосомам, нуклеолам, находящиеся в исследуемой сыворотке, вступают в специфическое связывание с антигенами, которое определяется меченой ФИТЦ-антиглобулиновой сывороткой (иммунная сыворотка, конъюгированная с флюоресцеинтиоцианатом — ФИТЦ).

Посуда и оборудование. 1. Предметные и покровные стекла. 2. Чашки Петри. 3. Центрифуга. 4. Люминесцентный микроскоп (МЛ-2, МЛ-3, «Люмам»).

Реактивы. 1. Антигаммаглобулиновая сыворотка, меченная ФИТЦ. 2. Нефлюоресцирующее иммерсионное масло. 3. Фосфатный буфер pH 7,2—7,4 : 0,53 г однозамещенного фосфата калия, 0,95 г двузамещенного фосфата калия, 8,75 г хлорида натрия на 1 л дистиллированной воды. 4. Печеночный порошок (для специфической адсорбции). У обескровленного животного извлекают печень и прополаскивают ее в изотоническом растворе хлорида натрия, нарезают на мелкие кусочки и растирают в Ф³Р-форовой ступке с кварцевым песком. Полученную массу заливают двойным объемом 0,87 % раствора хлорида натрия и добавляют 4 объема ацетона (по отношению к полученной смеси). Смесь интенсивно взбалтывают 3—5 мин. Надосадочную жидкость сливают, а осадок промывают изотоническим раствором хлорида натрия до исчезновения гемоглобина в надосадочной жидкости. Осадок снова разбавляют двумя

объемами изотонического раствора и четырьмя объемами ацетона. После отстаивания материала надосадочную жидкость вместе с гомогенатом печени сливают, отделив его от кварцевого песка, а после дополнительного отстаивания сливают надосадочную жидкость. Оставшийся осадок гомогената заливают четырьмя объемами ацетона и фильтруют через воронку Бюхнера с бумажным фильтром. Высушивание порошка проводят в стерильных чашках, прикрытых фильтровальной бумагой, в течение 18 ч при 37 °С. Высушенный материал растирают в ступке, просеивают через мелкое сито и расфасовывают. Предпочтительнее использовать пенициллиновые флаконы, которые после заполнения порошком закупоривают резиновыми пробками и заливают парафином. Порошок сохраняет способность устранять неспецифическую люминесценцию в течение 3 лет.

Ход определения. Сыворотку крови больного, получаемую обычным путем, растираивают забуференным изотоническим раствором хлорида натрия (1 ч 0,15 М фосфатного буфера pH 7,4 и 9 ч 0,87 % раствора хлорида натрия) 1 : 5, 1 : 10, 1 : 20, 1 : 40, 1 : 80... и т. д. Последнее разведение сыворотки, при котором еще определяется четко выраженное свечение (не менее 2+), определяется как титр АНФ. Опыт подсказывает необходимость разведения сыворотки до 320—640, в редких случаях концентрация АНФ достигает 1 : 10240.

Приготовление срезов печени. Печень извлекают из только что забитых крыс или мышей, тут же разрезают на блоки 10X 10X5 мм и помещают в термостат с жидким азотом на 1—2 мин. После этого блоки помещают на столик криостата, камера которого охлаждена до —20 °С. Полученные срезы наносят кисточкой на тщательно вымытые обезжиренные предметные стекла по 3—4 среза на одно стекло. Стекла со срезами могут храниться 1—2 мес в морозильной камере холодильника и использоваться по мере надобности.

Предметные стекла со срезами печени (если они извлечены из морозильника, необходимо подождать, пока испарится конденсат, т. е. стекло прогреется до комнатной температуры) помещают в фосфатный буфер pH 7,5 на 8—10 мин. Затем их извлекают и дают стечь буферу. На влажные срезы пастеровской пипеткой наслаивают (по капле) разведения сыворотки. Стекла с исследуемой сывороткой на срезах помещают во влажную камеру (чашки Петри с кусочками смоченной ваты) при комнатной температуре на 45 мин, после чего стекла со срезами промывают

Необходимо отбирать здоровых животных.

вают в течение 10 мин в фосфатном буфере. Излишки буфера на стекле вокруг срезов тщательно промокают фильтровальной бумагой. На влажные срезы наслаивают антисыворотку к IgQ человека, меченную ФИТЦ и предварительно истощенную печеночным порошком для исключения фонового свечения, которое связано с взаимодействием нормальных печеночных антител, находящихся, как правило, в небольших титрах в нормальных и патологических сыворотках.

Люминесцирующая (меченная ФИТЦ) сыворотка выпускается в ампулах в лиофилизированном виде. На этикетке ампулы обозначено рабочее разведение препарата. Для употребления сыворотку в ампуле разводят 0,5 мл забуференного изотонического раствора хлорида натрия и затем адсорбируют на печеночном порошке. На 1 мл сыворотки берут 80 мг порошка. Смесь тщательно встряхивают. В течение часа при комнатной температуре периодически через 5—10 мин перемешивают, интенсивно встряхивая. Затем центрифугируют 15 мин при 9000 об/мин. Надосадочную жидкость — адсорбированную сыворотку — отсасывают. При температуре хранения 4 °С сыворотка может быть использована в течение 3—6 дней.

Инкубацию срезов с меченой антисывороткой также проводят во влажной камере 45 мин при комнатной температуре. Затем срезы отмывают в фосфатном буфере (удаляют непрореагировавшие белки) в течение 10—15 мин и высушивают на воздухе.

Микроскопирование готовых препаратов производят при возбуждающем ультрафиолетовом облучении с использованием входного светофильтра УФС-3 и окулярного светофильтра ОС-3 в системе масляной иммерсии. Степень све-

чения оценивают в плюсах (от 4+ до 2+). По характеру свечения различных структурных образований ядра выделяют 4 формы свечения, которые отражают отличные друг от друга анти-нуклеарные факторы. Дифференциация их имеет диагностическое значение.

Результаты непрямого метода иммунофлюоресценции могут быть учтены при условии соблюдения техники постановки реакции и выполнения контролей на специфичность свечения:

1) наслаивать на срезы сыворотку, истощенную антигеном — ДНК, нуклеопротеином или гистонном;

2) использовать сыворотку с заранее определенными антителами другой специфичности.

Клиническое значение. Диагностическую информативность имеют концентрация и тип антинулеарного фактора. Низкие титры АНФ часто определяются при разнообразной патологии и у здоровых доноров. Высокие концентрации характерны для системной красной волчанки (СКВ), хронического активного гепатита (ХАГ), в ряде случаев при ревматоидном артрите с системными проявлениями (РА). При СКВ, как правило, выявляется диффузное свечение ядер, при ХАГ — кольцевидное (или краевое), при РА — крапчатое. Последний тип свечения встречается при исследовании сывороток больных склеродермией. Сочетание высоких концентраций АНФ с гомогенным (диффузным) свечением ядер гепатоцитов и низкими значениями гемолитической активности комплемента характерно для СКВ. Нарастание титра АНФ при динамическом исследовании сыворотки пациента может служить ранним признаком обострения процесса (до появления клинических симптомов) и диктовать необходимость повышения дозы стероидных гормонов.

6.6. ИССЛЕДОВАНИЕ ФАКТОРОВ КЛЕТОЧНОГО ИММУНИТЕТА

Основные направления и методические принципы. Учение о клеточной кооперации в осуществлении иммунологической адаптации, иммунологического надзора за генетическим постоянством внутренней среды организма получило значительное развитие за два десятилетия своего существования. Выделение тимусзависимой (Т) и тимуснезависимой (В) клеточных систем в конце 60-х годов позволило изучить их функции и взаимодействие и детализировать эффекторное звено в реализации иммунного ответа, определив субпопуляции Т-лимфоцитов: супрессоры, хелперы, киллеры, клетки антителозависимой цитотоксичности, отличающиеся друг от друга специфическими рецепторами, по которым они и могут быть детерминированы в общем пуле лимфоцитов. Были выявлены специфические различия В-клеток по мембранным иммуноглобулинам, рецепторам к Fc-фрагменту иммуноглобулина G, к C₃-компоненту комплемента. Наконец, в последние годы (1981—1983) обнаружены супрессорные функции В-лимфоцитов.

Значительно шире современные оценки фагоцитоза в комплексном анализе генетически детерминированных дефектов иммунитета: распознавание антигенов макрофагами и представление их Т-лимфоцитам.

Существенное значение в понимании роли клеточных реакций в формировании клинических синдромов приобретает все углубляющееся изучение сывороточных факторов: лимфокинов, монокинов, костномозгового стимулятора антителопродукторов и др.

6.6.1. Т-лимфоциты

Метод розеткообразования для определения Т- и В-лимфоцитов в периферической крови. П р и н ц и п . Поверхностные рецепторы, специфичные для различных субпопуляций лимфоцитов, проявляются, связывая эритроциты, нативные или нагруженные антителами к этим рецепторам. Эритроциты образуют с поверхностью лимфоцита фигуру розетки. За розетку

принимают лимфоцит, присоединивший 3—5 эритроцитов. В ряде случаев эритроциты плотно окутывают лимфоцит, образуя так называемую морулу. Интерпретация этого феномена крайне разноречива. Нередко он отражает методические неточности постановки. Феномен розеткообразования может быть усилен путем обработки эритроцитов нейраминидазой.

Определение Т-лимфоцитов методом спонтанного розеткообразования с эритроцитами барана (Е-РОК). Принцип. Тимусзависимые Т-лимфоциты имеют рецепторы для эритроцитов барана, которые выступают, таким образом, специфическим маркером для их распознавания (Е-РОК: Erythrocyte — розеткообразующие клетки).

Приборы и оборудование. 1. Центрифуга ЦЛК-1. 2. Холодильник (бытовой). 3. Термостат. 4. Микроскоп люминесцентный (МЛ-2 или другие типы). 5. Камера Горяева. 6. Счетчик клеток. 7. Автоматические пипетки или микропипетки. 8. Пробирки силиконовые или пластиковые. 9. Штатив для пробирок.

Реактивы. 1. Среда 199, раствор Хенкса. 2. Гепарин (готовый раствор из расчета 25 ЕД/мл крови). 3. Фосфатный буфер рН 7,4. 4. 0,01 % раствор акридинового оранжевого. 5. 0,1 % раствор эозина, 0,1 % раствор трипанового синего на дистиллированной воде. 6. Гипак (изопак, верографин, уротраст). 7. Фиколл-400 (полисахарид с молекулярной массой 400000). 8. Эритроциты барана.

Ход определения. 10 мл крови из локтевой вены вносят в пластиковую пробирку с раствором гепарина (256 ЕД/мл) и осторожно перемешивают. Гепаринизированную кровь разводят фосфатным буфером рН 7,4 в соотношении 1 : 2; 9 мл смеси осторожно наслаивают на раствор фиколл-гипак плотности 1,077 г/мл (12 частей 9 % фиколла и 5 частей 33,9 % гипака плотности 1,077 г/мл). Пробирки центрифугируют 40 мин при 1500 об/мин.

В связи с тем что могут использоваться разные системы центрифуг, необходимо применять такие режимы центрифугирования, чтобы сила разделения в интерфазе составила 400 g. Величину центробежного ускорения G вычисляют по формуле: $G = 1,1 \cdot n^2 \cdot R \cdot 10^{-5}$ (n — число оборотов в минуту, R — радиус от центра оси центрифуги до границы соприкосновения смеси фиколл-гипака с разделяемой суспензией в см).

После центрифугирования слой лимфоцитов осторожно пипеткой извлекают из интерфазы и дважды отмывают буферным раствором. Концентрацию клеток доводят до 2—4 млн. в 1 мл в среде 199', содержащей 10 % раствор телячьей сыворотки или сыворотки IV (AB) группы крови человека. При использовании последней необходима инактивация при 56 °С в течение 30 мин и абсорбция эритроцитами. Для этого 0,5 мл осадка отмываемых эритроцитов добавляют

к 1 мл сыворотки и инкубируют в течение 1 ч при 37 °С, периодически встряхивая. Желательна абсорбция сыворотки пулом лейкоцитов, учитывая возможность наличия антилейкоцитарных антител. При использовании человеческой сыворотки необходимо учитывать влияние аутоцитолимфотоксинов, проявляющих максимум активности при 4 °С.

Перед использованием суспензии лимфоцитов проверяют их жизнеспособность. Равные объемы 0,1 % раствора водного эозина на среде Хенкса или Рингера двойной концентрации без глюкозы и 0,1 % раствора трипанового синего на дистиллированной воде смешивают перед употреблением и 1—2 капли добавляют к капле суспензии клеток и часть смеси переносят в камеру Горяева. Окрашенные (мертвые) клетки просчитывают на 100 клеток в поле зрения. При правильной обработке процент мертвых клеток не превышает 3.

Приготовление эритроцитов барана. Используют эритроциты одного животного или смесь, полученную от нескольких. Эритроциты можно хранить в течение 2 нед при 4 °С в растворе Олсвера (глюкоза — 2,05 г, цитрат натрия — 0,8 г, хлорид натрия — 0,42 г, дистиллированная вода — 100 мл), рН этого раствора устанавливают равным 6,1 с помощью 10 % раствора лимонной кислоты. Перед употреблением эритроциты барана 3—4 раза отмывают фосфатным буфером и готовят 0,5 % (по объему) взвесь клеток.

Подготовка и учет реакции розеткообразования. Реакцию проводят по методу, описанному Jondal и соавт. в 1972 г. В пластиковые пробирки (от 2 до 5) вносят 0,1 мл взвеси лимфоцитов и добавляют равный объем 0,5 % взвеси эритроцитов барана. Соотношение эритроциты: лимфоциты не должно превышать 50 : 1. Инкубируют смесь в термостате 37 °С в течение 10 мин. Затем пробы центрифугируют 5 мин при 1000 об/мин (для ЦЛК-1) и оставляют на ночь в холодильнике при температуре 4 °С. Подсчет клеток мы рекомендуем проводить в камере Горяева. Существующий метод фиксации суспензии глутаровым альдегидом с последующим приготовлением мазков и подсчетом розеток в окрашенных препаратах позволяет накапливать стекла и анализировать результаты реакций в другой, свободной от постановки или менее загруженный, день. Однако глутаровый альдегид изменяет поверхность эритроцитов барана, вызывает неспецифическое прилипание их к клеткам крови человека. Не исключено, что глутаровый альдегид десеквестрирует скрытые антигены в мембране бараньих эритроцитов, к которым имеются рецепторы у лимфоцитов человека. Более перспективен в этом плане ацетальдегид, фиксация которым эритроцитов стандартизирует определение Т-лимфоцитов и делает возможным обоснованное сопоставление результатов, полученных разными лабораториями.

Для подсчета клеток в камере Горяева осадок клеток в извлеченных из холодильника пробирках осторожно ресуспендируют пастеровской пипеткой (несколько раз медленно набирают и

¹ Можно использовать любой буферный раствор рН 7,0—7,2 без ионов Ca^{++} (наличие ионов Ca^{++} способствует агрегации клеток, их коагуляции).

выпускают клеточную взвесь) и добавляют 0,02 мл 0,01 % раствора в фосфатном буфере акридинового оранжевого. Этот краситель дает ярко-зеленую люминесценцию при возбуждении ультрафиолетом. Через 2—3 мин заполняют камеру Горяева и определяют процент Е-РОК путем подсчета 300 лимфоцитов в люминесцентном микроскопе. Это значительно облегчает и ускоряет процедуру счета ярко светящихся лимфоцитов, окруженных розоватыми эритроцитами.

В день взятия крови на Т-лимфоциты необходимо проводить общий анализ крови, который дает возможность высчитывать абсолютные значения Т-клеток.

Нормальные величины Т-клеток, определенные нами у 150 здоровых доноров: $54,3 \pm 0,98$ %; $979,8 \pm 16,8$ кл/мкл.

Определение активных Т-лимфоцитов, образующих розетки с эритроцитами барана (ЕА-РОК). Все подготовительные операции выполняются так, как это описано для Е-РОК, за исключением сыворотки, которую при определении ЕА-РОК не добавляют в инкубационную среду, и длительной холодной инкубации. После термостатирования 10 мин при 37 °С и последующего центрифугирования при 1000 об/мин (для ЦЛК-1) в течение 5 мин проводят подсчет Т-активных лимфоцитов способом, описанным выше для общих Т-клеток.

Содержание Т-активных лимфоцитов у 150 здоровых доноров составило: $34,6 \pm 1,92$ %, 840 ± 123 кл/мл.

Определение теофиллинчувствительности Т-клеток. Принцип. Препараты, повышающие уровень внутриклеточного цАМФ (теофиллин, аденозин), ингибируют реакцию спонтанного розеткообразования между зрелыми Т-лимфоцитами и эритроцитами барана.

Ход определения. Используемые реактивы и оборудование аналогичны для описанного выше метода определения Т-активных лимфоцитов. Исключение составляет теофиллин (химически чистое соединение), 0,3 М раствор которого на дистиллированной воде, подогретой до 60 °С, готовят каждый раз при постановке метода. Охлажденный до комнатной температуры теофиллин добавляют в инкубационную среду (без добавления сыворотки), термостатируют, центрифугируют и просчитывают клетки так же, как и Т-активные. Выявляют 2 субпопуляции: теофиллинчувствительные Т-клетки, т.е. лимфоциты, утратившие способность к розеткообразованию под влиянием обработки теофиллином, и теофиллинустойчивые Т-клетки.

У здоровых доноров соотношение теофиллинчувствительных и устойчивых Т-клеток составляет 1 : 3.

Выявление Т-лимфоцитов, образующих розетки с аллогенными и аутологичными эритроцитами. Принцип. Существуют субпопуляции лимфоцитов, образующих розетки с аллогенными и аутологичными эритроцитами.

Приборы, оборудование и реактивы описаны выше. Суспензию лимфоцитов выделяют уже описанным выше методом.

Эритроциты человека: необходимо использовать эритроциты 0(1) резусотрицательной группы крови. Следует брать, по возможности, кровь нескольких постоянных доноров. Приготовление эритроцитов аналогично описанному методу для эритроцитов барана. К взвеси лимфоцитов в тех же соотношениях добавляют одновременно эритроциты барана и эритроциты человека. Просчитывают лимфоциты, связавшие эритроциты и барана, и человека. Реакцию с аутологичными эритроцитами проводят так же, как с аллогенными.

6.6.2. В-лимфоциты

Определение В-клеток методом розеткообразования с эритроцитами барана в системе ЕАС. Принцип. Тимуснезависимые В-лимфоциты имеют на своей мембране специфические детерминанты, позволяющие дифференцировать их от Т-лимфоцитов. Таким детерминантом является поверхностный (мембранный) иммуноглобулин класса М. Число лимфоцитов, несущих иммуноглобулин А, G, E или D, крайне незначительно (A — 1—5 %, D и E — 2—4 %), рецепторы для Fc-фрагмента иммуноглобулина G для третьего компонента комплемента (C3). Выделяют и другие специфические рецепторы, в частности для вируса Эпштейна—Барр, плазмоклеточный антиген, антиген Ia. Однако последние не нашли еще отражения в клинической практике. Чаще применяется метод выявления В-клеток по их способности образовывать розетки с бараньими эритроцитами, нагруженными антителами в среде комплемента. Такие эритроциты маркируют и Fc, и C3 рецепторы В-лимфоцитов.

Приборы и реактивы те же, что и для метода определения Т-лимфоцитов. Аналогично готовят и суспензию лимфоцитов.

Антисыворотку, содержащую антитела к эритроцитам, готовят путем иммунизации кролика эритроцитами барана или быка. Кролику в краевую вену уха вводят 3—5 мл 50 % суспензии эритроцитов. На 4—6-й день у него берут кровь и получают сыворотку, которая в этот период на высоте иммунного ответа преимущественно содержит антитела класса М. Наилучший эффект получают при работе с гамма-глобулиновой фракцией сыворотки, которую получают высадиванием в насыщенном растворе аммиака или риванола. Антисыворотку инактивируют и определяют ее гемолитический и агглютинационный титр.

Можно использовать готовую и широко доступную кроличью гемолитическую сыворотку.

Комплект. Источником комплемента служат свежие сыворотки мышей. Беспородных мышей декапитуруют, кровь сливают в пробирку, получают сыворотку, которую затем сорбируют пулом человеческих эритроцитов и определяют активность комплемента в гемолитической системе.

Сенсибилизация эритроцитов. Смешивают равные объемы 1 % взвеси бараньих эритроцитов (предпочтительнее эритроциты быка) и антисыворотки к виду эритроцитов, ис-

пользуемых в реакции (или кроличьей гемолитической сыворотки) в субагглютинирующем разведении. Смесь инкубируют 40 мин при 37 °С, осторожно встряхивая каждые 10 мин. После термостатирования эритроциты трижды отмывают фосфатным буфером до 10 мин при 1500 об/мин. Супернатант отбрасывают, а к осадку добавляют первоначальный объем фосфатного буфера и равный объем абсорбированной мышиной сыворотки, содержащей комплекс в разведении 1 : 10. Смесь помещают в термостат при 37 °С на 30 мин. Вновь эритроциты трижды отмывают. При отмывании их центрифугируют осторожно при 1000 об/мин 5 мин, чтобы не вызвать агглютинации эритроцитов. Готовят 0,5 % суспензию эритроцитов и просматривают под микроскопом. При наличии агглютинации эритроцитов суспензия непригодна. Готовые эритроциты, нагруженные антителами и комплектом (ЕАС), можно хранить в холодильнике (4 °С) 4–5 дней.

Определение ЕАС лимфоцитов. К 0,1 мл взвеси лимфоцитов добавляют 0,1 мл сенсibilизированных эритроцитов. Оптимальное соотношение эритроцитов к лимфоцитам равно 20 : 1. Смесь инкубируют 45 мин при 37 °С, после чего пробирку помещают в лед. Подсчет В-клеток проводят описанным выше способом (см. «Определение Т-клеток»).

Клиническое значение. Из рекомендаций ВОЗ и нашего более чем 10-летнего опыта определения Т- и В-клеток при различных заболеваниях ясно, что информативность этого вида иммунологического анализа ограничена. Это исследование абсолютно показано при первичных иммунодефицитных состояниях не только для их типирования, но и для дифференцирования от вторичных иммунодефицитных состояний. Диагностическая значимость подсчета Т- и В-лимфоцитов выявлена при идентификации лимфопролиферативных расстройств. Учитывая то обстоятельство, что лимфоциты при различных стрессорных воздействиях под влиянием эндогенных гормонов некоторых лекарственных препаратов мигрируют из периферической крови в лимфоузлы, лимфоидные органы, рыхлую соединительную ткань, широкое применение исследований Т- и В-клеток крови в клинической практике малообоснованно. Диагностическую ценность несут исследования этих лимфоцитов в синовиальной жидкости при ревматоидном артрите, в моче при верификации определенных форм поражения почек. Очевидна необходимость изучения реакции Т-клеток на различные медикаментозные препараты, используемые в настоящее время клиникой в качестве иммуномодуляторов, для объективизации их назначения в каждом конкретном случае. Выявление значительного снижения Т-клеток может способствовать утверждению в диагнозе амилоидоза. Можно ожидать, что изучение субпопуляций Т-лимфоцитов, их соотношения друг с другом и в общем пуле лимфоцитов будет более информативно в оценке ряда патологических состояний и эффективности выбранной терапии.

Т-активная субпопуляция представляет собой преимущественно клетки, несущие супрес-

сорную функцию (есть исследования, характеризующие их и как клетки-помощники). Теофиллинчувствительные клетки представлены субпопуляцией супрессоров, а теофиллинустойчивые — клетками-помощниками. Т-клетки, образующие розетки с аутоэритроцитами, как полагают, несут киллерную функцию и играют основную роль в механизмах аутоагрессии.

Изучение динамики эффекторных звеньев клеточного иммунитета отражает активность процесса, помогает правильно подобрать терапию, уточнить механизмы медикаментозной чувствительности. Но, как правило, эти методы используют для научных исследований.

6.6.3. Реакция миграции лейкоцитов

Принцип. Подвижность лейкоцитов периферической крови, их миграция к очагам тканевой деструкции, хемотаксис к ауто- и гетероантигенам, перераспределение между лимфоидными органами при стрессорно-адаптивных реакциях являются составляющей компонентой общей системы реактивности, способности к сохранению постоянства внутренней среды.

Сенсibilизированные к определенному антигену лимфоциты резко снижают скорость подвижности в среде, в которую вносят этот антиген. Реакция осуществляется при непосредственном взаимодействии антигенспецифических рецепторов с антигеном, а также через воздействие фактора, ингибирующего миграцию клеток, выделяющегося при контакте со специфическим антигеном. Этот феномен позволяет продемонстрировать органоспецифическую клеточно-опосредованную гиперчувствительность.

Реакция торможения миграции агармиграционным тестом. Приборы и оборудование. 1. Пластиковые или стеклянные чашки диаметром 50 мм. 2. Пробойники для агара диаметром 2,5 мм. 3. Проекционный аппарат «Микрофот» типа СПО-1.

Реактивы. 1. Агар-агар (способ приготовления и очистки см. выше). 2. Трис-хлоридный буфер рН 7,3. 3. Среда 199. 4. Сыворотка крупного рогатого скота. 5. Гепарин. 6. Антибиотики (для консервации), нетоксичные для клеток.

Ход реакции. 3% агар-агар на изотоническом растворе натрия хлорида, забуференном трис-хлоридным буфером рН 7,3, охлажденном до 50 °С, добавляют к 10 мл смеси: 9 мл среды 199, 1 мл сыворотки крупного рогатого скота, 3000 ЕД мономицина (смесь предварительно прогревают до 37 °С). Полученный гель разливают в чашки (если используются стеклянные, то их необходимо силиконировать), установленные строго горизонтально в количестве, необходимом для создания слоя толщиной 2 мм. В затвердевшем геле пробивают лунки (2,5 мм) в количестве, обусловленном опытом. Концентрацию антигена, которую необходимо внести в смесь, высчитывают опытным путем (по дозе, вызывающей наименьший разброс в повторных постановках) для каждого антигена и серии опытов.

Выделение лейкоцитов. В пробирку помещают 10 мл гепаринизированной крови обследуемого (25 ЕД гепарина на 1 мл крови). В течение 1 ч пробирку выдерживают в термостате 37 °С под углом 45°. Через 50 мин пробирки переводят в вертикальное положение и выдерживают еще 10 мин. После отстаивания плазму осторожно отсасывают и переносят в центрифужную пробирку. Центрифугируют 5 мин при 1000 об/мин. Надосадочную жидкость удаляют. Примесь эритроцитов в клеточном осадке лиэзируют в гипотоническом растворе хлорида натрия, для чего к клеточному осадку добавляют 5 мл 0,35 % раствора и осторожно пастеровской пипеткой ресуспендируют клетки, не допуская образования пены, в течение 30–45 с. После экспозиции к суспензии клеток немедленно добавляют 0,6 мл 5 % раствора хлорида натрия и тщательно перемешивают. В результате раствор становится изотоничным. Полученную взвесь лейкоцитов трижды отмывают средой 199 или фосфатным буфером рН 7,4.

Контрольные и опытные исследования проводят в 4 параллельных лунках, внося в каждую из них по 5 мкл ресуспендированной лейкоцитарной взвеси (1,5 млн. клеток). Через 20 ч инкубации чашек в термостате при 37 °С их заливают 10 % раствором формалина (в целях фиксации клеток). Через 4 ч слой агара осторожно удаляют, чашки промывают и высушивают. Результаты учитывают путем проектирования полей миграции на бумагу с помощью аппарата «Микрофот». Индекс миграции (И) определяют по расчету соотношения величин площадей миграции в опыте и контроле по формуле:

$$ii = \frac{D_0^2}{D_1^2} \frac{d_1^2}{d_2^2}$$

где D_0 — средний диаметр 4 зон миграции в опыте; D_1 — средний диаметр 4 зон миграции в контроле; d_1 — средний диаметр 4 центральных лунок в опыте; d_2 — средний диаметр 4 центральных лунок в контроле.

Реакция торможения миграции лейкоцитов в прямом капиллярном тесте. Выделение лейкоцитов проводят аналогично описанному выше. Выделенные лейкоциты ресуспендируют в 0,1 мл среды 299 или фосфатного буфера. Этой клеточной взвесью заполняют стеклянные капилляры с внутренним диаметром 0,7 мм и длиной 12 см (капилляры необходимо точно калибровать, так как от этого зависит стандартизация объемов клеточной взвеси). С одного конца капилляр запаивают и центрифугируют при 1000 об/мин в течение 5 мин. Концы капилляров, содержащие клетки, нарезают кусочками по 5–6 мм и погружают в стеклянные камеры, заполненные средой 199, закрепляя их в центре с помощью вазелина, предварительно нанесенного на дно камеры. Камеру герметически закрывают (притирают с вазелином) покровным стеклом и помещают в термостат при 37 °С на 20 ч в строго горизонтальном положении. Оба конца капилляра открыты (камеры готовят из стеклянных колец 20X10X2 мм, фиксированных на предметных стеклах смесью воск-парафин). Концентрацию вносимого антигена рассчиты-

вают экспериментально и определяют в мкг/мл по концентрации белка. На каждую концентрацию антигена и контроль используют по 2 капилляра и соответственно получают 4 зоны миграции. Измерение зон миграции, исчисление их площади проводят различными способами. Наиболее распространен метод проектирования чашек (камер) с мигрирующими лейкоцитами, образующими облачко над капилляром, с использованием фотопроектора на миллиметровую бумагу или фотопленку. Проекцию зоны миграции обводят карандашом и высчитывают планиметром или (при использовании рентгеновской пленки) вырезают и взвешивают. Индекс миграции (И) определяют по формуле:

$$И = \frac{\text{средний вес зон миграции в опыте}}{\text{средний вес зон миграции в контроле}}$$

Приготовление и очистка антигенов достаточно полно отражены в ряде руководств (см. рекомендованную литературу).

Клиническое значение. Выявление сенситизированных к определенному антигену лимфоцитов говорит об участии этого антигена в развитии специфической гиперчувствительности и в ряде случаев может быть использовано в диагностике опухолей, гломерулонефрита, дифференциальной диагностике неспецифических миокардитов и кардиопатий.

Литература. Петров Р. В. Иммунология.— М.: Медицина, 1982; *Руководство по иммунологии* / Под ред. О. Е. Вязова, III X. Ходжаева.— М.: Медицина, 1973; *Лимфоциты*. Выделение, фракционирование и характеристика / Под ред. Д. Натвига, П. Перлмана, X. Вигзеля.— М.: Медицина, 1980.

6.6.4. Фагоцитарная активность нейтрофилов периферической крови

Принцип. Полиморфоядерные лейкоциты, моноциты периферической крови способны связывать на своей поверхности, поглощать и переваривать микробную тест-культуру.

Обычно используют стафилококк штамма 209. Однако он практически не подвергается внутриклеточному перевариванию и исключает прямое изучение этой функции фагоцитоза. Мы рекомендуем использовать штамм 9198.

Посуда и оборудование. (Химические пробирки. 2. Предметные стекла. 3. Шлифовальное предметное стекло. 4. Пипетки мерные. 5. Микроскоп. 6. Центрифуга.

Реактивы. 1. Метанол. 2. Красители: азур II, эозин. 3. Глицерин. 4. Среда 199. 5. Смесью донорских сывороток (2–3) АВ(IV) группы. 6. Изотонический раствор хлорида натрия. 7. Набор стандартов для определения концентрации микробных тел по мутности. 8. Суточная культура *Staphylococcus epidermidis* шт. 9198.

Ход определения. В стерильную пробирку с заранее внесенным раствором 0,6 мл ге-

парина (G. Richter), разведенного 1 : 10, вносят 10 мл крови из кубитальной вены. Кровь тщательно перемешивают и центрифугируют 10 мин при 1000 об/мин. Плазму вместе со слоем лейкоцитов осторожно отсасывают и помещают в чистую центрифужную пробирку, добавляя 5–6 мл среды 199. Лейкоциты отмывают центрифугированием 10 мин при 1000 об/мин. Надосадочную жидкость удаляют, а находящиеся в осадке лейкоциты ресуспендируют в среде 199 дважды, каждый раз повторяя процедуру «Мягкого» центрифугирования. После последнего центрифугирования пипеткой отсасывают надосадочную жидкость и часть клеточной взвеси, оставив в центрифужной пробирке 0,2 мл (10×10^6 кл/мл) клеточной взвеси в среде 199. С косога агара с суточной культурой стафилококка стерильным изотоническим раствором натрия хлорида смывают колонии микробов. Используя стандарт оптической мутности, разводят микробную взвесь до концентрации 1 млрд. микробных клеток в 1 мл; 0,3 мл этой взвеси вносят в пробирку, содержащую 0,2 мл лейкоцитов в среде 199, и добавляют 0,15 мл пула свежих донорских сывороток АВ(IV) группы (для опсонизации). Осторожным ротированием перемешивают компоненты и термостатируют 30 мин при 37 °С. По истечении указанного времени в пробирку добавляют 5 мл прогретого до 37 °С изотонического раствора натрия хлорида, встряхивают и центрифугируют 10 мин при 1500 об/мин. По окончании центрифугирования надосадочную жидкость удаляют и делают мазки из лейкоцитарной взвеси, остатки которой вновь помещают в термостат при 37 °С для продолжения инкубации еще в течение 90 мин. Затем мазки приготавливают повторно из осадка двухчасовой инкубации.

Мазки готовят как обычно, на тщательно вымытых обезжиренных предметных стеклах. Каплю лейкоцитарной взвеси помещают недалеко от края стекла и шлифованным предметным стеклом, поставив его под углом 45° к поверхности впереди капли и подождав, пока капля равномерно распределится вдоль его ребра, легким быстрым движением проведат вперед, не отрывая от предметного стекла раньше, чем иссякнет вся капля.

Правильно сделанный мазок имеет равномерно матовый оттенок, не достигает краев стекла и заканчивается остроконечными язычками.

Приготовленные мазки сушат на воздухе, затем фиксируют 10 мин в абсолютном метиловом спирте и красят по Романовскому—Гимзе азур-эозинном.

Состав готового красителя: азур II — 3 г, водорастворимый желтый эозин — 0,8 г, метиловый спирт — 250 мл и глицерин — 250 мл. Для окраски мазков берут 2 капли основного раствора красителя на 1 мл дистиллированной воды.

Можно готовить краску непосредственно перед окрашиванием мазков из азура II, эозина и дистиллированной воды в соотношении 3 : 2 : 5. На один мазок наслаивают 3 мл раствора красителя. Длительность окраски 45–50 мин.

После окрашивания мазки просматривают

под микроскопом в иммерсионной системе (считают не менее 200 клеток) и производят расчет показателей фагоцитоза.

1. Фагоцитарный индекс (ФИ) — процент клеток, вступивших в фагоцитоз, от общего их числа.

2. Фагоцитарное число (ФЧ) — среднее число бактерий, находящихся внутриклеточно (частное от деления общего числа поглощенных бактерий на число клеток, вступивших в фагоцитоз).

3. Оба показателя рассчитывают на мазках, сделанных после 30- и 90-минутной (т. е. в общей сложности 120-минутной) инкубации, иными словами, речь идет о ФИ30 и ФИ120, соответственно ФЧ30 и ФЧ120.

4. Коэффициент фагоцитарного числа:

$$КФЧ = \frac{ФЧ30}{ФЧ120}$$

5. Индекс бактерицидности нейтрофилов:

$$ИБН = \frac{Ч_y}{Ч_n} \cdot 100,$$

где $Ч_y$ — число убитых внутри фагоцитов микробов; $Ч_n$ — общее число поглощенных фагоцитами микробов.

6. Опсонический индекс поглощения:

$$ОИП = \frac{ФЧ30 \text{ (сыворотка больного)}}{ФЧ30 \text{ (сыворотка донора)}} \cdot 100.$$

Нормальные величины: ФИ30 94,18+1,55%; ФИ120 92,00+2,52%; ФЧ30 11,29+1,00%; ФЧ120 9,81+0,96%; КФЧ 1,16+0,04%; ИБН 66,3+2,58%.

Клиническое значение. Изучение показателей фагоцитоза имеет значение в комплексном анализе диагностики иммунодефицитных состояний: часто рецидивирующие гнойные воспалительные процессы, длительно не заживающие раны, склонность к послеоперационным осложнениям. Помогает в диагностике вторичных иммунодефицитных состояний, вызванных лекарственной терапией. В связи с тем что фагоциты участвуют в элиминации иммунных комплексов и активность фагоцитоза тесно связана с активностью компонентов комплемента, а именно С3, концентрацией IgG антител, наличием других опсонизирующих факторов, исследование фагоцитоза играет роль в диагностике, оценке активности и эффективности терапии при ревматических болезнях, коллагенозах.

Наиболее информативным для оценки фагоцитарной активности следует считать индекс поглощения, т. е. фагоцитарное число, коэффициент фагоцитарного числа, которые отражают завершенность фагоцитоза и индекс бактерицидности — способность фагоцита переваривать захваченный микроб. Особое значение в выявлении причин изменений фагоцитарной активности имеет определение опсонического индекса поглощения, так как он характеризует наличие сывороточных факторов, сопутствующих миокардитам, ревматизму, ревматоидному артриту и др., способных изменить активность иммуннокомпетентных и фагоцитирующих клеток.

Раздел 7

МЕТОДЫ КЛИНИЧЕСКОЙ МИКРОБИОЛОГИИ

7. 1. ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ

Микробиологические исследования при гнойно-воспалительных заболеваниях проводят с целью их диагностики, изучения этиологической структуры, определения чувствительности возбудителей к антибактериальным препаратам. Результаты микробиологического исследования способствуют выбору наиболее эффективного препарата для антибактериальной терапии, своевременному проведению мероприятий для профилактики внутрибольничных инфекций.

Возбудителями гнойно-воспалительных заболеваний (ГВЗ) наиболее часто являются условно-патогенные микроорганизмы (УПМ), входящие в состав естественной микрофлоры человека или попадающие извне. УПМ вызывают заболевания преимущественно у людей с пониженной иммунологической реактивностью, этиологическая структура их непостоянна, часто встречаются ассоциации микроорганизмов.

Микробиологические исследования при заболеваниях, вызванных УПМ, направлены на выделение всех микроорганизмов, находящихся в патологическом материале, что существенно отличает их от аналогичных исследований при заболеваниях, вызванных истинно патогенными микроорганизмами, когда проводится поиск определенного возбудителя.

Для получения адекватных результатов анализа при ГВЗ особенно важно соблюдать ряд требований при взятии материала для исследования, его транспортировке в лабораторию, проведения анализа и оценки его результатов.

7.1.1. Сбор и транспортировка проб

При взятии материала для проведения микробиологического исследования необходимо соблюдать ряд правил.

1. Брать материал до начала антибактериальной терапии или через определенный промежуток времени после введения препарата, необходимый для его выведения из организма (практически через 8—10 ч после введения большинства антибиотиков уже выводится из организма).

2. Брать материал непосредственно из очага инфекции или исследовать соответствующее отделяемое (гной из фистулы, мочу, желчь и пр.).

3. Брать материал во время наибольшего содержания в нем возбудителей заболевания: например, кровь для выделения гемокультуры

в начале озноба, при повышении температуры и т. п.

4. Соблюдать строжайшую асептику во избежание загрязнения пробы микрофлорой окружающей среды.

5. Материал для выделения аэробов и факультативных анаэробов брать стерильными ватными тампонами (отделяемое из раны, мазки со слизистых оболочек, из глаза, носа, зева, цервикального канала, влагалища, анального отверстия), шприцем (кровь, гной, экссудаты), непосредственно в стерильную посуду (моча, мокрота, фекалии) (подробно см. соответствующие разделы).

Материал для выделения строгих анаэробов получают из патологического очага путем пункции шприцем, из которого предварительно удален воздух; при исследовании кусочков ткани их берут из глубины очага. При необходимости использовать тампоны их нужно сразу после взятия материала погружать в транспортную среду.

6. Количество материала должно быть достаточным для проведения исследования, и для его повторения в случаях необходимости.

7. Транспортировку нативного клинического образца в лабораторию следует производить в максимально короткие сроки — это определяет эффективность микробиологического исследования. При длительном хранении материала происходит гибель наиболее требовательных к питательным веществам видов микробов, начинают размножаться менее требовательные и быстро растущие виды, что приводит к нарушению количественного соотношения видов и дезориентирует врача-микробиолога при интерпретации полученных результатов. Если материал нельзя немедленно транспортировать в лабораторию, хранить его следует в холодильнике или использовать транспортные среды.

Клинические образцы для культивирования строгих анаэробов следует транспортировать в лабораторию, максимально защищая их от воздействия кислорода воздуха. Используют специальные флаконы, заполненные газом, не содержащим кислорода. Уколом иглы через резиновую крышку, плотно завальцованную, во флакон вносят исследуемый материал. Материал

См. с. 313.

можно транспортировать прямо в шприце, на кончик которого надета стерильная пробка.

Транспортировку материала осуществляют также в транспортных средах (например, в смеси лизированной крови донора 10 %, глицерина 10 %, изотонического раствора хлорида натрия 80 %).

Материал для микробиологического исследования транспортируют в специальных биксах, пеналах и т. п.

7.2. ПРОВЕДЕНИЕ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ

7.2.1. Микроскопическое исследование мазка

Микроскопию мазка, окрашенного по Граму или другими красителями, проводят при исследовании мокроты, гноя, отделяемого из ран, слизистых оболочек (мазок из зева, носа, глаза, цервикального канала и пр.) и некоторых других клинических образцов. Это позволяет ориентировочно судить о характере микрофлоры, ее количественном содержании и соотношении разных видов микроорганизмов в патологическом материале. Иногда микроскопия помогает выявить микроорганизмы, плохо растущие на обычных питательных средах. На основании данных микроскопии проводят выбор набора питательных сред для выделения микробов, обнаруженных в мазке.

7.2.2. Культивирование микроорганизмов

Посев исследуемого материала на питательные среды производят с целью выделения чистых культур микроорганизмов, определения их таксономического положения, чувствительности к антибактериальным препаратам. Используют питательные среды, позволяющие выделить наибольшее количество видов микроорганизмов: оптимальными являются питательные среды, содержащие кровь животного или человека, а также сахарный бульон, среды для анаэробов. Одновременно производят посев на дифференциально-диагностические и селективные среды для выделения определенных групп микроорганизмов, изучения свойств культур. Посевы инкубируют при 35—37 °С 18—24 ч или при других режимах, учитывая требовательность культивируемых микроорганизмов к Сь, ССь. Для культивирования строгих анаэробов используют анаэробостаты.

Количественную обсемененность материала микрофлорой устанавливают по числу колониеобразующих единиц (КОЕ) в 1 мл или 1 мг испытуемого образца.

Важным этапом бактериологической диагностики является получение каждого микроба в чистой культуре для дальнейшего изучения. Выделение чистых культур бактерий в значительной степени определяется правильностью распределения посевного материала на плотных пита-

8. К клиническому образцу, направляемому в лабораторию, прилагают сопроводительный документ, содержащий основные сведения, необходимые для проведения микробиологического исследования (характер материала, фамилия, имя и отчество больного, название учреждения или отделения, номер истории болезни, предполагаемый диагноз заболевания, предшествующая антимикробная терапия, дата и время взятия материала, подпись врача, направляющего материал на анализ).

тельных средах. Специальный прием в виде штрихового последовательного посева на чашку, разделенную на 3 части, обеспечивает такое распределение микробов, что из одной клетки в процессе ее роста и размножения формируется отдельная колония. Посевы культивируются при 37 °С, учитывая требовательность бактерий к кислороду, наличию CO₂ или анаэробных условий.

Выявляют некоторые особенности изменения цвета среды, ее просветления в процессе роста культур. Многие группы микробов образуют характерные формы колонии, выделяют пигменты, которые окрашивают колонии или среду вокруг них; колонии изучают визуально, отмечая форму, величину, характер края, поверхностей, консистенцию. Из каждой колонии делают мазки, окрашивают по Граму и микроскопируют в световом микроскопе с иммерсией при увеличении в 700—900 раз. Оценивают однородность клеток, форму и размер, наличие спор или других включений, капсулы, расположение клеток (одиночное, парное, гроздь, цепочки), отношение к окраске по Граму, интенсивность и равномерность распределения краски в клетке.

Колонии отсевают на плотные, жидкие, полужидкие питательные среды, оптимальные для культивирования определенного вида микробов. Выделенные чистые культуры подвергают дальнейшему изучению в диагностических тестах, основанных на морфологических, ферментативных, биологических свойствах и антигенных особенностях, характеризующих представителей соответствующего семейства, рода, вида, варианта.

7.2.3. Дифференциация и идентификация бактерий — возбудителей гнойно-воспалительных заболеваний

Идентификация — это комплекс бактериологических и бактериологических методов изучения бактерий, позволяющий определить их систематическое положение в соответствии с современным кодом и номенклатурой микроорганизмов.

Для подтверждения этиологической значимости выведенных микробов при заболевании определение рода и вида, к которому они относятся, является обязательным и должно быть

отражено в названии в виде биномиального наименования, например *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Escherichia coli*.

Дальнейшее подразделение на био-, серо-, фаго-, колициноварианты позволяет маркировать выделенные штаммы, что помогает в оценке их этиологической роли, определении идентичности культур, выделенных из разных источников, при проведении эпидемиологического обследования в лечебных учреждениях.

7.2.4. Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам

Чувствительность к антимикробным препаратам изучают у культур микроорганизмов, имеющих этиологическое значение. Определение антибиотграмм помогает лечащему врачу правильно выбрать препарат для лечения больного.

7.2.5. Серологические методы исследования

Применяют для диагностического подтверждения бактериальных инфекций в случаях невозможности выделения возбудителя заболевания или установления его этиологической роли. Нарастание титра антител в сыворотке больных не менее чем в 3—4 раза подтверждает диагноз заболевания.

7.2.6. Оценка результатов исследования

Принадлежность УПМ к естественной микрофлоре организма человека создает ряд трудностей при оценке этиологической роли. УПМ могут представлять нормальную микрофлору ис-

следуемых жидкостей и тканей или контаминировать их из окружающей среды. Поэтому для правильной интерпретации результатов исследования необходимо знать состав естественной микрофлоры изучаемого образца. В тех случаях, когда исследуемый материал в норме стерилен, как, например, кровь, ликвор, экссудаты, все выделенные из него микробы могут считаться возбудителями заболевания. В тех случаях, когда исследуемый материал имеет собственную микрофлору, как, например, фекалии, мокрота и пр., нужно учитывать изменения ее качественного и количественного состава, появление несвойственных данному биотопу видов микроорганизмов, количественную обсемененность материала. Так, например, при микробиологическом исследовании мочи степень бактериурии (число микробных клеток в 1 мл мочи), равная и выше 10^5 , свидетельствует об инфекции мочевых путей. Более низкая степень бактериурии встречается у здоровых людей и является следствием загрязнения мочи естественной микрофлорой мочевых путей.

Установить этиологическую роль условно-патогенной микрофлоры помогают также нарастание количества и повторность выделения микробов одного вида от больного в процессе заболевания. Существенную помощь оказывают изучение патогенных свойств выделенных культур, принадлежность их к определенным био-, серо-, фаговариантам.

При интерпретации данных микробиологического анализа следует учитывать клинику заболевания, антибактериальную терапию, предшествующую исследованию. Стерильность посева или скудность роста в изучаемых пробах может быть следствием антибактериальной терапии, так же как изменение микробного пейзажа в жидкостях и тканях организма, имеющих собственную микрофлору. Особое внимание при оценке результатов анализа следует обращать на правильное взятие материала для исследования и быстроту его транспортировки в лабораторию.

7.3. ИССЛЕДОВАНИЕ БИОЛОГИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА

7.3.1. Кровь

Микробиологическое исследование крови производят при заболеваниях, связанных с проникновением микроорганизмов в ток крови. В норме кровь человека стерильна. В ток крови микробы попадают в результате осложнения при ряде заболеваний, при переливании крови и различных манипуляциях, когда развиваются сепсис, бактериемия, бактериальный шок. Исследование крови на содержание микроорганизмов следует проводить у больных с длительной неясной лихорадкой, особенно у людей с пониженной иммунологической реактивностью.

Этиология. Септицемия и бактериемия могут быть вызваны практически всеми микроорганизмами — патогенными и условно-патогенными. Среди грамположительных бактерий

наиболее частыми возбудителями сепсиса являются *Staph. aureus*, *Streptococcus* группы D, *Str. viridans*, *Str. pneumoniae*. Среди грамотрицательных преобладают *E. coli*, *Klebs. pneumoniae*, *Ps. aeruginosa*, *Bacteroides fragilis*. Из грибов чаще других встречается *Candida albicans*.

Взятие крови для исследования. Кровь для посева следует брать до начала антибактериальной терапии или через определенный промежуток времени (8—10 ч) после введения лекарственного препарата, необходимый для его выведения из организма. Если посев крови производят во время антибактериальной терапии, рекомендуется добавлять в питательные среды вещества, нейтрализующие действие лекарственных препаратов. Так, при пенициллинотерапии с этой целью можно использовать пенициллиназу, при применении цефало-

споринов — цефалоспорины, тетрациклинов — ионы магния, являющиеся антагонистами тетрациклина.

Кровь от больного для посева следует брать в начале озноба при подъеме температуры.

Кровь для посева берут из вены, строго соблюдая правила асептики. Для этого кожу на месте венопункции тщательно обрабатывают спиртом и йодом повторно. Шприцем, стерилизованным в автоклаве, набирают 10—15 мл крови (2—3 мл у маленьких детей), которую либо непосредственно у постели больного засевают в питательную среду, либо помещают в стерильную посуду, содержащую вещества, препятствующие свертыванию крови (0,3 % раствор цитрата натрия, 0,1 % оксалата натрия, 1 мл гепарина и др.). Материал быстро транспортируют в лабораторию, где производят дальнейшее исследование. Хранить кровь в холодильнике можно не более 1—2 ч, при более длительном хранении возможен лизис бактерий.

Проведение исследования. Производят посевы 5—10 мл крови на 50—100 мл жидкой питательной среды — 1 % сахарный бульон, «двухфазную» среду, а также жидкие и полужидкие среды для культивирования анаэробов¹. При подозрении на брюшной тиф или другие инфекции применяют специальные питательные среды [Биргер М. И., 1982]. Для количественного определения массивности обсеменения крови делают посев нескольких капель крови из шприца на поверхность чашки Петри с 5 % кровяным агаром. Посевы инкубируют в термостате в течение 10 дней. Просмотр посевов производят ежедневно. При наличии роста на питательных средах делают высевы на чашки с 5 % кровяным агаром, которые инкубируют в аэробных и анаэробных условиях. Из колоний, выросших на чашках с кровяным агаром, выделяют чистую культуру, идентифицируют ее и определяют чувствительность к антибиотикам. Посевы крови на «двухфазной» среде просматривают, наклоняя флакон и таким образом увлажняя поверхность скошенного агара бульоном с кровью. При этом исключается необходимость в высеве на плотные среды и снижается возможность загрязнения посевов. Во избежание высыхания питательных сред пробки флакона парафинируют. В таком виде флаконы можно выдерживать в течение месяца, что бывает необходимо при выделении медленно растущих микроорганизмов.

Однократный посев крови не всегда приводит к выделению гемокультуры. Более информативным является трехкратный посев крови с интервалами между посевами в сутки. У леченых больных кровь для посева следует брать 5—6 раз.

Оценка результатов микробиологического исследования крови зависит от вида выделенных микроорганизмов и массивности роста. Выделение патогенных видов с несомненной свидетельствует об их этиологической роли в заболевании. В том случае, когда из крови выделены УПМ, следует учитывать их коли-

чественное содержание (выделение единичных клеток чаще свидетельствует о контаминации), наличие монокультуры или ассоциации (ассоциации чаще выделяются при загрязнении посева, однако у больных со сниженной иммунологической реактивностью возможна смешанная инфекция), повторность выделения одной и той же культуры от больного и идентичность гемокультуры с культурами, выделенными из другого материала от этого же больного.

При окончательном заключении микробиолог должен сопоставить данные микробиологического исследования с клиникой заболевания и результатами других анализов.

Если через 10 дней после посева крови роста микробов на питательных средах не обнаружено, анализ можно считать отрицательным.

Среды для культивирования анаэробов. 1. Плотная питательная среда типа КАБ: 1 г твин 80, 2 г Na_2HPO_4 , 1 г растворимого крахмала, 1 г гидрокарбоната натрия растворяют при подогревании в 60 мл дрожжевого аутолизата. Раствор фильтруют, добавляют к 940 мл растопленного мясо-пептонного агара, хорошо перемешивают и автоклавируют в течение 20 мин при 0,5 атм. После фильтрации прибавляют 250 мг 1-цистеина гидрохлорида, 0,4 мл тиогликолевой кислоты и 6 г глюкозы; устанавливают рН 7,0—7,2, разливают в пробирки по 10 мл, стерилизуют при 0,5 атм 20 мин. Эту основу хранят в условиях холодильника. Перед использованием среду регенерируют 20 мин в кипящей водяной бане, быстро охлаждают до 50 °С, прибавляют 0,1 мл раствора гемина (50 мг гемина растворяют в 1 мл 1 н. NaOH, добавляют 100 мл дистиллированной воды, автоклавируют при 1 атм 15 мин); 1 мл лизированной двукратным замораживанием и оттаиванием цитратной крови донора перемешивают, выливают в чашку Петри, после застывания подсушивают 10—15 мин. Используют для посева или помещают для хранения в анаэробные условия при комнатной температуре. Для придания среде селективных свойств перед разливом в чашки прибавляют один из следующих антибиотиков: 75 мкг/мл неомицина или канамицина, 50 мкг/мл гентамицина, 40 мкг/мл налидиксовой кислоты (невиграмон, неграм).

2. Жидкая питательная среда. Ее основной состав и способ приготовления те же, что и для плотной среды. Однако вместо мясо-пептонного агара используют мясо-пептонный бульон (содержание агар-агара в среде 0,6 г/л). Приготовленную основу разливают по 100—150 мл во флаконы и стерилизуют при 0,5 атм 20 мин, хранят в холодильнике. Перед использованием среду регенерируют 20 мин на кипящей водяной бане, быстро охлаждают до 50 °С, прибавляют 1 мл раствора гемина (на 100 мл среды), 10—15 % по объему стерильной сыворотки крупного рогатого скота (можно использовать лошадиную сыворотку, стерильную асцитическую жидкость), разливают по 5 мл в пробирки и хранят в анаэробных условиях при комнатной температуре, выдержав предварительно микроанэростаты со средой при 37 °С в течение 2 сут для контроля стерильности среды. Используется так-

¹ См. с. 315.

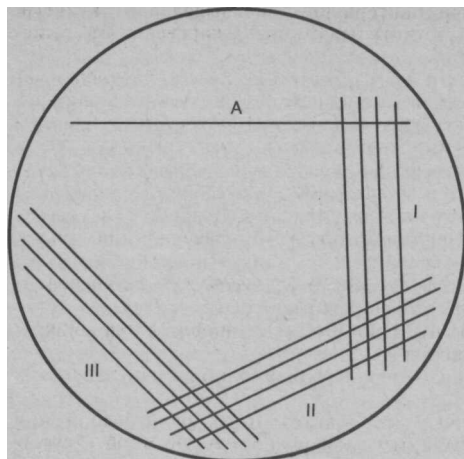


Рис. 14. Схема посева мочи секторным методом. А, I, II, III — последовательность посева мочи по секторам.

же стандартная «Питательная среда для контроля стерильности сухая», к которой добавляют растворимый крахмал, твин 80, гемин в количествах и способом, как указано выше. Готовые к употреблению среды хранят также в анаэробных условиях.

3. Желточная анаэробная среда. К 500 мл регенерированной плотной среды для анаэробов (основа), охлажденной до 60 °С, с соблюдением правил асептики прибавляют желток одного яйца (поверхность должна быть деконтаминирована погружением яйца на 1 ч в 96 % спирт; яйцо не должно содержать антибиотиков), перемешивают, разливают в чашки Петри. После застывания подсушивают, хранят в анаэробных условиях.

7.3.2. Моча

Микробиологическое исследование мочи производят при воспалительных заболеваниях мочепускающих путей.

Этиология. Наиболее частыми возбудителями воспалительных процессов мочевого тракта являются грамотрицательные бактерии: *E. coli*, *Proteus*, *Providencia*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Ps. aeruginosa*, *Serratia*, *Streptococcus* группы D. Возбудителями могут быть также *Staph. aureus*, *Staph. epidermidis*, *Candida albicans*, *Mycoplasma* и другие микроорганизмы.

Взятие мочи для исследования. Микробиологическое исследование мочи нужно проводить до начала антибактериальной терапии.

После тщательного туалета наружных половых органов в стерильную посуду собирают среднюю порцию свободно выпущенной мочи в количестве 3—5 мл. Взятие мочи с помощью катетера связано с риском инфицирования моче-

вых путей, поэтому его желательно избегать. Катетеризацию производят только в случаях необходимости — если больной неспособен помочиться или для разграничения воспалительного процесса в почках и мочевом пузыре. С этой целью мочевой пузырь опорожняют и вводят в него 50 мл раствора, содержащего 40 мг неомицина и 20 мг полимиксина. Через 10 мин берут пробы мочи для исследования. При локализации процесса в мочевом пузыре моча остается стерильной, при инфекции в почках отмечается бактериурия.

Мочу можно получить от больного путем надлобковой пункции мочевого пузыря. Этот метод взятия мочи дает наиболее достоверные результаты исследования, однако имеется опасность инфицирования больного.

Микробиологическое исследование мочи надо проводить как можно быстрее после ее получения от больного, с тем чтобы избежать размножения находящихся в ней микроорганизмов. Размножение микробов в моче до начала анализа приводит к ложным результатам при количественном определении бактериурии и может дезориентировать в отношении возбудителя заболевания. Если немедленное исследование мочи невозможно, то ее следует хранить в холодильнике при 4 °С не более суток.

Проведение исследования. Определяют степень бактериурии — количество колониеобразующих единиц (КОЕ) в 1 мл мочи методом секторных посевов мочи. Платиновой петлей диаметром 2 мм (емкостью 0,005 мл) производят посев мочи — 3—4 штриха на сектор чашки Петри с простым агаром (рис. 14). После этого петлю прожигают и производят 4 штриховых посева из сектора А в сектор I и аналогичным образом из сектора I в сектор II и из сектора II в сектор III (каждый раз прожигая петлю). Чашки инкубируют при 37 °С 18—24 ч, после чего подсчитывают число колоний, выросших в разных секторах. Определение степени бактериурии по количеству выделенных колоний производят согласно табл. 47.

Колонии, выросшие на плотной питательной среде, отсеивают в пробирки со скошенным агаром, выделенную чистую культуру идентифицируют и определяют ее чувствительность к антибактериальным препаратам.

Ускоренные методы определения степени бактериурии основаны на определении продуктов метаболизма, образующихся при размножении микроорганизмов в моче. Они дают менее точные результаты, чем метод секторных посевов, и используются преимущественно при массовых профилактических обследованиях больших континентов людей или для экспресс-диагностики. При положительном результате, полученном ускоренными методами, необходимо дальнейшее исследование с помощью более точного бактериологического метода.

Нитратный тест. Нитриты, являющиеся продуктами метаболизма представителей семейства энтеробактерий, могут быть обнаружены в моче с помощью реактива Грисса. Готовят два раствора: а) 1,25 г сульфаниловой кислоты раство-

Таблица 47. Определение степени бактериурии методом секторных посевов

Сектор А	Количество колоний в секторах			Количество бактерий в 1 мл мочи
	I	II	III	
1-6	—	—	—	Менее 1000
8-20	—	—	—	3000
20-30	—	—	—	5000
30-60	—	—	—	10000
70-80	—	—	—	50 000
100-150	5-10	—	—	100000
Не сосчитывается	20-30	—	—	500 000
То же	40-60	—	—	1 000 000
» »	100-140	10-20	—	5 000 000
» »	Не сосчитывается	30-40	—	10000000
» »	То же	60-80	Единичные колонии	100000000

ряют в 500 мл 30 % уксусной кислоты; б) 2,5 г а-нафтиламина растворяют в 500 мл 30 % уксусной кислоты. Оба раствора хранят в защищенном от света месте.

Непосредственно перед исследованием оба раствора смешивают в равных количествах, 1 мл смеси добавляют к 1 мл мочи. Появление красного окрашивания свидетельствует о присутствии в 1 мл мочи не менее 10^7 микробных клеток.

ТТХ-тест. Трифенилтетразолия хлорид (ТТХ) под действием продуктов жизнедеятельности микроорганизмов переходит из бесцветного в красный нерастворимый в воде трифенилформазан. Интенсивность окраски находится в прямой зависимости от степени бактериурии.

Готовят три раствора: 1) насыщенный раствор двузамещенного фосфата натрия; 2) 750 мл ТТХ растворяют в 100 мл раствора 1; 3) рабочий раствор: 4 мл раствора 1 смешивают со 100 мл раствора 2. Хранят растворы в прохладном защищенном от света месте. Срок хранения растворов 1 и 2 — до 2 мес, рабочего раствора — не более 2 нед.

При постановке реакции пользуются стерильной посудой.

К 2 мл мочи прибавляют 0,5 мл рабочего раствора и помешают после перемешивания в термостат при 37 °С. После 4-часовой инкубации учитывают результаты. Появление на дне пробирки красного осадка свидетельствует о наличии в 1 мл мочи не менее 10^7 микробных клеток.

Ускоренные методы позволяют дать немедленный ответ. При использовании бактериологических методов лаборатория дает предварительный ответ через день — после получения результатов определения степени бактериурии и окончательный — через 3-4 дня, после выделения микроорганизмов, их идентификации и определения чувствительности к антибактериальным препаратам. В окончательном ответе указывают

степень бактериурии, вид выделенных культур, их чувствительность к лекарственным веществам.

Оценка результатов. Основная задача при интерпретации полученных данных заключается в доказательстве этиологической роли микроорганизмов, выделенных из мочи. Учитывают комплекс тестов: степень бактериурии, вид выделенных культур, повторность их выделения в процессе заболевания, присутствие в моче монокультуры или ассоциации микроорганизмов.

Степень бактериурии позволяет дифференцировать инфекционный процесс в мочевых путях от контаминации мочи нормальной микрофлорой.

Оценку производят на основании следующих критериев.

1. Степень бактериурии, не превышающая 10^3 КОЕ/мл мочи, свидетельствует об отсутствии воспалительного процесса и обычно является результатом контаминации мочи.

2. Степень бактериурии, равная 10^4 КОЕ/мл, расценивается как сомнительный результат. Исследование следует повторить.

3. Степень бактериурии, равная и выше 10^5 КОЕ/мл мочи, указывает на наличие воспалительного процесса.

Изменение степени бактериурии в процессе заболевания может быть использовано для контроля за течением процесса и эффективностью терапии: уменьшение степени бактериурии свидетельствует о благоприятном течении заболевания и эффективности использованных лекарственных препаратов.

В некоторых случаях у больных, получающих антибактериальную терапию, при плохом оттоке мочи, при ее низкой относительной плотности и рН ниже 5,0 может наблюдаться низкая степень бактериурии при имеющемся заболевании. Поэтому, помимо степени бактериурии, следует учитывать вид выделенных из мочи микроорганизмов. Эшерихии, протей, синегнойная палочка, клебсиеллы чаще выделяются из мочи больных уроинфекцией. Дифтероиды, лактобациллы и другие грамположительные палочки обычно выделяются из мочи здоровых людей. Повторное выделение из мочи культуры одного вида, типа, варианта свидетельствует о инфекционном процессе.

Монокультура чаще выделяется при острых воспалительных процессах и коррелирует с высокой степенью бактериурии. Ассоциации микроорганизмов чаще встречаются при хронических процессах.

При окончательной оценке результатов микробиологического исследования мочи необходимо учитывать данные клиники и другие лабораторные анализы.

7.3.3. Отделяемое при инфекциях нижних дыхательных путей

Микробиологическое исследование проводят при воспалительных заболеваниях дыхательных путей: пневмонии, бронхитах, плевритах, бронхоэктатической болезни, абсцессе легкого и др.

Этиология. Возбудителями воспалительных процессов нижних дыхательных путей могут быть бактерии, микоплазмы, вирусы, риккетсии, грибы и простейшие. Наиболее частыми возбудителями среди бактерий являются *Str. pneumoniae*, *Staph. aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *H. influenzae*, *Ps. aeruginosa* и др.

При метастатических и аспирационных пневмониях с очагом инфекции в брюшной полости, органах малого таза и забрюшинном пространстве доминируют неспорообразующие анаэробы (бактероиды, пептококки), реже выделяются кластридии.

Взятие материала для исследования. Исследуют мокроту, содержащее бронхов, полученное при бронхоскопии, плевральную жидкость, аспираты и пунктаты из трахеи, легочную ткань, полученную при пункции и биопсии легкого.

Наиболее информативно исследование пунктатов из легких, трахеи. Однако применение указанных методов связано с определенным риском, в связи с чем их следует использовать лишь при тяжелых заболеваниях и при отсутствии мокроты или отрицательном результате ее исследования.

Мокроту для микробиологического исследования следует брать до начала антибактериальной терапии или через определенный промежуток времени после введения препарата, необходимый для его выделения из организма больного. Исследуют утреннюю порцию мокроты. Перед сбором мокроты больной должен прополоскать рот кипяченой водой или слабым раствором антисептика, почистить зубы. Мокроту собирают в стерильную посуду — плевательницу, чашки Петри и пр. Наиболее информативно исследование мокроты, полученной при бронхоскопии, так как она практически не загрязнена микрофлорой верхних дыхательных путей и полости рта. Хранить мокроту до исследования следует в холодильнике при 4 °С не более 2—3 ч. При более длительном хранении погибают малоустойчивые виды микроорганизмов (стрептококки), развиваются процессы брожения и гниения, искажающие результаты исследования.

Проведение исследования. Исследуют гнойные комочки мокроты, которые максимально освобождают от микрофлоры верхних дыхательных путей промыванием их в чашке Петри, содержащей изотонический раствор натрия хлорида. Готовят мазки, растирая комочек мокроты между стеклами, окрашивают их по Граму и Цилю — Нильсену (для обнаружения в мокроте туберкулезных палочек). При бактериоскопии мазков можно ориентировочно судить о характере и количестве микрофлоры в мокроте. Микроскопия мазка помогает также выявить трудно культивируемые микроорганизмы. Иногда бактериоскопия определяет характер культурального исследования.

Посев мокроты (отмытых гнойных комочков) производят на ряд питательных сред: 5 % кровяной агар (лучше использовать баранью или кроличью кровь), среду Эндо, среду Левинтала, среду для анаэробов. Посев производят шпательем, равномерно растирая комочек мокроты по по-

верхности питательной среды. На поверхность кровяного агара, засеянную исследуемым материалом, можно положить диски с сапонином, чтобы создать селективные условия для роста *H. influenzae*.

Среды с посевами инкубируют при 37 °С в течение 18—24 ч. Из выросших колоний выделяют чистые культуры, идентифицируют их и определяют чувствительность к антибактериальным препаратам.

При обнаружении в микроскопическом препарате грибов делают посев на среду Сабуро или другие среды для выращивания грибов. При подозрении на туберкулез или микоплазменную инфекцию делают посевы на соответствующие среды.

Чтобы различить контаминацию мокроты микрофлорой верхних дыхательных путей и полости рта, используют количественные методы исследования.

Мокроту для количественного исследования [Селина Л. Г., Дорожкова И. Р., 1980] собирают в стерильную банку с бусами для гомогенизации материала или в обычную посуду, но перед посевом растирают тщательно в ступках. В стерильную банку с бусами помещают 1 мл (0,5 мл) мокроты, добавляют туда 9 мл (4,5 мл) 2 % пептонной воды или питательного бульона. Смесь встряхивают в течение нескольких минут, из полученной гомогенизированной мокроты готовят последовательные десятикратные разведения, добавляя к 0,1 мл мокроты 0,9 мл изотонического раствора натрия хлорида. Затем по 0,1 мл полученных разведений засевают на чашки с 5 % кровяным агаром, растирая материал шпательем по поверхности среды. Через сутки инкубации при 37 °С учитывают результаты: подсчитывают однотипные по внешнему виду колонии, их число умножают на 10, так как производят посев 0,1 мл мокроты, и на степень разведения материала. Из колоний готовят мазки, выделяют чистые культуры, идентифицируют, определяют чувствительность к антибактериальным препаратам.

Для выделения пневмококка можно внутрибрюшинно заражать белых мышей 0,5 мл взвеси первичного материала в бульоне или частью осадка после центрифугирования материала. Через 6—8 ч у зараженной мыши берут экссудат из брюшной полости, делают посев на чашки с 5 % кровяным агаром, из остатка экссудата готовят мазки, которые окрашивают по Граму. Можно также забить зараженное животное и сделать посев крови из сердца на сывороточный бульон и чашки с кровяным агаром и мазки-отпечатки из селезенки на предметном стекле (окраска по Граму). При наличии пневмококка в исследуемом материале на питательных средах вырастет чистая культура.

Оценка результатов. Наиболее сложно определить этиологическую роль содержащихся в мокроте микроорганизмов, контаминирующих ее при прохождении через верхние дыхательные пути и ротовую полость. Для разделения этой микрофлоры от микроорганизмов нижних дыхательных путей используют ряд тестов. С помощью количественного метода определяют содержание в мокроте определен-

ного вида микроорганизмов, исходя из того, что возбудитель находится в мокроте в значительно большем количестве, чем микробы-контаминанты. Критическое число составляет 10^8 — 10^9 . Рост микробов в меньших разведениях расценивают как контаминацию мокроты микрофлорой верхних дыхательных путей или показатель бактерионосительства. Следует, однако, учитывать, что при проведении антибактериальной терапии количественное обсеменение мокроты возбудителем может уменьшаться.

Определенное значение имеет вид выделенных микроорганизмов. *Str. viridans*, *Corynebacterium*, *Neisseria*, *Staph. epidermidis* составляют нормальную микрофлору носоглотки. Поэтому как возбудителей заболевания их следует учитывать только в случаях, когда их количество превышает обычное. Другие виды микроорганизмов, находящихся в мокроте в разведениях, превышающих 10^6 , следует учитывать и изучать их чувствительность к антибиотикам.

Большое значение имеет первичная микроскопия мазка из мокроты. Обнаружение в мазке видов микроорганизмов, не выросших на питательных средах, часто свидетельствует о неадекватности этих сред. Поэтому нужно либо предпринять повторную попытку выделить эти культуры, либо в ответе лаборатории указать на их обнаружение в микроскопическом препарате. Следует также учитывать повторность обнаружения и нарастание количества определенного вида микроорганизмов в клиническом образце в процессе заболевания.

Л и т е р а т у р а. Селина Л. Г., Дорожек-ова И. Р. Количественный метод исследований в диагностике неспецифических заболеваний легких.— Журн. микробиол., 1980, № 2, с. 102—106.

7.3.4. Отделяемое при инфекциях носа и зева

Микрофлору верхних дыхательных путей изучают при заболеваниях носа и зева, а также у больных пневмонией, не отделяющих мокроту и при обследовании на бактерионосительство.

Отделяемое из носа берут сухим стерильным ватным тампоном, который вводят в глубь полости носа. Материал из носоглотки берут стерильным заднеглоточным тампоном, из зева — увлажненным ватным тампоном. Тампоны помещают в стерильные пробирки и доставляют в лабораторию в максимально короткий срок. Хранить тампоны с материалом следует в холодильнике не более 2—3 ч. Посев тампоном производят на чашки Петри с 5 % кровяным агаром, которые инкубируют 18—24 ч при 37 °С. Просматривают выросшие колонии, выделяют чистые культуры, идентифицируют их, определяют чувствительность к антибиотикам. Из материала, оставшегося на тампоне, делают мазки на стекле, которые окрашивают по Граму и Нейсеру.

При оценке результатов исследования следует учитывать качественный и количественный состав естественной микрофлоры, содержащейся в клиническом образце: обнаружение

микроорганизмов, не относящихся к естественной микрофлоре верхних дыхательных путей, или необычно большое количество микробов какого-либо вида указывает на их этиологическую значимость в заболевании.

7.3.5. Цереброспинальная жидкость

Микробиологическое исследование цереброспинальной жидкости (ЦСЖ) необходимо в случаях, подозрительных на менингит, а также при коматозных состояниях и неврологических симптомах неясного генеза.

ЦСЖ в норме стерильна, поэтому положительный результат микробиологического исследования — это всегда расшифровка этиологического диагноза, своевременность постановки которого может в ряде случаев предотвратить смертельный исход заболевания.

Этиология менингитов очень разнообразна. Наиболее часто из ЦСЖ выделяют следующие микроорганизмы: а) при гнойных менингитах — *N. meningitidis*, *S. pneumoniae*, *S. aureus*, *Streptococcus* групп А, В, D, *H. influenzae*, *E. coli*, *Klebsiellae*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *L. monocytogenes* и др., б) при асептических менингитах — *M. tuberculosis*, *Leptospira*, *Cryptococcus neoformans*, *Toxoplasma gondii*, вирусы.

В з я т и е п р о б ЦСЖ должно проводиться при строжайшем соблюдении правил асептики, исключающих кожную и воздушную контаминацию ЦСЖ. Первые капли ЦСЖ (до 1 мл) собирают в пробирку и направляют на цитологическое исследование. Для посева используют следующую порцию жидкости, которую собирают в стерильную пробирку в количестве 2—5 мл. При подозрении на туберкулезную или грибковую этиологию менингита следует брать не менее 10 мл ЦСЖ.

Учитывая, что один из ведущих возбудителей менингита — *N. meningitidis* — чрезвычайно чувствителен к охлаждению, взятые пробы должны быть доставлены в лабораторию как можно скорее, а до этого сохраняться строго при 37 °С. Во всех случаях, подозрительных на менингит, помимо ЦСЖ, следует брать для микробиологического исследования материал из предполагаемого первичного очага инфекции: мазки из носоглотки, среднего уха, ран после нейрохирургических и других оперативных вмешательств, производить посев крови.

П р о в е д е н и е и с с л е д о в а н и я. Доставленную в лабораторию пробу ЦСЖ центрифугируют при 2500—3000 об/мин 10 мин. Надосадочную жидкость отсасывают стерильной пипеткой в пробирку и используют для биохимического и серологического исследования. Оставшийся осадок и около 0,5 мл жидкости используют для приготовления мазков и посева. Гнойный ликвор можно использовать для исследования без предварительного центрифугирования. До конца подготовительных операций ЦСЖ хранят при 37 °С. Из осадка делают 2 тонких мазка на стекле, окрашивают по Граму и метиленовым синим и немедленно микроскопируют.

7.3.6. Отделяемое женских половых органов

Нередко, особенно при нелеченых случаях менингита, по типичной морфологии могут быть выявлены такие возбудители, как *N. meningitidis*, *S. pneumoniae*, *H. influenzae* (полиморфные грамотрицательные коккобациллы). Обнаружение в мазках неспоровых четко грамположительных коротких толстых палочек заставляет заподозрить *L. monocytogenes* в качестве возбудителя менингита. Результаты первичной микроскопии служат основанием предварительной диагностики, которая немедленно сообщается лечащему врачу и определяет ход дальнейшего исследования (набор питательных сред, условия культивирования).

Посев ЦСЖ производят на следующие питательные среды.

1. По 1—2 капли осадка засевают петлей на сывороточный агар (инкубация в нормальной атмосфере), на две чашки с 5 % кровяным агаром (инкубация в анаэробных условиях и при 10% содержании CO₂), шоколадный агар, в среды для анаэробов.

2. К осадку, оставшемуся в пробирке, добавляют около 5 мл сывороточного полужидкого агара (среда обогащения). Эту манипуляцию выполняют у пламени горелки, обжигая края обеих пробирок, выливая расплавленный и остуженный полужидкий агар на осадок ЦСЖ.

Все питательные среды должны быть свежеприготовленными (не ранее чем за сутки до посева) и прогреты в термостате непосредственно перед посевом.

Проверку роста проводят после ночной инкубации и в дальнейшем ежедневно до появления роста. При отсутствии роста в течение 7 дней выдают отрицательный результат.

При появлении роста на какой-либо из сред делают мазки, окрашивают по Граму, проводят посевы на плотные питательные среды для выделения культур и их идентификации.

Особенности исследования ликвора при туберкулезе, сифилисе, листериозе, при менингитах, вызванных грибами и простейшими,— см. соответствующие методические руководства.

Оценка результатов. Как отмечалось, в подавляющем большинстве случаев выделение микроорганизмов из ЦСЖ свидетельствует об их этиологической роли. В редких случаях выделение бактерий условно-патогенной группы может быть связано с контаминацией ликвора при его взятии. В таких случаях, чтобы избежать диагностической ошибки, следует повторить исследование. В случаях менингита, вызванного условно-патогенными видами, лечебные мероприятия не оказывают столь быстрого стерилизующего эффекта, как при патогенных возбудителях. Кроме того, должна быть проведена количественная оценка бактериального роста.

Отсутствие микрофлоры в первичных мазках ЦСЖ и отсутствие роста (или рост единичных колоний) на плотных питательных средах при наличии роста в жидких питательных средах могут свидетельствовать о нарушении правил асептики при взятии ЦСЖ.

Воспалительные заболевания половых органов могут быть вызваны микрофлорой, присутствующей в норме в этих органах, а также при восходящем, гематогенном, лимфогенном распространении микроорганизмов из других органов и тканей.

Взятие материала на исследование проводит врач — акушер-гинеколог.

Вульва, преддверие влагалища. Отделяемое берут стерильным ватным тампоном. При воспалении большой железы преддверия (бартолиновой железы) производят ее пункцию или при вскрытии абсцесса железы гной берут стерильным ватным тампоном.

Влагалище. После введения зеркала и подъемника материал для исследования берут стерильным ватным тампоном из заднего свода или с патологически измененных участков слизистой. Материал для посева должен быть взят до проведения мануального исследования.

Шейка матки. После обнажения шейки матки в зеркалах влагалищную часть ее тщательно обрабатывают ватным тампоном, смоченным стерильным изотоническим раствором натрия хлорида или водой. После этого тонкий ватный тампон осторожно вводят в шейный канал (не касаясь стенок влагалища) и берут материал для исследования.

Матка. Правильное взятие материала из матки может быть выполнено только при использовании специальных инструментов типа шприца-аспиратора, имеющего на зонде наружное покрытие. После прохождения зондом цервикального канала в полости матки раскрывают его наружную оболочку и аспирируют содержимое. После этого закрывают наружную оболочку и выводят зонд из матки.

Придатки матки. При воспалительном процессе в придатках матки получение материала из очага инфекции возможно только при оперативном вмешательстве (гнои, экссудат, кусочки органов) или при проведении диагностической пункции опухолевидных образований в малом тазу, проводимой через влагалищные своды (при этом следует учитывать возможность контаминации пробы влагалищной микрофлорой). В некоторых случаях, если очаг инфекции в придатках матки сообщается с полостью матки, могут оказаться полезными повторные исследования отделяемого цервикального канала при однотипных результатах исследования.

Взятый материал должен быть доставлен в лабораторию в ближайшие 1—2 ч.

При подозрении на анаэробную инфекцию посев должен быть выполнен сразу же после взятия материала.

Проведение исследования. Готовят мазки для бактериоскопии. Материал равномерно распределяют на стекле мягкими движениями, не применяя грубого втирания и резких штриховых движений инструментом. Такая техника выполнения мазков позволяет клеткам распределяться слоями, не повреждает их, сохраняет истинное распределение и количественное

соотношение компонентов исследуемого материала. После высушивания при комнатной температуре мазки покрывают чистым предметным стеклом (или помещают в чашку Петри) и отправляют в лабораторию. Хранение влажного мазка, сдавленного между двумя стеклами, недопустимо.

В лаборатории микроскопируют первичные мазки после окраски их по Граму, метиленовым синим, по Романовскому (влагалищные мазки).

Материал, взятый на тампон, засевают штрихами на кровяной и шоколадный агар. Патологический материал, доставленный в пробирках (гной, содержимое тубоовариальных образований), засевают по 0,1 мл, растирая шпатель по поверхности кровяного и шоколадного агара. Производят также посевы в сахарный бульон и среды для выделения анаэробов. Из оставшегося материала готовят мазки для микроскопии. Кусочки тканей измельчают, соблюдая стерильность, в микроизмельчителе тканей или в ступке с песком и засевают полученную взвесь на несколько чашек с плотными средами (кровяной агар, молочно-солевой агар, среду Эндо), а также в сахарный бульон и среды для выделения анаэробов.

Посевы инкубируют при температуре 37 °С аэробно, а также в анаэроstate. При появлении роста на плотных средах проводят подсчет числа колоний, количественно оценивая соотношение видов в данной микробной ассоциации. При помутнении сахарного бульона делают мазок на стекле (окраска по Граму) и высевают на плотные питательные среды (кровяной агар, молочно-солевой агар, среда Эндо).

Оценка результатов микробиологического исследования половой системы представляет определенные трудности, так как чаще всего регистрируют рост нескольких видов микроорганизмов условно-патогенной группы. В каждом конкретном случае следует учитывать совокупность признаков: данные микроскопии первичных мазков исследуемого материала, результаты прямого посева на плотные среды (количественная оценка роста различных видов), а также клинические проявления заболевания и анамнез больной. Так, при исследовании материала из закрытых полостей (пунктаты опухолевидных образований в малом тазу, околоплодные воды), а также органов, в норме стерильных (содержимое полости матки, кусочки органов, тканей, удаляемых при полостных операциях), рост микроорганизмов, особенно монокультуры в сочетании с находками микроорганизмов сходной морфологии в первичных мазках, с определенностью свидетельствует об их этиологической роли в воспалительном процессе.

При исследовании материала из мест, в норме имеющих разнообразную микрофлору, большое значение принадлежит количественной оценке различных видов бактерий, выросших при первичном посеве на плотные среды, однотипности результатов при повторных исследованиях, а также клиническим данным.

Для ориентировочной оценки количественного соотношения в микробных ассоциациях

можно использовать следующие критерии при штриховом посеве тампоном на $1/2$ чашки Петри с кровяным агаром:

I — очень скудный рост — на плотных средах роста нет, рост в жидкой питательной среде;

II — небольшое количество — на агаре до 10 колоний микроорганизмов определенного вида;

III — умеренное количество — на агаре 11 — 100 колоний;

IV — большое количество — на агаре более 100 колоний.

Рост I — II степени чаще всего свидетельствует о контаминации, III — IV степени — об этиологической роли данного микроорганизма.

7.3.7. Содержимое желудочно-кишечного тракта

Возбудители, выделяемые при воспалительных процессах различной локализации, в основном являются представителями нормальной микрофлоры желудочно-кишечного тракта человека. Для суждения об этиологической роли условно-патогенных микроорганизмов при различных желудочно-кишечных расстройствах, в том числе при диагностике кишечного дисбактериоза, важно знать критерии качественного и количественного соотношения видов микробов в различных отделах желудочно-кишечного тракта.

У здорового человека микрофлора желудочно-кишечного тракта чрезвычайно разнообразна, насчитывает более 60 видов и родов микроорганизмов.

Взятие материала на исследование. *Полость рта.* Материал для исследования берут стерильным ватным тампоном до начала лечения химиопрепаратами, до приема пищи, не ранее чем через 4—5 ч после местного лечения. Обычно воспалительно измененная область видна на глаз (гиперемия, отек, экссудация, гной, пленки). При наличии свищей (например, при актиномикозе языка) берут для исследования отделяемое свища или биопсированный материал. Из десневых карманов материал получают стерильной кюреткой или тонким ватным тампоном. Из зубного канала — стерильной иголкой-адсорбентом, которую вставляют в канал с соблюдением правил асептики примерно на 1 минуту, затем извлекают и помещают в питательную среду.

Пищевод и желудок. Материал для посева получают при эзофагоскопии и гастроскопии. Рвотные массы направляют на бактериологическое исследование, несмотря на то что собирают их в нестерильную посуду. То же относится к промывным водам желудка.

Тонкий кишечник. Материал берут через желудок с помощью специально сконструированного зонда, который открывают на определенном участке, и после взятия содержимого снова закрывают.

Толстый кишечник. Исследованию подвергают испражнения, забирая материал стерильной деревянной палочкой, и помещают в пробирку. При необходимости изучения микрофлоры воспалительно измененных участков слизистой

оболочки взятие содержимого проводят при ректороманоскопии с пораженных участков. Материал должен быть доставлен в лабораторию в течение 1 ч, так как при более длительном хранении значительно нарушаются экологические взаимоотношения между видами.

Желчь получают при зондировании двенадцатиперстной кишки. Исследуют все 3 порции желчи.

Проведение исследования. Для посева патологического материала из различных отделов желудочно-кишечного тракта используют следующие плотные питательные среды: среда Эндо, кровяной агар, молочно-солевой агар, агар Сабуро. Посев на набор сред производят шпательем, используя определенную дозу патологического материала (или его разведения), чтобы определить количество колоний различных видов микроорганизмов в данной пробе. Инкубацию посевов производят в аэробных условиях при 37 °С (посев на среде Сабуро, кроме того, и при комнатной температуре). При появлении роста подсчитывают число колоний различной морфологии и отсеивают по 2—3 колонии каждого вида для дальнейшей биохимической идентификации и серологического типирования.

При диагностике кишечного дисбактериоза необходим количественный учет как аэробной, так и анаэробной микрофлоры кишечника. Методика исследования описана в методических рекомендациях Р. В. Эпштейн-Литвак и Ф. Л. Вильшанской «Бактериологическая диагностика дисбактериоза кишечника» (М., 1977) и в книге В. Г. Петровской и О. П. Марко «Микрофлора человека в норме и патологии» (М., 1976).

Оценка результатов. В связи с тем что исследованию подвергают пробы, в норме содержащие разнообразную микрофлору, ведущее значение принадлежит количественной оценке различных видов в ассоциациях, выделяемых из патологического материала, и сравнению полученных результатов с нормальным составом биоценоза данной области.

Для установления этиологической роли выделенных микроорганизмов необходимо установить значительное преобладание данного вида в ассоциации или отметить присутствие в очаге инфекции видов микроорганизмов, несвойственных данному месту.

Микробиологическая диагностика кишечного дисбактериоза основана на количественной оценке содержания различных видов облигатной и факультативной групп в микроценозе толстого кишечника. При дисбактериозе резко нарушается равновесие состава микрофлоры. Происходит значительное снижение количества облигатных анаэробных видов и в первую очередь бифидофлоры и увеличение количества аэробных видов, в частности эшерихий, число которых может превышать 10^8 клеток/г фекалий. Параллельно увеличивается содержание различных видов факультативной группы, которые в некоторых случаях становятся преобладающими. Критерии нормы микрофлоры толстого кишечника, согласно методическим рекомендациям, приведены в табл. 48.

Таблица 48. Критерии нормы кишечной микрофлоры [по Эпштейн-Литвак Р. В. и Вильшанской Ф. Л., 1977]

Микрофлора	Норма
Патогенные микробы семейства кишечных	0
Общее количество кишечной палочки, млн/г	300—400
Кишечная палочка со слабо выраженными ферментативными свойствами, %	До 10
Лактозонегативные энтеробактерии, %	» 5
Гемолизующая кишечная палочка, %	0
Кокковые формы в общей сумме микробов, %	До 25
Гемолизующий стафилококк по отношению ко всем кокковым формам, %	0
Бифидобактерии	10^{-7} и выше
Микробы рода Протея	0
» » Кандида	0

При исследовании желчи могут быть получены не совпадающие результаты в трех пробах, однако на этом основании нельзя надежно судить о локализации воспалительного процесса. Прогностически неблагоприятно расценивают выделение из желчи различных энтеробактерий (чаще эшерихий, клебсиелл, протей), синегнойной палочки, бактериоидов, особенно в количестве более 10^7 клеток в 1 мл.

Таким образом, выделение в большом количестве условно-патогенных бактерий из содержимого желудка, тонкой кишки, в пробах желчи является прогностически неблагоприятным, служит показателем необходимости проведения соответствующих лечебных мероприятий, особенно при предоперационной подготовке больных.

7.3.8. Отделяемое ран и выпотов

Раны. Микробиологическое исследование ран имеет значение для постановки этиологического диагноза в каждом конкретном случае заболевания, а также важно в эпидемиологическом плане, так как раневая инфекция является ведущей формой проявления госпитализма в настоящее время.

Практически все УПМ могут вести к развитию раневой инфекции, особенно на фоне ослабления защитных механизмов организма человека. В настоящее время ведущая роль в этиологии раневой инфекции принадлежит золотистому стафилококку и грамотрицательным палочкам семейств Enterobacteriaceae и Pseudomonadaceae. Кроме того, на фоне все большего использования антибиотиков широкого спектра действия увеличивается значение анаэробных неспорообразующих бактерий, грибов.

Взятие материала на исследование. Раневое отделяемое берут стерильными ватными тампонами из глубины раны до обработки ее антисептическими растворами. Тампоны срочно направляют в бактериологическую лабораторию. При наличии в ране дренажа отделяемое берут стерильным шприцем, из которого оно переносится с соблюдением правил асептики в стерильную пробирку или анаэробный флакон. Удаляемые при обработке раны кусочки тканей отправляют в лабораторию в стерильных чашках Петри.

Проведение исследования. Посев раневого отделяемого непосредственно с тампона производят на питательные среды в следующем порядке.

1. Кровяной агар (посев штрихом на $\frac{1}{2}$ чашки Петри).

2. Сахарный бульон.

3. Среда для анаэробов. Тампон оставляют в пробирке.

Жидкие пробы засевают на плотную среду петлей. Предпочтительнее производить посев по 0,1 мл разведенной до 10^{-1} и неразведенной пробы, растирая материал по поверхности питательной среды шпателем. В жидкие питательные среды посев производят пастеровской пипеткой. При посеве на анаэробы пипетку с исследуемым материалом опускают на дно пробирки, не допуская попадания пузырьков воздуха в среду.

Кусочки тканей режут стерильными ножницами, взвешивают в стерильной чашке Петри и измельчают в стерильной ступке с питательным бульоном из расчета 1 мл бульона на 1 г ткани. Затем делают десятикратные разведения взвеси до 10^{-3} (0,9 мл бульона и 0,1 мл взвеси = 10^{-1} ; 0,9 мл бульона и 0,1 мл разведения 10^{-1} = 10^{-2} и т. д.). По 0,1 мл каждого разведения засевают на кровяной агар.

Подсчет КОЕ/г ткани производят с учетом числа выросших колоний и сделанных разведений.

Посевы инкубируют аэробно и анаэробно при 37 °С. Посевы просматривают ежедневно. При появлении роста на плотной среде изучают морфологию колоний. Дается количественная оценка роста. В случаях выявления колоний различной морфологии подсчитывают число колоний каждого вида микроорганизмов. При этом выявляют ведущий вид в ассоциации. По 2–3 колонии каждого типа отсеивают на соответствующие питательные среды для дальнейшей идентификации.

При появлении роста в жидких питательных средах готовят мазки (окраска по Граму), с сахарного бульона производят посевы на кровяной агар, среду Эндо, молочно-солевой агар. Отрицательный результат исследования выдают через 7 сут при отсутствии роста на всех питательных средах.

Микроскопия мазков раневого отделяемого. Для приготовления мазков отделяемого ран следует использовать отдельные тампоны, которыми забирают патологический материал и переносят его на стекло. Мазки окрашивают по Граму. Если в лабораторию доставлен только один тампон, то мазок готовят

после посева патологического материала. При микроскопии мазков отмечают морфологию и количество микроорганизмов. Выделяемые при этом особенности могут внести коррекцию в ход исследования — использование добавочных питательных сред.

Исследование вытолов. Все вытолы, подозрительные на экссудат, следует направлять на микробиологическое исследование. Соблюдая правила асептики, пунктируют иглой полость и отсасывают содержимое с помощью шприца. Из шприца патологический материал переносят у пламени горелки в стерильный анаэробный флакон и отправляют в лабораторию.

В лаборатории прозрачную жидкость центрифугируют 15–20 мин при 3000 об/мин и осадок используют для посева и приготовления мазков. При гнойном характере проб готовят тонкие мазки для микроскопии без предварительного центрифугирования. Посев проб производят на кровяной агар, сахарный бульон, среду для анаэробов. Кроме того, используют специальные питательные среды в зависимости от особенностей источника вытока. Так, плевральный выпот чаще всего наблюдается у больных с туберкулезом легких, поэтому после центрифугирования осадок дополнительно засевают на среды для культивирования туберкулезной палочки или заражают патологическим материалом морскую свинку. При эмпиемах часто возбудителем может быть пневмококк, стрептококк группы А, золотистый стафилококк, *Haemophilus influenzae*, анаэробы. Следовательно, в набор питательных сред должны быть включены сывороточные среды, шоколадный агар, среды для анаэробов. При использовании синовиальной жидкости следует использовать питательные среды для выделения гонококка.

Оценка результатов. Интерпретация полученных данных обычно не представляет трудностей, так как при условии соблюдения правил асептики во время взятия патологического материала и из закрытых полостей, и из глубины гнойных ран (очаги инфекции) выделенные микроорганизмы являются возбудителями данного инфекционного процесса.

При выделении ассоциаций микроорганизмов из раневого отделяемого ведущее значение в течение раневого процесса следует отдавать видам, количественно преобладающим в данном микроценозе. Имеются следующие критерии количественной оценки микробного роста при прямом штриховом посеве тампоном раневого отделяемого на $\frac{1}{2}$ чашки Петри с плотной питательной средой:

I — очень скудный рост — рост только в жидких средах, на плотной питательной среде рост отсутствует;

II — небольшое количество — на плотной среде рост до 10 колоний;

III — умеренное количество — на плотной среде рост от 11 до 100 колоний;

IV — большое количество — рост на плотной среде более 100 колоний.

Показано, что уровень обсемененности тканей в ране, равный 10^6 КОЕ/г, является критическим. Превышение этого уровня указывает на

большую вероятность развития гнойной инфекции и возможность генерализации инфекционного процесса. При обсемененности менее 10^5 КОЕ/г ткани раны заживают без явлений нагноения.

Количественная оценка микробной обсемененности жидких проб (КОЕ/мл) имеет особое значение при повторных исследованиях, так как характеризует динамику течения гнойно-воспалительного процесса, являясь показателем эффективности терапевтических мероприятий, в частности химиотерапии.

7.3.9. Отделяемое глаз и ушей

Глаза. Воспалительные заболевания глаза чаще всего локализуются на конъюнктиве, слизистой оболочке век, слезном мешке, реже затрагивают роговицу. Инфекция внутренних сред глазного яблока может развиваться в результате гематогенного ее распространения при септическом процессе или после операций на глазном яблоке, особенно у ослабленных больных после длительных курсов антибиотик- и гормонотерапии. Ведущую роль как возбудители занимают представители условно-патогенной группы микроорганизмов.

Взятие материала для микробиологического исследования производят до местного применения антибиотиков и других медикаментов. Его выполняет врач-окулист в присутствии лаборанта-микробиолога, который сразу производит посев взятого материала на принесенные питательные среды.

При наличии гнойного отделяемого используют стерильные ватные тампоны, которыми забирают гной с внутренней поверхности нижнего века к внутреннему углу глазной щели. Необходимо следить, чтобы ресницы при моргании не касались тампона (придерживать веки руками).

При отсутствии видимого гноя следует пользоваться тампонами, смоченными стерильным изотоническим раствором, чтобы собрать на тампон как можно больше скудного отделяемого.

Секрет из слезного мешка берут стерильным ватным тампоном после осторожного массажа.

Материал с роговицы берут платиновой петлей после местного обезболивания. Соскобы с конъюнктивы и роговицы для выявления эозинофилов и телеск включения производят инструментом, с которого материал переносят на предметные стекла. Мазки отделяемого на стекле для первичной микроскопии выполняют параллельно со сбором материала для микробиологического исследования.

Проведение исследования. При скудном отделяемом используют только жидкие питательные среды, такие, как среды накопления — сахарный бульон и среда для анаэробов. При более обильном отделяемом необходимо использовать кровяной агар, сывороточный агар, шоколадный агар. При подозрении на гонококковую или дифтерийную этиологию конъюнктивита используют соответствующие среды.

При выявлении в первичных мазках толстых коротких грамположительных диплобацилл, осо-

бенно в случаях хронического или катарального конъюнктивита, наиболее выраженного в наружных углах глаз, следует использовать среду Леффлера для выделения моракселл.

Все питательные среды после посева на них отделяемого инкубируют при 37°C 24—48 ч. Часто рост появляется только через 48 часов. При появлении роста делают мазки на стекле, которые окрашивают по Граму и производят высевы с жидких питательных сред на плотные среды: кровяной агар, среду Эндо, молочно-солевой агар, агар Сабуро. Другие среды используют при соответствующих показаниях.

Оценка результатов. Выделение из патологического материала истинно патогенных микроорганизмов несомненно свидетельствует об их этиологической роли в воспалительном процессе.

Обнаружение микроорганизмов условно-патогенной группы при условии соблюдения правил асептики в момент взятия материала свидетельствует об их участии в воспалительном процессе тканей глаза или является показателем высокого риска развития воспалительного процесса в ближайшем будущем, особенно в случаях, когда большим предостоят оперативные вмешательства на органе зрения.

Уши. Взятие материала для микробиологического исследования при среднем отите проводит врач-отоларинголог, используя стерильные инструменты. Отделяемое берут стерильным ватным тампоном. Наиболее достоверные результаты исследования получают при пункции среднего уха через непрорвавшуюся барабанную перепонку. При наружном отите следует обработать кожу прилегающих областей раствором антисептика, чтобы при взятии материала не было контаминации тампона сапрофитной микрофлорой.

Проведение исследования. Материал засевают на кровяной агар, шоколадный агар (штриховой посев тампоном, которым брали отделяемое), а также на сахарный бульон и среду для анаэробов. Проводят микроскопию первичных мазков отделяемого, окрашенных по Граму.

Инкубацию посевов на жидких средах проводят в аэробных условиях при 37°C , кровяной агар — в атмосфере с 5 % CO_2 . Посевы просматривают ежедневно. Отрицательный результат исследования выдается при отсутствии роста в течение семи суток. При появлении роста на плотных питательных средах проводят его количественную оценку и отсеивают 2—3 колонии различной морфологии для последующей идентификации. С жидких сред делают мазки на стекле для микроскопии (окраска по Граму) и производят высевы на кровяной агар, молочно-солевой агар, среду Эндо.

Оценка результатов. При острых воспалительных процессах обычно высевают в большом количестве монокультуры микроорганизмов и их этиологическая значимость не вызывает сомнения. Более трудна интерпретация результатов микробиологического исследования при хронических воспалительных процессах, когда выявляют ассоциации бактерий. В таких

случаях важна количественная оценка роста различных видов в ассоциации при первичном посеве патологического материала на плотные питательные среды. Виду, преобладающему количественно, по-видимому, принадлежит ведущая роль в этиологии инфекционного процесса, и характеристика биологических свойств этого вида (в том числе антибиограмма) наиболее важна для выбора тактики лечебных мероприятий.

7.3.10. Материал, полученный на операции и во время патологоанатомического исследования

Материал, полученный на операции. В ряде случаев материал из очага инфекции может быть получен только при оперативном лечении.

Взятие материала на исследование. Оперирующий врач берет кусочки патологически измененных тканей с помощью стерильных инструментов. Из закрытых флюктуирующих образований содержимое аспирируют с помощью толстой иглы и шприца. Взятый материал хирург должен поместить в стерильную посуду и направить в лабораторию.

В ряде случаев с операций поступает в лабораторию материал, контаминированный нормальной микрофлорой. Такие, например, пробы, как удаленные небные миндалины, в лаборатории следует обработать прижиганием или прогреванием в кипящей воде в течение 5–10 с для снятия поверхностной контаминации. Затем ткань рассекают стерильным скальпелем и используют для посева центральную часть.

При микробиологическом исследовании тканей следует учитывать результаты срочного гистологического исследования удаленных тканей. Обращают внимание на характер гистопатологии исследуемых тканей — имеется воспалительный или неопластический процесс. Если доказан невоспалительный характер процесса, отпадает необходимость в микробиологическом исследовании. Если подтверждается наличие воспалительного процесса, в некоторых случаях результаты гистологического исследования могут послужить основанием к отбору определенных питательных сред и методик исследования.

Проведение исследования. Жидкие пробы должны быть проверены на наличие гранул и подвергнуты микроскопии в мазках, окрашенных по Граму. Кусочки тканей перед посевом тщательно размельчают. При подозрении на *Sructococcus neoforgmans* не следует растирать ткани, так как при такой обработке эти микроорганизмы теряют жизнеспособность. Ткани мелко режут ножницами и используют большие дозы для посева на среды для культивирования грибов. После этого нарезанную ткань переносят в стерильный размельчитель тканей и после добавления небольшого количества питательного бульона или изотонического раствора натрия хлорида размельчают пробу до

консистенции пасты. Затем производят посев на необходимые среды. После отстаивания пробы часть супернатанта используют для приготовления мазков, которые окрашивают по Граму и Цилю—Нильсену, и для внутрибрюшинного заражения морских свинок и мышей. Состояние животных проверяют ежедневно и после их смерти проводят микробиологическое исследование органов.

Выбор питательных сред для посева зависит от характера патологического процесса, его локализации, подозреваемых возбудителей. В ряде случаев следует помнить о редких патогенных микроорганизмах и использовать специальные среды. Не может быть однотипного перечня сред для всех случаев, но такие среды, как кровяной агар, шоколадный агар, среды для выделения анаэробов, микобактерий и грибов, следует использовать всегда.

Материал, полученный во время патологоанатомического исследования. Посмертная инвазия тканей и органов микроорганизмами — нормальными обитателями кишечника и слизистых оболочек значительно снижает ценность бактериологического исследования трупного материала. Большое значение в получении достоверных результатов принадлежит соблюдению стерильности при взятии проб. Значительное число ложноположительных результатов материала аутопсий связано с контаминацией проб персоналом, проводящим вскрытие.

Кровь для посева берут стерильным шприцем после прижигания раскаленным шпателем предсердия или желудочка сердца. По 5–10 мл крови засевают тут же в сахарный бульон. Пробы других тканей получают после прижигания поверхностей, проходя стерильным тампоном или пастеровской пипеткой через обработанную зону. Предпочтительным следует считать взятие блоков тканей около 1 см³, которые вырезают из обожженной зоны с помощью стерильных инструментов. Пробы помещают в стерильные чашки Петри и доставляют в лабораторию. При подозрении на бактериальный эндокардит часть рыхлых разрастаний извлекают стерильными инструментами и помещают в стерильную чашку Петри. В лаборатории пробы тканей промывают стерильным изотоническим раствором натрия хлорида и размельчают в размельчителе тканей с добавлением питательного бульона. Из гомогената готовят мазки, красят по Граму. Производят посевы гомогената на кровяной агар, шоколадный агар, на среды для культивирования анаэробов и при показаниях на другие питательные среды. Инкубацию сред проводят аэробно и в атмосфере CO₂ при 37 °С, просматривая посевы ежедневно. При отсутствии роста отрицательный результат исследования выдают через 7 сут (за исключением тех возбудителей, которые требуют более длительного культивирования — микобактерий, патогенные грибы).

Ткани всех плодов и новорожденных, погибших при подозрении на инфекцию, должны быть исследованы на листерии. Наиболее часто эти микроорганизмы выделяют из мозговой ткани, печени, селезенки.

7.4. ДИФФЕРЕНЦИАЦИЯ И ИДЕНТИФИКАЦИЯ БАКТЕРИЙ — ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ГНОЙНО-ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

7.4.1. Грамотрицательные аэробные, факультативно-анаэробные палочки средних размеров

Род псевдомонас (*Pseudomonas*) объединяет грамотрицательные средних размеров, прямые или слегка изогнутые, подвижные палочки, равномерно окрашенные, не имеющие диагностически значимых включений, спор и характерного расположения. На плотных питательных средах представители рода формируют сероватые, непрозрачные, плоские с неровными краями колонии. Многие виды вырабатывают разного цвета пигмент. Для *P. aeruginosa* характерно образование сине-зеленого пигмента и своеобразного запаха «жасмина». На кровяном агаре наблюдается хорошо выраженная гемолитическая активность. Являясь строгими аэробами, бактерии окисляют углеводы. Представители рода подразделены на большое количество видов. *P. mallei* и *P. pseudomallei* — возбудители особо опасных заболеваний (сап, миелидоз).

Дифференциальные признаки видов псевдомонас, которые могут иметь значение в этиологии гнойно-воспалительных процессов человека, представлены в табл. 49. Среди них *P. aeruginosa* имеет наибольший удельный вес.

При росте *P. aeruginosa* на окшошенной части многокомпонентных сред типа Олькеницкого, Клигера образуется темный пигмент с серебряным блеском без изменения цвета в столбике.

Для внутривидовой идентификации *P. aeruginosa* применяют серологические методы исследования с групповыми и факторными диагностическими сыворотками в реакции агглютинации на стекле.

Семейство энтеробактерий (*Enterobacteriaceae*) объединяет трибы, роды, виды (табл. 50) грамотрицательных палочек среднего размера, подвижных и неподвижных, обладающих и необладающих капсулой, не имеющих диагностических включений и не образующих спор. Они хорошо растут на питательных средах при температуре 37 ± 3 °C и не требуют дополнительных питательных добавок в виде специальных факторов роста.

Энтеробактерий обладают высокой ферментативной активностью в отношении углеводов, близких к углеводам источников углерода, спиртам, органическим кислотам и аминокислотам. На основании разнообразия набора ферментов к вышеуказанным субстратам сконструированы диагностические среды для выделения (среды Эндо, Левина, Плоскирева, висмутсульфит-агар и т. д.) и многокомпонентные среды для первичной дифференциации выделенных культур.

Отсутствие фермента оксидазы при способности редуцировать нитраты является характерным признаком, отличающим энтеробактерий от представителей других семейств и родов этой группы бактерий, имеющих значение в патологии человека.

Первоначально изучают особенности колоний, выросших на первичных средах выделения (табл. 51). Для проведения идентификации колонии засевают на одну из плотных многокомпонентных дифференциально-диагностических сред (среда Олькеницкого с двумя, тремя углеводами, среда Клигера, трехсахарный железистый агар типа TSI, лизин-железистый агар, среда Ресселя с мочевиной) и цитратную среду Симонса.

Таблица 49. Внутривидовая дифференциация некоторых видов псевдомонас

Тест, субстрат		<i>P. pseudo-mallei</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>P. stuarti</i>	<i>P. fluorescens</i>	<i>P. seratia</i>	<i>P. putida</i>	<i>P. maltophilia</i>
Рост при t°	42 °C	+	+	± ¹	—	± ¹	—	—
	4 °C	—	—	± ¹	+	—	+	—
Редукция нитратов		+ газ	+ газ	+ газ	—	+	—	± ¹
Аргининдегидролаза		+	+	—	+	—	+	—
Окисление глюкозы		+	+	—	+	+	+	(+) ²
Каталаза		+	+	+	+	+	+	+
Оксидаза		+	+	+	+	Слабо	+	—
β-Галактозидаза		—	—	—	—	± ¹	—	—
Пигмент	Пиоцианин	—	+	—	± ¹	± ¹	—	—
	Флюоресценн	—	+	—	+	—	+	—
	Другие	—	Коричневый, красный, черный	Желтый	—	—	—	Коричневый

Примечания. 1 — штаммовые различия; 2 — замедленная реакция.

Т а б л и ц а 50. Классификационная схема семейства энтеробактерий¹. По кн.: Определитель бактерий Берги. Изд. 8-е, 1974

Триба	Род	Вид (подрод)	
Escherichieae	1. Escherichia	E. coli	
	2. Edwardsiella		
	3. Citrobacter	E. tarda C. freundii C. intermedius	
	4. Salmonella	Подрод I Подрод II (S. salamae) Подрод III (S. arizonae) Подрод IV (S. houtenae)	
	5. Shigella	S. dysenteriae S. flexneri S. boydii S. sonnei	
Klebsielleae	1. Klebsiella	K. pneumoniae K. rhinoscleromatis K. ozaenae	
	2. Enterobacter	E. cloacae E. aerogenes	
	3. Hafnia	H. alvei	
	4. Serratia	S. marcescens	
Proteae	1. Proteus	P. vulgaris P. mirabilis P. morgani P. rettgeri P. inconstans	
	Yersinieae	1. Yersinia	Y [*] . pestis Y. enterocolitica Y. pseudotuberculosis

¹ Bergey's manual of determinative bacteriology — 8th ed — Baltimore: The Williams, Wilkins Company, 1974— 1268 p.

Особенности ферментации субстратов многокомпонентных сред представлены в табл. 52, позволяют ориентировочно определить трибу, род энтеробактерий.

Вид выделенных культур устанавливают в соответствии с минимальным набором тестов, которые четко дифференцируют внутриродовые различия энтеробактерий (табл. 53—56).

Для ускорения идентификации можно применить системы индикаторных бумажек (СИБ), выпускаемые Горьковским НИИЭМ МЗ РСФСР (Методические рекомендации по применению СИБ для идентификации энтеробактерий, 1982). Для уточнения видовой (групповой) принадлежности культур их изучают в реакции агглютинации на стеклeс поливалентными агглютинирующими сыворотками. Сероварианты энтеробактерий определяют в реакции агглютинации с наборами O, Vi, H, K монорецепторных сывороток.

7.4.2. Грамотрицательные аэробные и факультативно-анаэробные мелкие палочки и коккобациллы

Род гемофилов (*Haemophilus*) объединяет мелкие грамотрицательные палочки, не растущие на простых питательных средах. Среди 7 видов рода гемофилюс (*H. parainfluenzae*, *H. aphrophilus*, *H. ducreyi*, *H. influenzae* и др.), которые выделяют при болезнях человека, наибольший удельный вес принадлежит палочке инфлюэнцы (*Haemophilus influenzae*).

Характерной особенностью представителей данного рода является их требовательность для своего культивирования в факторах роста крови X (гемин) и V (NAD).

Для выделения и культивирования гемофилов применяют питательные агары с высоким (1,6 г/л) содержанием аминного азота и 8—10 % нативной или гретой крови животных или человека.

Оптимальной средой является шоколадный агар. При использовании для него лошадиной крови среду прогревают в водяной бане при 75 °С до шоколадного цвета, человеческой крови — не менее 30 мин. При использовании дефибрированной кроличьей крови прогревание среды ограничивается 5—6 мин при 80 °С. Рост культуры значительно улучшается, если создать повышенную (10 %) концентрацию CO₂ (культивирование «со свечой»).

На плотных средах с нативной кровью гемофилы растут в виде очень мелких (^ 0,5 мм в диаметре) прозрачных колоний. На шоколадном агаре образуются более крупные, полупрозрачные, нежные, сочные колонии диаметром 0,5—2 мм. Выросшие колонии гемофилов легко снимаются со среды. При росте на шоколадном агаре палочка инфлюэнцы обладает «мышиным» запахом, что является характерным свойством этого вида микробов. При росте *H. influenzae* на плотных питательных средах можно наблюдать: слизистые колонии — круглые, рыхлые, сочные, сероватые, ирригирующие при просмотре в коспроходящем свете (М-формы); в мазках, окрашенных по Граму, видны мелкие короткие грамотрицательные палочки; при окраске мазка тушью по Гинсу выявляется хорошо выраженная капсула; круглые, гладкие, полупрозрачные неирригирующие колонии (S-форма); в мазках — мелкие грамотрицательные палочки, капсула выражена слабо или отсутствует.

После микроскопирования подозрительные колонии отсевают на шоколадный агар для проведения дальнейшей идентификации культур по биохимическим тестам.

Основные свойства видов и их дифференциация приведены в табл. 57.

Серологический анализ *H. influenzae* проводят по капсульному антигену, по которому их подразделяют на 6 серологических вариантов: а, Б, с, d, e, f. Для такого исследования используют поли- и моновалентные диагностические сыворотки в реакции агглютинации на стекле.

Т а б л и ц а 51. Первичная дифференциация родов энтеробактерий на многокомпонентных средах

Наименование среды	Тест, субстрат	Учет теста	Escherichia	Edwardiella	Citrobacter	Salmonella	Shigella	Klebsiella	Enterobakter	Hafnia	Serratia	Proteus	Yersinia ¹
Олькеницкого или Клиглера Тройной сахаро-железистый агар (TSI)	Лактоза, сахароза	Косяк	К/—	—	К/(К)	—	—/(К)	К/—	К	—/К	К/—	—	—
	Глюкоза	Столбик	КГ/К	КГ	КГ	КГ/К	К	КГ/К	КГ	КГ/К	КГ/К	КГ/К	—
	H ₂ S	Столбик, почернение	—	+	+/-	+	—	—	—	—	—	+/-	—
Полужидкий агар	Мочевина	Вся среда, защелачивание	—	—	—	—	—	(+)	—/(+)	—	+/-	+/-	(+)
	Индол	Изменение цвета ²	+/-	+	+/-	—	+/-	+/-	—	—	—	+/-	—
	Подвижность	Помутнение	+/-	+	+	+	—	—	+	+	+	+	—
Среда Симонса	Погребление цитрата	Защелачивание	—	—	+	+	—	+	+	+/-	+	+/-	—

П р и м е ч а н и я. К — кислота; Г — газообразование; (+/-) — реакция замедленная, (+) — наличие признака; (—) — отсутствие признака; / — обозначение вариантов.

¹ Кроме *Y. pestis*.

² Индикаторных бумажек.

Т а б л и ц а 52. Межродовая дифференциация микробов семейства Enterobacteriaceae и *P. aeruginosa*

Тест, субстрат	Роды										Вид <i>P. aeruginosa</i>	
	<i>Escherichia</i>	<i>Edwardiella</i>	<i>Citrobacter</i>	<i>Salmonella</i>	<i>Shigella</i>	<i>Klebsiella</i>	<i>Enterobacter</i>	<i>Hafnia</i>	<i>Serratia</i>	<i>Proteus</i>		<i>Yersinia</i>
Оксидаза	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Редукция нитратов	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Глюкоза, газ	±	+	+	+ ¹	- ²	+ ⁻	+	±	±	+	-	-
Лактоза	±	-	(+)	- ⁺	-(+)	+ ⁻³	+	(+)	+	-	-	-
Сероводород	-	+	+ ⁻⁴	+ ⁷	-	-	-	-	-	+ ⁻	+ ⁻	-
Индол	±	+	+ ⁻	-	±	-	-	-	-	+ ⁻	-	-
Мочевина	-	-	(+)	-	-	(+)	-	-	-	+ ⁵⁻	+ ⁶	+
Фенилаланиндезаминаза	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
Цитрат по Симмонсу	-	-	+	+	-	+ ⁻	+	+	+	+ ⁻	-	+
Арабиноза	+	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-
Тест с метиловым красным	+	+	+	+	+	- ⁺	-	22°-	+	+	+	-
Тест Фогеса — Проскауэра	-	-	-	-	-	+ ⁻	+	±	+	-	-	-
Лизиндекарбоксилаза	±	+	-	+	- ⁸	±	- ⁺	+	+	-	-	-

П р и м е ч а н и я. (+) или (±) — отдельные биовары; (-) или (-) — замедленная реакция; (-) или (-) — разные виды рода; 1 — кроме *S. typhi*; 2 — кроме *S. flexneri* serovar. 6. Первичная характеристика по виду: 3 — *K. pneumoniae*; 4 — *S. pneumoniae*; 5 — *P. mirabilis*; 6 — кроме *Y. pestis*; 7 — кроме некоторых редко встречающихся серовариантов; 8 — кроме биоваров *S. sonnei*.

Таблица 53. Внутривидовая дифференциация рода *Klebsiella*

Тест, субстрат	Виды		
	<i>K. pneumoniae</i>	<i>K. ozaenae</i>	<i>K. rhinoscleromatis</i>
Глюкоза, газ	+	(±) ¹	—
Лактоза	+	(+) ²	—
Метиловый красный	—	+	+
Реакция Фогеса — Проскауэра	+	—	—
Цитрат по Симмонсу	+	±	—
Уреаза	+	±	—
Малонат	+	—	+

Примечания. 1 — разные биоварианты; 2 — замедленно.

Таблица 54. Внутривидовая дифференциация рода *Enterobacter*

Тест, субстрат	Виды	
	<i>E. cloacae</i>	<i>E. aerogenes</i>
Газообразование на глицерине	—	+
Адонит	—	+
Лизиндекарбоксилаза	—	+
Аргининдегидролаза	+	—

Таблица 55. Внутривидовая дифференциация рода *Yersinia*

Тест, субстрат	Виды		
	<i>Y. pestis</i>	<i>Y. pseudotuberculosis</i>	<i>Y. enterocolitica</i>
Мочевина ¹	—	+	+
Орнитиндекарбоксилаза	—	—	+
Адонит	—	+	—
Ксилоза	+	—	± ²
Сорбит	±	—	+
Сахароза	—	—	+

Результаты более четкие по Христенсену. Разные биоварианты.

В патологии человека наибольшее значение имеют штаммы инфлюэнцы с капсульным антигеном типа b.

В связи с тем что микроорганизмы, относящиеся к разным родам, вызывают заболевания, имеющие сходную клиническую картину, и могут быть обнаружены в том же патологическом материале, что и гемофилы, возникает необходи-

Таблица 56. Внутривидовая дифференциация рода *Proteus*

Тест, субстрат	Виды				
	<i>P. mirabilis</i>	<i>P. vulgaris</i>	<i>P. morgani</i>	<i>P. rettgeri</i>	<i>P. inconstans</i>
Мочевина	+	+	+	+	—
Индол	—	+	+	+	+
H ₂ S	+	+	—	—	—
Цитрат по Симмонсу	(+) ¹	± ²	—	+	+
Желатина	+	+	—	—	—
Мальтоза	—	+	—	—	—
Маннит	—	—	—	+	—
Орнитиндекарбоксилаза	+	—	+	—	—

Примечания. — замедленно; 2 — разные биоварианты.

мость в их дифференциальной диагностике. Набор ориентировочных тестов представлен в табл. 58.

Род моракселла (*Moraxella*) состоит из 7 видов, встречающихся у человека. Иногда моракселлы являются причиной воспалительных заболеваний человека — конъюнктивита, вульвовагинита, менингита, плеврита. Представители рода моракселла не растут на простых питательных средах, а требуют добавления 5–10 % крови животных или сыворотки. Колонии крупные, полупрозрачные, гладкие, нежные, слизистые.

Род ацинетобактер (*Acinetobacter*) представлен 2 видами — *A. calcoaceticus* и *A. Iwoffii*. Эти микроорганизмы могут выделяться из цереброспинальной жидкости и мокроты при заболеваниях нижних дыхательных путей, бронхоэктатической болезни, конъюнктивитах, хронических отитах, со слизистой оболочки мочеполового тракта. Они обычно хорошо культивируются на простых питательных средах, однако при первичном выделении лучше использовать среды с добавлением крови или сыворотки. *A. calcoaceticus* образуют на кровяном агаре относительно большие (2–3 мм), беловатые, выпуклые, иногда слизистые колонии, *A. Iwoffii* — серые, плоские, немного мельче колонии. 10–20 % культур дают β-гемолиз.

Микробы рода *Moraxella* и *Acinetobacter* при окраске по Граму имеют форму коротких округлых палочек, часто напоминают кокки, но могут встречаться самые разнообразные формы клеток, даже нитевидные, располагаются клетки парами, короткими и длинными цепочками.

Таблица 57. Свойства микробов рода гемофилус

Тест, субстрат	Виды микробов						
	H.influenzae	H.aegyptius	H.parainfluenzae	H.haemolyticus	H.aphrophilus	H.paraphrophilus	H.ducreyi
Рост на простых питательных средах ¹	—	—	—	—	—	—	—
Рост на средах с дрожжевым автолизатором	—	—	+	—	—	+	—
Факторы роста	XV	XV	V	XV	X	V	X
Каталаза	+	+	+	+	—	—	—
Оксидаза ²	—	—	—	—	—	—	—
Редукция нитратов	+	+	+	+	+	+	+
β-Галактозидаза	—	—	+	—	+	+	—
Уреаза	+	+	—	+	—	—	—
Гемолиз	—	—	—	+	—	—	—
Индол ³	+	—	—	—	—	—	—

Примечания: ¹—без дрожжевых добавок; ² — использован реактив диметил-п-фенилендиамин; - положительная реакция у капсульных штаммов.

Таблица 58. Биохимические свойства некоторых гемофилов и других микробов, выделенных из общих источников

Вид микроба	Тест, субстрат									
	рост на простых питательных средах	морфология клеток	ката-лаза	окси-даза	ре-дук-ция нит-ратов	уре-аза	β-га-лак-този-даза	ге-мо-лиз	ин-дол	под-виж-ность
Haemophilus influenzae	—	Мелкие палочки	+	—	+	+	—	—	±	—
Haemophilus haemolyticus	—	То же	+	—	+	+	—	+β	—	—
Haemophilus parainfluenzae	—	» »	+	—	+	—	+	—	—	—
Neisseria meningitidis	—	Кокки	+	+	—	—	—	—	—	—
Neisseria perforans	+	»	+	+	—	—	—	+β	—	—
Branhamella catarrhalis	+	»	+	+	+	—	—	—	—	—
Moraxella	—	Коккобацилла	+	+	+	—	—	—	—	—
Acinetobacter	+	»	+	—	—	±	—	—	—	—
Pasteurella multacida	—	Грамотрицательная коккобацилла	+	+	+	—	—	—	+	—
Cardiobacterium hominis	+	Грамположительная коккобацилла	—	+	—	—	...	—	+	—
Streptococcus pneumoniae	—	Слабо	—	—	—	—	+	+α	—	—
Listeria monocytogenes	+	Грамположительные диплококки	+	—	—	—	...	+	...	+
		Грамположительные палочки								При 22 °C

Таблица 59. Биохимические свойства видов *Moraxella*, встречающиеся у человека

Вид моракселл	Тест, субстрат						Редукция		Рост на желчи	Гемолиз
	оксидаза	каталаза	уреаза	цитрат	фенилаланин	желатин	NO ₃	NO ₂		
<i>M.lacunata</i>	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-
<i>M.nonliquefaciens</i>	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-
<i>M.phenylpyruvica</i>	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-
<i>M.osloensis</i>	+	+	-	-	-	-	±	-	-	-
<i>M.atlantae</i>	+	+	-	-	-	-	-	-	+	...
<i>M.kingae</i> ¹	+	-	-	-	-	-	-	+N ₂	-	β
<i>M.urethralis</i>	+	+	-	±	-	-	-	+N ₂	-	...

Все виды моракселл углеводы не утилизируют, за исключением *M.kingae*.

Таблица 60. Биохимические свойства видов *Acinetobacter*

Вид	Тест, субстрат										
	оксидаза	каталаза	глюкоза	1% лактоза	10% лактоза	β-галактозидаза	редукция нитрата	цитрат	уреаза	желатин	гемолиз
<i>A.calcoaceticus</i>	-	+	O: + F: -	O: ± F: -	+	-	-	+	±	±	±
<i>A.lwoffii</i>	-	+	O: - F: -	O: - F: -	-	-	-	±	±	±	±

Примечания. O — окисляется; F — ферментируется.

Таблица 61. Дифференцирующие свойства микробов, патогенных для человека, родов *Chromobacterium*, *Flavobacterium*, *Cardiobacteria*, *Pasteurella*

Род, вид микроба	Тест									
	рост на простых средах	пигмент	каталаза	оксидаза	редукция нитратов	разжижение желатина	индол	глюкоза, газ	лактоза	арабиноза
<i>C.violaceum</i>	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-
<i>F.meningosepticum</i>	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-
<i>C.hominis</i>	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-
<i>P.multocida</i>	(слабо) -	-	+	+	+	-	+	+	-	+

Колонии, подозрительные на моракселлы или на ацинетобактер, отсеивают секторами на чашку Петри или косяки с сывороточным агаром для получения чистой культуры.

Видовые особенности моракселл и ацинетобактер даны в табл. 59, 60.

В последние годы все чаще из клинических материалов выделяют некоторые виды бактерий, представители которых обычно обитают на объектах внешней среды, растений или имеют определенный уровень патогенности для животных. *Chromatobacterium violaceum* обнаруживают

Т а б л и ц а 62. Свойства микробов рода *Bordetella*

Тест, субстрат	Вид микроба		
	<i>B. pertussis</i>	<i>B. parapertussis</i>	<i>B. bronchiseptica</i>
Рост на простом агаре	—	+ 48 ч	+ 24 ч
Пигмент <i>коричневый</i>	—	+	—
Каталаза	±	+	+
Оксидаза	+	—	+
Редукция нитратов	—	—	+
Уреаза	—	+	+
Цитрат по Симмонсу	—	+	+

при гнойных и септических заболеваниях человека. Это грамотрицательные палочки, прямые или слегка изогнутые с закругленными концами; в мазках располагаются одиночно, парами, короткими цепочками; иногда наблюдается биполярное окрашивание клеток. На поверхности агара формируются мелкие, гладкие, блестящие колонии фиолетового цвета. *Flavobacterium meningosepticum* могут быть причиной менингитов, особенно у новорожденных, а в ассоциации с другими микробами — септицемии. Это грамотрицательные тонкие палочки, иногда коккобациллы. На плотных средах колонии мелкие, гладкие, выпуклые, блестящие, прозрачные, маслянистые, серо-белого цвета, на кровяных средах вызывают легкое позеленение среды.

Cardiobacterium hominis — обычный обитатель слизистых оболочек верхних дыхательных путей человека, однако ее выделяют при эндокардитах, особенно после операционных вмешательств на сердце. Эти полиморфные палочки в мазках располагаются отдельными клетками, парами, короткими цепочками или группами. При окраске по Граму плохо обесцвечиваются, поэтому в мазках можно видеть вариablyно окрашенные клетки. На простых средах растут очень скудно, добавление сыворотки и крови

улучшает рост. На кровяных средах формируют очень мелкие круглые, выпуклые, матовые колонии, вокруг которых наблюдается легкое позеленение среды. Характерные особенности этой группы бактерий и их дифференциация представлены в табл. 61.

Pasteurella multocida, как и представители рода *Bordetella*, иногда вызывает респираторные и другие воспалительные процессы глотки, бронхов, тонзиллофарингиты, ларинготрахеобронхиты. По морфологии все они мелкие короткие грамотрицательные палочки или коккобациллы. При росте на кровяных средах *P. multocida* образует мелкие колонии с коричневым окрашиванием среды; *Bordetella* растут на специальных средах (Борде—Жангу, казеиновоугольный агар) в виде мелких, гладких, блестящих колоний с жемчужным или сероватым оттенком. Основные свойства по дифференциации бактерий этой группы даны в табл. 62.

7.4.3. Грамотрицательные анаэробные палочки

В род *Бактероидес* (Genus *Bacteroides*) включено 22 вида микроорганизмов; некоторые из них выделены от человека и при определенных условиях могут быть патогенны: *B. fragilis*, *B. ruminicola*, *B. serpens*, *B. coagulans*, *B. pneumosintes*, *B. melaninogenicus*, *B. oralis*.

По морфологии — это грамотрицательные полиморфные палочки, неподвижные или подвижные благодаря перетрихиальным жгутикам. Строгие анаэробы. Реакция на каталазу отрицательная. Бактероиды при росте на питательных средах, содержащих пептон и глюкозу, при pH 7,0 вырабатывают смесь кислот: уксусную, молочную, пропионовую, а также масляную, изомаляную и изовалериановую. Растут на плотных питательных средах с кровью, сывороткой, на сердцечно-мозговом агаре, в атмосфере природного магистрального газа.

Характерным признаком для анаэробной бактериальной инфекции является наличие фекального или гнилостного запаха.

Т а б л и ц а 63. Биологические свойства часто выделяемых бактериоидов

Вид микроба	Тест, субстрат												
	пигмент на 5 % агаре с кровью	редукция нитратов	подвижность при 37°	индол	H ₂ S	разжижение желатина	уреаза по Христенсену	глюкоза	лактоза	мальтоза	сахароза	маннит	
<i>B. corrodens</i>	—	+	—	—	—	—	+	—	—	—	—	—	
<i>B. fragilis</i>	—	—	—	—	—	±	..	+	±	±	+	—	
<i>B. oralis</i>	—	—	—	—	+	±	—	+	+	+	+	+	
<i>B. melaninogenicus</i>	+ ¹	—	—	+	—	±	..	+	+	+	+	+	
<i>B. serpens</i>	—	—	+	—	+	+	..	+	+	+	—	—	

Примечания. (±) — биоварианты; (..) — нет данных; ¹ — черный пигмент.

Таблица 64. Основные биохимические свойства нейссерий и бранхамеллы

Вид микроба	Тест, субстрат													
	ката-лаза	окси-даза	пиг-мент	утилизация углеводов					редукция		поли-сахар-ид	ге-мо-лиз	реак-ция на йод	рост на 5 % жел-чи
				глю-ко-за	маль-тоза	фрук-тоза	сахар-роза	лак-тоза	нит-рат-ов	нит-рит-ов				
<i>N.gonorrhoeae</i>	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
<i>N.meningitidis</i>	+	+	-	+	+	-	-	-	-	±	-	-	-	-
<i>N.subflava</i>	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+
<i>N.flava</i>	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+
<i>N.perflava</i>	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+
<i>N.sicca</i>	+	+	±	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+
<i>N.mucosa</i>	+	+	±	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+
<i>N.flavescens</i>	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+
<i>B.catarrhalis</i>	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+

Выделение чистой культуры и изучение биохимических свойств бактериоидов затруднено из-за их быстрой потери жизнеспособности при пересевах. Идентификация некоторых видов бактериоидов представлена в табл. 63.

7.4.4. Грамотрицательные аэробные и факультативно-анаэробные кокки

В род нейссерия (*Neisseria*), согласно Bergey (1974), включено 6 видов, которые выделяются от человека: патогенные виды — *N. meningitidis*, *N. gonorrhoeae* и так называемые непатогенные нейссерий — *N. mucosa*, *N. sicca*, *N. subflava*, *N. flavescens*. *N. subflava* включает три пигментообразующие самостоятельные группы — *N. subflava*, *N. perflava* и *N. flava*.

N. meningitidis — возбудитель эпидемического цереброспинального менингита, менингококцемии. *N. gonorrhoeae* — возбудитель гонореи. Другие виды нейссерий являются комменсалами. При определенных условиях признана их роль в развитии менингитов, эндокардитов, сепсиса, пневмоний, отитов, синуситов и других заболеваний.

Для выделения нейссерий используют питательный агар (рН 7,2—7,4), содержащий не менее 1,6 г/л аминокислотного азота, с добавлением 5—10 % крови или 10—20 % инактивированной лошадиной сыворотки. Чашки с посевами следует поставить в эксикатор с зажженной стеариновой свечой, после стгорания кислорода будет обеспечен рост культур в атмосфере с повышенной концентрацией CO₂. В этих условиях культивирования хорошо растут как патогенные, так и непатогенные виды нейссерий. Через 24 ч выращивания при 37 °С на плотной среде изучают морфологию выросших колоний. Менингококки на кровяных средах растут в виде непрозрачных, беловато-серых, крупных колоний с

блестящей поверхностью и ровными краями маслянистой консистенции, не лизируют эритроцитов. На свежеприготовленном сывороточном агаре менингококки имеют вид бесцветных, опалесцирующих, плоских, круглых колоний с ровным краем, не имеющих валика и уплотнения в центре.

Непатогенные нейссерий растут на поверхности кровяного агара в виде либо круглых гладких с ровными краями, блестящей поверхностью колоний, либо неправильной формы с неровными краями шероховатых колоний с причудливо изрезанной поверхностью. На кровяном агаре колонии непатогенных нейссерий мельче колоний стафилококка, но крупнее стрептококка и палочки инфлюэнцы, не зеленеют кровяной агар.

Непатогенные нейссерий растут на поверхности сывороточного агара в виде сероватых, желтоватых либо бесцветных колоний диаметром от 1 до 3 мм. Пигмент накапливается при культивировании на сывороточных средах через 48—72 ч.

В мазках из подозрительных на нейссерий колоний, окрашенных по Граму, видны грамотрицательные бобовидные, округлые кокки, расположенные попарно и довольно равномерно распределяющиеся в поле зрения; из шероховатых колоний — грамотрицательные кокки в виде скоплений. Клетки микробной популяции имеют однородное окрашивание у нейссерий, могут быть полиморфно окрашены у менингококков, а вследствие лизиса части клеток у гонококков всегда имеются более светлокрасные особи.

С сывороточного агара ставят пробы на оксидазу и каталазу¹. Положительные пробы на оксидазу и каталазу у грамотрицательных кок-

¹ Реакцию на каталазу с 10 % H₂O₂ нельзя ставить с питательных сред с нативной кровью.

ков позволяют предположить, что исследуемая колония относится к одному из видов нейссерий. Подозрительные колонии отсеивают секторами на чашки Петри или косяки с сывороточным агаром для получения чистой культуры. С целью определения видовой принадлежности нейссерий используют: жидкие или полужидкие среды Хью — Лейфсона, содержащие глюкозу, мальтозу, лактозу, сахарозу, фруктозу с двойной концентрацией индикатора Андресе, среды для определения редукции нитратов и нитритов с 2—3 каплями лошадиной сыворотки, агар с 5 % сахарозы для определения полисахаридообразования (с помощью раствора Люголя), агар из гидролизата казеина для учета йодной реакции (0,25 % раствор йода наносят на поверхность культур, посеянных бляшками).

Видовые особенности рода *Neisseria* представлены в табл. 64.

В случае выделения культур, подозрительных на *N. meningitidis*, проводят определение капсульного антигена, используя диагностические поливалентные и групповые менингококковые агглютинирующие или преципитирующие сыворотки (см. Методические указания. Приказ № 98 МЗ СССР от 29.01.81 г. по бактериологической диагностике менингококковой инфекции и бактериальных менингитов).

В род *Бранхамелла* (*Branhamella*) пока включен один вид *B. catarrhalis*. Он постоянно обнаруживается на слизистых верхних дыхательных путей и мочеполового тракта. Имеются случаи выделения *B. catarrhalis* при менингитах, острых фарингитах, бронхитах.

7.4.5. Грамположительные факультативно-анаэробные кокки

Род стафилококка (*Staphylococcus*). Согласно современной классификации (Берджи, 1974), состоит из трех видов: *S. epidermidis*, *S. aureus*, *S. saprophyticus*. Они представляют собой грамположительные кокки, располагающиеся парами, отдельными клетками и гроздьями. Спор и капсул не образуют. Неподвижны. Аэробы или факультативные анаэробы. Хорошо растут на простых питательных средах при температуре от 6,5 до 46 °С, лучше — при 37 °С. Переносят повышенное содержание NaCl в среде от 5 до 10 %. Электролитной является желточноевая среда, содержащая 7,5 % NaCl. О наличии лецитиназы свидетельствует образование вокруг колоний через 18—24 ч выраживания радужного венчика.

Колонии стафилококка круглые, гладкие, блестящие, матовые. Пигмент белый или золотистый разных оттенков, четко выявляется через 24—36 ч роста.

Стафилококки вида *ауреус* обладают способностью продуцировать экзотоксины, гемолизины, лейкоцидины, имеют ферменты: коагулазу, лецитиназу, ДНК-азу, фибринолизин, гиалуронидазу и др. Тесты на наличие коагулазы и ДНК-азы являются ведущими при определении *S. aureus*.

Т а б л и ц а 65. Биологические свойства видов стафилококка

Тест, субстрат	Вид		
	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. saprophyticus</i>
Каталаза	+	+	+
Оксидаза	—	—	—
Редукция нитратов	+	±	+
Пигмент	Золотистый, белый	Белый	Белый, редко желтый
Лецитиназа	+	(±) ¹	—
Коагулаза	+	—	—
Маннит:			
окисление	+	—	+
ферментация	+	—	—
Гемолиз на 5 % крови кролика	+	—	—
ДНК-аза	+	—	—
Фосфатаза	+	+	—
Чувствительность к новобиоцину	+	+	—

Биологические свойства и дифференциация видов стафилококка представлены в табл. 65.

При необходимости внутривидовой идентификации используют метод фаготипирования. Методика его проведения, учета результатов, определение фагогрупп и их наименований изложены в инструкции по применению набора стафилококковых фагов, выпускаемых в стране. Иногда для маркирования штаммов используют их ферментативную активность, позволяющую определить биоварианты.

Род стрептококков (*Streptococcus*) объединяет очень большую группу микроорганизмов, характеризующихся шаровидной или овальной формой клеток. В мазках микробы располагаются парами, кучками, цепочками различной длины. Стрептококки — факультативные анаэробы, грамположительные, спор не образуют, неподвижны, за исключением некоторых штаммов энтерококка. Реакция на ферменты каталазу и оксидазу отрицательна. На плотных питательных средах с кровью стрептококки через 24 ч роста при 37 °С образуют мелкие 1—2 мм прозрачные, полупрозрачные или непрозрачные колонии, сероватые или бесцветные, гомогенные или зернистые. Одни виды обладают гемолитической активностью, от резко выраженного гемолиза с полным просветлением среды (β-гемолиз) до разной степени ее позеленения (α-гемолиз). Имеются виды, не обладающие гемолитической способностью. Стрептококки хорошо растут на жидких питательных средах с 0,2 % глюкозы, на полужидких и плотных средах с 5 % крови или 10 % инактивированной сыворотки животных, оптимальное значение pH 7,6—7,8.

Т а б л и ц а 66. Дифференциальные свойства некоторых представителей группы зеленящих стрептококков¹

Тест, субстрат	Вид				
	<i>S. mutans</i>	<i>S. sanguis</i>	<i>S. mitior</i>	<i>S. milleri</i>	<i>S. salivarium</i>
Ферментация маннита	+	—	—	—	—
Ферментация сорбита	+	—	—	—	—
Образование декстрана из сахарозы	—	+	±	—	—
Реакция Фогеса — Проскауэра	—	—	—	—	+
Образование перекисей	—	+	+	—	—
Аргининдегидролаза	—	+	—	+	—

¹ См.: *Hardie J. M., Bowden G. H. J. Dent. Res.*, 1976, vol. 55, p. 166—176.

Гемолитические штаммы стрептококка на жидких и полужидких питательных средах дают пристеночный рост с придонным осадком без помутнения питательной среды. Зеленящие стрептококки вызывают общее помутнение среды с образованием придонного осадка.

Основные дифференциальные свойства некоторых видов рода стрептококков представлены в табл. 66—68.

В настоящее время описано 17 серологических групп стрептококка, обозначенных латинскими буквами от А до Т (по Ленсфильд), такое деление основано на наличии у представителей разных групп группоспецифического антигена. Серологическую группу стрептококков определяют в реакции преципитации с иммунными групповыми сыворотками.

Наиболее патогенен для человека вид *S. pyogenes* (группа А). Эти стрептококки являются возбудителями многих гнойно-воспалительных процессов человека: скарлатины, ангина, рожевого воспаления кожи, септицемии, отитов, хронических стрептококковых инфекций — ревматизма, гломерулонефрита. Они формируют мелкие, непрозрачные, зернистые колонии с зоной полного гемолиза, диаметр которого в несколько раз превышает диаметр самой колонии.

S. agalactiae (группа В) обычно обитают на слизистой влагалища, могут вызывать послеродовые инфекции, сепсис, менингиты новорожденных, стоматиты. На кровяном агаре вокруг колоний образуется узкая зона α -гемолиза. Гемолитическая активность резко возрастает, если рядом растут штаммы стрептококков или стафилококков, обладающие гемолитической активностью (САМР-тест). Для этого на чашку с кровяным агаром (5% бараньих эритроцитов) наносят по диаметру чашки культуру *S. aureus*, а затем в виде полос перпендикулярно к стафилококку ряд изучаемых культур стрептококка. Только *S. agalactiae* образует зону усиленного гемолиза.

S. faecalis (группа D), являясь нормальными обитателями кишечника, могут быть причиной сепсиса, перитонита, острых поражений кишечника, раневых инфекций, эндокардитов, поражений мочевыводящих путей (см. табл. 68).

Стрептококки других групп (гемолитические и зеленящие) могут вызывать легко протекающие воспалительные процессы, иногда являясь причиной длительно текущих эндокардитов. Определенные виды зеленящих стрептококков рассматривают как возбудителей кариеса зубов, некоторых заболеваний слизистой ротовой полости. Тесты их ориентировочной дифференциации — см. табл. 66.

S. pneumoniae, согласно современной классификации, включен в род стрептококка на уровне вида. *S. pneumoniae* является причиной острой долевой пневмонии, сепсиса, острых синуситов, отитов, а также бактериального менингита.

Пневмококки — ланцетовидные, грамположительные диплококки с заостренными наружными концами, каждая пара кокков окружена капсулой, часто видны короткие и длинные цепочки. Для выделения пневмококков используют питательный агар на гидролизате Хоттингера (аминный азот 1,6—1,7 г/л, рН 7,6), содержащий 5% крови (кролика, барана, человека) и 5—10% дрожжевого экстракта. На кровяном агаре колонии пневмококка гладкие, блестящие, полупрозрачные, плоские, 0,5—1 мм в диаметре, окружены зеленящей зоной α -гемолиза. С возрастом центр колоний подвергается аутолизу и западает, колонии приобретают вид «шашки». Встречаются слизистые сливные колонии. Для дифференцирования от других зеленящих стрептококков используют способность *S. pneumoniae* ферментировать инулин, чувствительность к оптохину и желчи (см. табл. 66).

По капсульному полисахариду пневмококки делятся на 83 типа. Для серологического типирования используют реакцию набухания капсулы по Нейфельд или реакцию агглютинации на стекле с поливалентными, групповыми и типовыми сыворотками. Метод проведения серологического анализа и обозначение капсульных вариантов приложены к наставлению по применению диагностических сывороток.

Оптохиновый тест. Чистую культуру засевают на агар, содержащий 1 : 50 000—1 : 100 000 оптохина. На следующие сутки учитывают результат. Пневмококки не растут в присутствии оптохина. Можно использовать бумажные диски

Т а б л и ц а 67. Основные дифференциальные свойства некоторых видов стрептококков

Вид	Тест, субстрат										
	антигенные группы по Ленсфильд	гемолиз	рост при 45°	молоко с метиленовым синим	рост при 6,5 % NaCl	рост при pH 9,6	желатин	10 % желчный бульон		40 % желчно-крово-яной агар	чувствительность к оптохи-ну 1:400
								рост	растворенные		
<i>S. pyogenes</i>	A ⁴	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>S. agalactiae</i>	B	1,2	—	—	—	—	—	+	—	+	—
<i>S. equisimilis</i>	C	1	—	—	—	—	—	+	—	—	—
<i>S. faecalis</i>	D	1, 2, 3	+	+	+	+	±	+	—	+	—
<i>S. faecium</i>	D	1, 3	+	+	+	+	—	+	—	+	—
<i>S. sanguis</i>	H	2	±	—	—	—	—	+	—	+	—
<i>S. anginosus</i>	F	2, 3	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>S. pneumoniae</i>	—	2	—	+	—	—	—	—	+	—	+
<i>S. salivarius</i>	Зеленя- щие	2	+	—	—	—	—	+	—	—	—
<i>S. mitis</i>	»	2	—	—	—	—	—	+	—	—	—
<i>S. sp.</i>	»	2	±	—	—	—	+	+	—	—	—

Примечания. 1 — прозрачная зона гемолиза вокруг колоний на агаре с 5 % крови; 2 — зеленоватое окрашивание и частичный гемолиз вокруг колоний; 3 — нет гемолиза на агаре с кровью; 4 — серотипирование стрептококков группы А проводят с помощью преципитирующих стрептококковых сывороток группы А, выпускаемых ИЭМ им. Н. Ф. Гамалеи АМН СССР.

Т а б л и ц а 68. Схема дифференциальной диагностики энтерококков

Вид, подвид	Тест, субстрат						фермен- тация ман- нита	полужидкий агар (под- вижность)
	рост на желчно-щелочном агаре	резистент- ность к теллуриту калия	энтерококковая дифференциально- диагностическая среда					
			редукция ТТХ	гемо- лиз	протео- лиз			
<i>S. faecalis</i>	+	+	+	—	—	+	—	
<i>S. faecalis</i> subsp. <i>zymogenes</i>	+	+	+	+	±	+	—	
<i>S. faecalis</i> subsp. <i>lyguefaciens</i>	+	+	+	—	+	+	—	
<i>S. faecium</i>	+	—	—	+	—	—	—	
Подвижные энте- рококки	+	+	+	—	—	+	+	

См. Седов В. И. Методические рекомендации по выделению и идентификации энтерококков.— М., 1982. *S. faecium* var. *durans*.

Таблица 69. Основные свойства некоторых видов рода *Peptococcus*

Вид микробов	Тест, субстрат								
	желатин	глюкоза	фруктоза	галактоза	сахароза	арабиноза	глицерин	индол	сероводород
<i>P. niger</i>	—	—	—	—	—	—	—	—	+
<i>P. activus</i>	+	+	+	+	+	—	—	+	+
<i>P. asaccharalyticus</i>	—	+	—	—	—	—	—	+	+
<i>P. aerogenes</i>	—	+	+	—	—	—	—	+	+
<i>P. anaerobius</i>	—	—	—	—	—	—	—	+	—

Таблица 70. Основные свойства некоторых видов рода *Peptostreptococcus*

Вид микробов	Тест, субстрат								
	глюкоза	фруктоза	галактоза	сахароза	мальтоза	лактоза	крахмал	ксилоза	сероводород
<i>P. anaerobius</i>	(+)	(+)	—	—	(+)	—	—	—	+
<i>P. productus</i>	+	+	+	+	+	+	—	+	—
<i>P. lanceolatus</i>	+	—	—	+	—	—	+	—	—
<i>P. micros</i>	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>P. parvulus</i>	+	—	—	—	—	+	—	—	—

Примечание. (+) — слабая реакция.

Таблица 71. Дифференциация представителей рода *Bacillus*

Вид микробов	Тест, субстрат						
	капсула	подвижность	нитраты	маннит	крахмал	гемолиз	анаэробный рост в глюкозном бульоне
<i>B. anthracis</i>	+ ²	—	+	—	+	—	+
<i>B. subtilis</i>	—	+	+	+	+	α	—
<i>B. cereus</i>	—	+ ¹	+	—	+	β	+
<i>B. pumilus</i>	—	+	—	+	—	...	—

Примечания. 1 — *B. cereus* var. *mycoides* обычно неподвижен; 2 — вирулентные штаммы.

с 6 мкг оптохина, которые накладывают после посева на поверхность среды (посев лучше проводить секторами). Пневмококки вокруг диска образуют зону задержки роста не менее 18 мм.

Желчный тест основан на способности 10 % желчи и 2 % раствора оксихолатов лизировать пневмококк. В две пробирки с 2–3 мл сыровоточного бульона с 10 % желчи крупного рогатого скота и без нее добавляют 0,5–1 мл испытуемой бульонной культуры и выдерживают 1 ч при 37 °С. При лизисе пневмококка отмечается просветление бульона по сравнению с контролем. При сомнительном результате пробирки оставляют при комнатной температуре до следующего дня и проводят окончательный учет результатов.

7.4.6. Грамположительные анаэробные кокки

Представители семейства пептококковых обитают на слизистых ротовой полости, пищеварительного, респираторного, урогенитального тракта человека и животных. При определенных условиях могут вызывать тяжелые заболевания в ассоциации с другими микроорганизмами.

В род пептококка (*Genus Peptococcus*) — анаэробные микрококки — включены виды: *P. niger*, *P. asaccharalyticus*, *P. activus*, *P. anaerobius*, *P. aerogenes*. По морфологии грамположительные кокки располагаются поодиночке, парами, группами. Цепочек никогда не образуют, неподвижные, спор не образуют, анаэробы. Растут на специальных средах для анаэробов¹ в анаэробном состоянии. Гемолиз отсутствует. Реакции на каталазу и редукцию нитратов положительные.

Дифференциация видов представляет большие трудности и основывается на комплексе свойств (табл. 69).

В род пептострептококка (*Genus Peptostreptococcus*) — анаэробные стрептококки — включены виды: *P. anaerobius*, *P. productus*, *P. lanceolatus*, *P. micros*, *P. parvulus*. По морфологии это грамположительные кокки, располагающиеся парами или цепочками разной длины, неподвижны, спор не образуют, анаэробы. Для выращивания их используют специальные среды для культивирования анаэробов². Реакции их на каталазу и редукцию нитратов отрицательные. Дифференциация видов представляет большие трудности (табл. 70).

7.4.7. Грамположительные аэробные и факультативно-анаэробные палочки

Род бацилла (*Bacillus*) состоит из 48 видов¹, но лишь несколько видов можно рассматривать как имеющие значение в патоло-

¹ См. с. 315.

² См. с. 315.

Таблица 72. Основные биологические свойства нокардий

Вид	Тест, субстрат									
	форма колоний	пигмент	время образования мицелия	кислотоустойчивость	чувствительность к пенициллину	чувствительность к лизоциму	уреаза	глюкоза	мальтоза	гидролиз твинов
<i>N. asteroides</i>	Приподнятые, круглые, складчатые или зернистые с неровным краем	Желто-оранжевый	Через 5 дней	+	—	—	+	+	—	20, 40, 60
<i>N. lutea</i>	Приподнятые, круглые, слизистые с ровным краем	Розово-оранжевый	Через 20 ч	Частично	+	+	+	+	+	60

гии человека: *V. anthracis*, *V. subtilis*, *V. cereus*, *V. pumilus*.

V. anthracis является возбудителем сибирской язвы. Другие виды рода *Vacillus* широко распространены в воде, воздухе, почве, пищевых продуктах, выделяются из организма человека и животных. Их патогенная роль для человека и животных невелика. В последние годы имеются сообщения, что спорообразующие аэробные бактерии могут быть причиной септицемии, пневмонии, пищевых отравлений и других воспалительных процессов человека.

По морфологии эта группа микробов представляет собой грамположительные или грамвариабельные палочки, расположенные отдельными клетками или цепочками (*V. cereus*). Аэробы или факультативные анаэробы. Споры образуются только в аэробных условиях, устойчивы к нагреванию. Реакция на каталазу положительная, реакция на оксидазу отрицательная. Микробы рода *Vacillus* не требовательны к питательным средам. Указанные выше виды бацилл образуют различные формы колоний на простых питательных средах от мелких, гладких и слегка желтоватых (*V. pumilus*) до крупных, круглых, шероховатых, неправильной формы, с матовой извилистой поверхностью; колонии с возрастом приобретают окраску от кремовой до коричневой (*V. subtilis*, *V. cereus*). На бульоне рост в виде поверхностной морщинистой пленки, без помутнения среды (за исключением *V. anthracis*, *V. cereus*). Минимальный набор тестов, позволяющих ориентировочно дифференцировать бациллы до вида, представлен в табл. 71.

Из рода нокардия (*Genus Nocardia*). *N. asteroides* и *N. lutea* могут быть выделены от человека. По морфологии — грамположительные палочки, способные к образованию мицелия, воздушных гифов и ветвящихся нитей. Спор не образуют. Строгие аэробы. Неподвижны. Реакция редукции нитратов непостоянна. Кислотоустойчивость зависит от вида. Хорошо растут на простых питательных средах. Образуют пигмент: белый, серый, желтый, розовый, оран-

жевый, красный. *N. asteroides* выделяется при кожных поражениях человека, *N. lutea* — в случаях актиномикоза и при воспалениях слезных желез. Основные биологические свойства представлены в табл. 72.

Род коринебактерий (*Corynebacterium*) объединяет около 20 групп грамположительных палочек. Часть из них представляет интерес для клинических микробиологов. *C. pseudodiphtheriticum* является постоянным обитателем слизистых и кожи человека. *C. xerosis* обычно выделяют со слизистой оболочки слезного канала, но может быть причиной длительно и вялотекущих конъюнктивитов. *C. diphtheriae* вызывает дифтерию.

Виды, перечисленные ниже, постоянно паразитируют на слизистых оболочках глотки, носа, трахеи здоровых лиц, но могут быть причиной инфекционно-воспалительных процессов: *C. ulcerans* — дифтериеподобных заболеваний с поражением слизистых верхних дыхательных путей, *C. minutissimum* — характерных кожных поражений человека (эритразмы), *C. pseudotuberculosis* — абсцессов с язвенно-некротическими очагами, язвенных лимфаденитов, *C. epizooticum* — тяжелой абсцедирующей бронхопневмонии, *C. pyogenes* и *C. haemolyticum* способны вызывать у человека язвенно-некротические поражения в виде фарингитов, тонзиллитов, гингивостоматитов, уретритов и поражений кожи. *C. vaginalis* — группа мелких палочек, вариабельно окрашивающихся по Граму; их выделяют со слизистой оболочки влагалища здоровых женщин, но они могут вызывать вялотекущие вагиниты.

По морфологии все коринебактерии — грамположительные полиморфные палочки, не ветвятся. Спор и капсул не образуют. Подвижностью не обладают. Слегка изогнутые изящные палочки с булавовидными утолщениями на концах, располагающиеся в виде войлока, пакета булавок, букв VL, содержащие темноокрашенные зерна на концах — морфология, характерная для *C. diphtheriae*, *C. ulcerans* и *C. pseudo-*

Т а б л и ц а 73. Биохимические особенности микробов некоторых видов рода коринебактерий и вида листерий

Тест, субстрат	Вид									
	<i>C.pseudotuberculosis</i>	<i>C.xerosis</i>	<i>C.pseudodiphtheriticum</i>	<i>C.enzymicum</i>	<i>C.ulcerans</i>	<i>C.pyogenes</i>	<i>C.haemolyticum</i>	<i>C.minutissimum</i>	<i>C.diphtheriae</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>
Каталаза ¹	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+
Уреаза	±	-	+	... ³	+	-	-	-	-	-
Редукция нитратов	±	+	+	+	-	-	-	-	+	-
Желатиназа	±	-	-	(слабо)	+	+	-	-	-	-
Гемолиз	+	-	-	...	+	+	+	-	± ²	+
Цистиназа	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Глюкоза	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
Лактоза	±	-	-	+	-	+	+	-	-	-
Мальтоза	+	+	-	+	±	+	+	+	+	+
Сахароза	±	+	-	+	-	+	+	-	-	±
Размер колоний, мм	1	2—3	1—2	0,5—1	≥0,5	≥0,5	1—2	1—2	2—3	0,5—1
Пигмент	Желто-ватобелые	Желтоватые	Кремовые	Желтоватобелые	-	-	-	-	-	-

П р и м е ч а н и я . 1 — реакцию на каталазу ставят с 10 % H₂O₂ и микробами, выросшими на средах без добавления крови; 2 — биовариант; 3 — нет данных.

tuberculosis. У других видов коринебактерий палочки более толстые, короткие, обычно располагаются в виде частокола, темноокрашенные зерна встречаются редко и с одного конца, так же как и булавовидные утолщения, наблюдаются коккобациллярные формы.

Коринебактерий растут на питательном агаре, содержащем не менее 1,6 г/л аминного азота с добавлением глюкозы (1 %), крови (5 %) или сыворотки животных (10 %), рН сред 7,4—7,6. Через 24 ч на питательных средах фор-

мируются колонии диаметром 1—3 мм, круглые, гладкие или слегка зернистые, непрозрачные с желтым, кремовым или серовато-белым пигментом. У дифтерийных бактерий может наблюдаться S-форма колоний (гладкие), SR- и R-формы — шероховатые.

В мазках из выросших колоний видны вышеописанные грамположительные палочки с характерным расположением.

Для выделения чистых культур и проведения идентификации подозрительные колонии отсе-

Т а б л и ц а 74. Биологические свойства некоторых видов рода Clostridium

Вид микроба	Тест, субстрат							
	подвижность	образование газа в жидкой питательной среде	разжижение желатина	лептонизация молока	уреаза ¹	индол	гидролиз крахмала	гемолиз
<i>C.perfringens</i>	-	+	+	КСГ ²	-	-	+	+
<i>C.novyi</i> A,B	+	+	+	КС ³ /П	-	-	-	+
<i>C.septicum</i>	+	+	+	КС	-	-	-	+
<i>C.histolyticus</i>	+	+	+	П ⁴	-	-	-	+
<i>C.sordelii</i>	+	+	+	П	+	+	-	±
<i>C.bifermentas</i>	+	+	-	П	-	+	-	±
<i>C.fallax</i>	+	+	-	КС	-	-	+	-
<i>C.tetani</i>	+	..	+	Слабо	-	+	..	+
<i>C.botulinum</i>	+	+	+	П/-	-	-	-	+

П р и м е ч а н и я . 1 — на среде Христенсена; 2 — КСГ — кислота, сгусток, газ; 3 — КС — кислота, сгусток; 4 — П — протеолиз; (±) — биоварианты; (..) — нет данных.

вают на пробирки с вышеуказанными питательными средами. Основные биохимические свойства, позволяющие их дифференцировать по видам, представлены в табл. 73.

Листерии (*Genus Listeria*) по морфологии — грамположительные мелкие, овоидные, короткие, кокковидные палочки, располагающиеся единичными клетками или кучками, иногда можно видеть удлинённые палочки и нити. В культуре после 24 часов роста обнаруживается типичное дифтероидное расположение клеток в виде V или Y. Спор и капсул не образуют. Аэробы, микроаэрофилы. Подвижность лучше выражена, если культивировать листерии при температуре от 20 до 24 °С. На простых питательных средах рост скудный, необходимо добавлять кровь или сыворотку. Реакция на каталазу положительная. Реакция на оксидазу отрицательная. Сероводород не образуют.

Listeria monocytogenes патогенна для человека и животных. У человека вызывает острое заболевание с полиморфной клинической картиной (менингиты, энцефалиты, септицемия, эндокардиты, аборт, абсцессы) — листериоз. Биологические свойства *Listeria monocytogenes* см. в табл. 73.

7.4.8. Грамположительные анаэробные палочки

Род клостридия (*Genus Clostridium*) объединяет более 60 видов микроорганизмов. По морфологии грамположительные палочки веретенообразные, имеют вид теннисных ракеток или барабанных палочек. Образуют споры; расположение их в клетке центральное, субтерминальное или терминальное. Споры овальной или круглой формы, устойчивые к нагреванию. Капсула вариабельна. Анаэробы. Реакции на каталазу и оксидазу отрицательные. Реакция редукции нитратов вариабельна. Большинство видов рода клостридия являются сапрофитами и обитают в почве, некоторые виды микробов этого рода, попадая в организм человека, вызывают тяжелые заболевания (табл. 74) Возбудитель столбняка — *C. tetani*; ботулизма — *C. botulinum* группы A, B, C, D, E, F, G; газовой гангрены — *C. perfringens*, *C. novyi* A, B, C, *C. septicum*, *C. histolyticus*, *C. sordellii*, *C. bifermentans*, *C. fallax*. Причиной пищевых токсикоинфекций может быть *C. perfringens* типов A, B, C, D, E.

7.5. МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ МИКРООРГАНИЗМОВ К АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫМ ПРЕПАРАТАМ

По степени чувствительности к антибиотикам микроорганизмы разделяют на 3 группы: чувствительные, умеренно устойчивые, устойчивые. К чувствительным относят штаммы, рост которых подавляется концентрациями препарата, создающимися в сыворотке крови больного при введении среднетерапевтических доз антибиотиков. К умеренно устойчивым относят штаммы, для подавления роста которых требуются концентрации, создающиеся в сыворотке крови при введении больному максимальных терапевтических доз антибиотиков. Устойчивыми считаются микроорганизмы, рост которых не подавляется максимально допустимыми дозами лекарственных веществ.

Степень чувствительности микроорганизмов к химиотерапевтическим веществам в лабораторных условиях определяется минимальной концентрацией препарата, подавляющей рост испытуемого штамма *in vitro* (МПК). Сопоставление минимальной подавляющей концентрации, определенной *in vitro*, и концентрации, достигаемой в организме при введении терапевтических доз этого препарата больному, позволяет установить степень чувствительности возбудителя к данному препарату [Навашин С. М., Фомина И. П., 1982].

Для определения чувствительности бактерий к антибиотикам применяют метод диффузии в агар с использованием бумажных дисков и

метод серийных разведений в плотных и жидких питательных средах. Используют также ускоренные методы.

7.5.1. Метод диффузии в агар с использованием бумажных дисков

На поверхность плотной питательной среды¹, разлитой в чашки Петри примерно по 20 мл, наносят испытуемую бактериальную взвесь в количестве 1 мл. Используют чистую культуру — либо 18–20-часовую бульонную, либо смыв 18–20-часовой культуры с плотной питательной среды. Плотность суспензии должна соответствовать стандарту мутности № 10 ГКИ им. Тарасевича.

Взвесь равномерно распределяют по чашке, остаток жидкости отсасывают пастеровской пипеткой. Чашки подсушивают при комнатной температуре 30–40 мин, после чего на поверхность чашки с помощью пинцета помещают диски с антибиотиками.

Бумажные диски, изготовленные заводским путем, содержат одну концентрацию антибио-

¹ Сухая стандартная питательная среда АГВ, выпускаемая НИИ по производству питательных сред (г. Махачкала).

Т а б л и ц а 75. Коррелятивная связь диаметра зон задержки роста и значений МПК антибиотиков

Антибиотики, содержащиеся в диске	Содержа- ние анти- биотика в диске мкг	Диаметр зон, мм						МПК, мкг/мл	
		для сред № 1 и 2			для среды АГВ			устой- чивые	чув- стви- тель- ные
		устой- чивые	умеренно устой- чивые	чувстви- тельные	устой- чивые	умеренно устой- чивые	чувстви- тельные		
Бензилпеницил- лин: при испыта- нии стафило- кокков	6	20	21—28	29	20	21—28	29	—	0,1
при испыта- нии других микроорга- низмов		11	12—21	22	10	11—16	17	—	1,5
Ампициллин: при испыта- нии стафило- кокков	10	20	21—28	29	20	21—28	29	—	0,2
при испыта- нии грамполо- жительных бактерий и энтерококков		9	10—13	14	9	10—13	14	32	8
Карбеницил- лин: при испыта- нии культур кишечной па- лочки и протей	25	14	15—18	19	15—28	19	32	16	
при испыта- нии культур синегнойной палочки	100	13	14—16	17	11	12—14	15	250	125
Метициллин	10	13	14—17	18	13	14—18	19	—	3
Оксациллин	10	19	20—23	24	15	16—19	20	—	3
Цефалексин	30	11	12—16	17				32	10
Цефалотин	30	11	12—16	17	14	15—18	19	32	10
Стрептомицин	30	13	14—16	17	16	17—19	20	15	6
Неомицин	30	13	14—17	18	12	13—16	17	—	10
Канамицин	30	14	15—18	19	14	15—18	19	25	6
Мономицин	30	13	14—17	18	13	14—17	18	—	10
Гентамицин	10	13	—	14	15	—	16	6	4
Сизомицин	10	13	—	14				6	4
Тетрациклин	30	15	16—19	20	16	17—21	22	12	2
Доксициклин	10	12	13—19	20				12	2
Эритромицин	15	14	15—18	19	17	18—21	22	8	2
Олеандомицин	15	12	13—17	18	16	17—20	21	8	2
Линкомицин	15	19	20—23	24	19	20—23	24	8	2
Левомецетин	30	14	15—18	19	15	16—18	19	16	8
Рифампицин	5	9	10—12	13	12	13—15	16	8	2
Фузидин	10	12	13—19	20				16	2
Полимиксин	300 ЕД	8	9—12	13	11	12—14	15	50 ЕД/мл	—
Ристомицин	30	9	10—11	12	9	10—11	12	—	5

ка, соответствующую рекомендациям ВОЗ (за исключением дисков с карбенициллином, которые содержат 2 концентрации — 25 мкг для определения чувствительности у штаммов *E. coli* и *Proteus* и 100 мкг для штаммов *Ps. aeruginosa*). На одну чашку следует помещать 6—10 дисков на равном расстоянии друг от друга и на расстоянии 2 см от края чашки. Чашки инкубируют при 37°C в течение 18 ч в перевернутом вверх дном положении. Учет результатов производят, измеряя с помощью линейки диаметры зоны задержки роста микробов вокруг дисков, включая диаметр диска.

Метод определения чувствительности с помощью дисков является качественным, позволяющим разделить испытуемые культуры на чувствительные и устойчивые. Вместе с тем установлена корреляционная зависимость между размерами зон задержки роста микробов и значениями МПК антибиотика, что позволяет оценить количественно степень чувствительности изучаемого штамма (табл. 75).

7.5.2. Метод разведений в питательных средах

Количественный метод определения чувствительности к антибиотикам позволяет установить минимальную подавляющую концентрацию препаратов. Имеются две модификации метода: разведение в плотных и жидких питательных средах.

Из стандарта антибиотиков готовят основной раствор.

Для этого навеску препарата в 5—10 мг растворяют в дистиллированной воде или соответствующем растворителе так, чтобы в 1 мл содержалось 1000 мкг препарата. Затем из основного раствора готовят серию разведений антибиотика в питательных средах.

Метод разведений в плотной питательной среде. Плотную питательную среду (среды для определения чувствительности бактерий к антибиотикам) разливают во флаконы по 100 мл при определении чувствительности одновременно у 100 культур. При меньшем количестве испытуемых культур можно использовать меньшие объемы питательной среды. В каждый флакон вносят 1,5—2 мл бульона, содержащего такое количество антибиотика, чтобы в 1 мл среды создавалась заданная концентрация препарата (например, в 100 мл среды вносят 10 000 мкг антибиотика в объеме 1,5—2 мл, тогда в 1 мл среды будет содержаться 100 мкг препарата). Тщательно перемешивают и разливают в чашки Петри примерно по 20 мл. На поверхность подсушенного агара с помощью штампа-репликатора наносят испытуемые культуры. Используют 18-часовые бульонные культуры или взвесь с 18-часовой агаровой культуры,

по мутности соответствующей стандарту № 10 ГКИ им. Л. А. Тарасевича. Можно разделить чашку на сектора и посев культур производить штрихом.

Чашка с питательной средой, не содержащая антибиотика, является контролем роста культур.

Чашки с посевом инкубируют при 37 °С 18—24 ч. Диапазон разведения антибиотиков зависит от установленных критериев чувствительности для испытуемого вида микроорганизмов.

При учете результатов отмечают наименьшую концентрацию антибиотика, задерживающую рост испытуемой культуры (МПК).

Метод двукратных разведений в жидкой питательной среде. Готовят серию двукратных разведений антибиотика в мясо-пептонном бульоне или бульоне, приготовленном на переваре Хоттингера, который разливают в 10 пробирок по 2 мл. В первую пробирку вносят 2 мл раствора антибиотика определенной концентрации, тщательно перемешивают и 2 мл из этой пробирки переносят в следующую и так далее до предпоследней пробирки, из которой 2 мл удаляют. Затем во все 10 пробирок вносят по 0,2 мл суточной бульонной культуры или взвеси, содержащей 10^5 — 10^6 микробных тел в 1 мл, приготовленной путем сдвига бульоном из 18-часовой агаровой суточной культуры. Последняя пробирка не содержит антибиотика и является контролем роста культуры. Пробирки инкубируют при 37 °С в течение 18—24 ч. При учете результатов отмечают последнюю пробирку, в которой наблюдается полная задержка роста микробов.

Концентрация антибиотика в 1 мл среды соответствует МПК по отношению к испытуемой культуре и определяет степень ее чувствительности к антибиотику.

Выбор метода определения чувствительности к антибиотикам у испытуемых культур зависит от целей исследования и возможности лаборатории.

Наиболее доступным и простым является метод диффузии в агар с применением дисков. Он широко используется в повседневной лабораторной практике. Однако результаты, получаемые этим методом, можно расценивать как качественные. Метод серийных разведений дает более точные количественные результаты, позволяющие сопоставить чувствительность изучаемой культуры, определенную лабораторным путем, с дозами препаратов, достигаемыми в организме больного.

Этот метод более трудоемок, чем метод дисков, требует большей затраты времени и посуды. Его используют в повседневной лабораторной практике при необходимости получения количественных показателей чувствительности выделенного возбудителя для разработки индивидуального режима применения препаратов больным.

Метод разведения в плотной питательной среде позволяет одновременно определять чувствительность у 25—30 штаммов микроорганизмов. Этот метод позволяет также определять

¹ См. Методические указания по определению чувствительности.— М., 1983.

чувствительность к препарату у разных вариантов микробной популяции, в то время как методом разведения в жидкой питательной среде определяют чувствительность у всей популяции в целом.

Питательные среды для определения чувствительности бактерий к антибиотикам. *Среда № 1*: бульон Хоттингера с содержанием 120—140 мг % аминного азота — 1000 мл, агар-агар — 15 г, натрия фосфат двузамещенный — 3 г, рН после стерилизации — 7,2—7,4.

Среда № 2: мясо-пептонный бульон 1:2 — 1000 мл, агар-агар — 15 г, натрия фосфат дву-

замещенный — 3 г, рН после стерилизации — 7,2—7,4.

Среда АГВ. Сухая питательная среда, в состав которой входят сухой питательный бульон, агар-агар порошковидный («Тафуинский»), крахмал растворимый, натрия фосфат двузамещенный.

Среду готовят из сухого порошка в соответствии с указанием, имеющимся на этикетке; рН после стерилизации $7,4 \pm 0,2$.

Для гемофильных микроорганизмов, не растущих на обычных питательных средах, в перечисленные выше питательные среды добавляют 5 % дефибринированной или гемолизированной крови.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Приказ* Министерства здравоохранения СССР № 1175 от 21.11.79 г. «Об унификации клинических лабораторных методов исследования».— М., 1981.—86 с.
- Приказ* Министерства здравоохранения СССР № 558 от 08.07.78 г. «Об унификации микробиологических методов исследования при туберкулезе».— М., 1978.— 72 с.
- Приказ* Министерства здравоохранения СССР № 380 от 16.04.75 г. «О состоянии и перспективах развития лабораторной клинико-диагностической службы в стране».— М., 1975.— 122 с.
- Приказ* Министерства здравоохранения СССР № 250 от 13.03.75 г. «Об унификации методов определения чувствительности микроорганизмов к химиотерапевтическим препаратам».— М., 1975.—40 с.
- Приказ* Министерства здравоохранения СССР № 960 от 15.10.74 г. «Об унификации клинических лабораторных методов исследования».— М., 1974.—313 с.
- Приказ* Министерства здравоохранения СССР № 290 от 11.04.72 г. «Об унификации клинических лабораторных методов исследования».— М., 1972.— 199 с.
- Альтгаузен А. Я.* Клиническая лабораторная диагностика.— М.: Медгиз, 1959.— 332 с.
- Баркаган З. С.* Геморрагические заболевания и синдромы.— М.: Медицина, 1980.— 336 с.
- Биохимические методы исследования в клинике* (Справочник)/Под ред. А. А. Покровского.— М.: Медицина, 1969.—652 с.
- Взятие и доставка биоматериалов для лабораторных исследований в клинико-диагностические лаборатории* (Методические рекомендации).— М., 1979.— 105 с.
- Кассирский И. А., Алексеев Г. А.* Клиническая гематология. Изд. 4-е, испр. и доп.— М.: Медицина, 1970.— 800 с.
- Кац А. М., Канторович А. С.* Руководство по приборам и оборудованию для медико-биологических исследований.— Л.: Медицина, 1976.— 255 с.
- Комаров Ф. И., Коровкин Б. Ф., Меньшиков В. В.* Биохимические исследования в клинике.— Л.: Медицина, 1976.— 383 с.
- Многотомное руководство по микробиологии, клинике и эпидемиологии инфекционных болезней*/Под ред. Н. Н. Жукова-Вережникова.— М.: Медгиз, 1962, т. 1.— 730 с.
- Руководство по гематологии*/Под ред. А. И. Воробьева, Ю. И. Лорие.— М.: Медицина, 1979.—584 с.
- Руководство по иммунологии*/Под ред. О. Е. Вязова, Ш. Х. Ходжаева.— М.: Медицина, 1973.— 391 с.
- Руководство по клиническим лабораторным исследованиям, основанное В. Е. Предтеченским*/Под ред. Е. А. Кост, Л. Г. Смирновой.— М.: Медицина, 1964.— 960 с.
- Руководство по клинической лабораторной диагностике*/Под ред. В. В. Меньшикова.— М.: Медицина, 1982.—576 с.
- Руководство по клинической лабораторной диагностике*/Под ред. М. А. Базарновой. Ч. 1—2.— Киев: Вища школа, 1981— 1982.
- Руководство по микробиологической диагностике инфекционных болезней*/Под ред. К. И. Матвеева. Изд. 2-е.— М.: Медицина, 1973.—624 с.
- Руководство по цитологической диагностике опухолей человека*/Под ред. А. С. Петровой, М. П. Птохова.— М.: Медицина, 1976.— 304 с.
- Рябов С. И., Наточин Ю. В., Бондаренко Б. Б.* Диагностика болезней почек.— Л.: Медицина, 1979.— 255 с.
- Справочник по клиническим лабораторным методам исследования*/Под ред. Е. А. Кост. Изд. 2-е.— М.: Медицина, 1975.—383 с.
- Тодоров И.* Клинические лабораторные исследования в педиатрии/Под ред. Г. Г. Газенко. Изд. 6-е.— София: Медицина и физкультура, 1968.— 1064 с.
- ГОСТ 16263-70. Государственная система обеспечения единства измерений. Метрология. Термины и определения.— М.: Издательство стандартов, 1982.— 52 с.
- ГОСТ 11.004-74. Прикладная статистика. Правила определения оценок и доверительных границ для параметров нормального распределения.— М.: Издательство стандартов, 1974.— 20 с.
- ГОСТ 8.417—81 (СТ СЭВ 1052—78). Государственная система обеспечения единства измерений. Единицы физических величин.— М.: Издательство стандартов, 1982.— 40 с.
- ГОСТ 8.505-84. Метрологическая аттестация методик выполнения измерений содержания компонентов проб веществ и материалов.— М.: Издательство стандартов, 1985.— 14 с.
- (Jawets E., Melnick J. L., Adelberg E. A.) *Джавец Э., Мельник Дж. Л., Эйдельберг Э. А.* Руководство по медицинской микробиологии: Пер. с англ.— М.: Медицина, 1982, т. 2.— 384 с.

Methods of enzymatic analysis/Ed. by H. U. Bergmeyer. 2th ed. Vol. 1—4.— New York—London: Acad. Press, 1974.

К разделу 1

Гублер Е. В., Генкин А. А. Применение непараметрических критериев статистики в медико-биологических исследованиях.— Л.: Медицина, 1973.— 141 с.

Единицы СИ в медицине: Пер. с англ./Отв. ред. В. В. Меньшиков.— М.: Медицина, 1979.— 85 с.

Лабораторная диагностика: Сб. методических материалов.— М.: СЭВ, 1984.— 45 с.

Меньшиков В. В., Делекторская Л. Н., Абрашина Е. В. Методические рекомендации по применению в клинической лабораторной диагностике наименований и обозначений единиц физических величин.— М., 1977.— 34 с.

Рокицкий П. Ф. Биологическая статистика.— Минск: Вышэйшая школа, 1973.— 319 с.

A biologist's guide to principles and techniques of practical biochemistry. Методы практической биохимии/Под ред. Б. Уильямса, К. Уилсон: Пер. с англ.— М.: Мир, 1978.— 268 с.

Barnett R. N. Clinical laboratory statistics.— Boston: Little, Browe and company, 1974.— 197 p.

Dharan M. Total quality control in the clinical laboratory.— Saint Louis: The C. V. Mosby company, 1977.— 242 p.

(Lippert H.) *Липперт Г.* Международная система единиц (СИ) в медицине: Пер. с нем. М. Н. Молоденкова.— М.: Медицина, 1980.— 208 с.

К разделу 2

Алексеев-Беркман И. А. Клиническая копрология.— Л.: Медгиз, 1954.— 312 с.

Краевский В. Я. Атлас микроскопии осадков мочи.— М.: Медицина, 1976.— 167 с.

Михайлова Н. Д. Пособие по копрологическим исследованиям.— Л.: Медгиз, 1962.— 150 с.

Фишзон-Рысс Ю. И. Современные методы исследования желудочной секреции. (Методики, нормативы, клинич. значение).— Л.: Медицина, 1972.— 247 с.

К разделу 3

Абрамов М. Г. Гематологический атлас.— М.: Медицина, 1979. - 279 с.; 1985—344 с.

Алексеев Г. А., Берлинер Г. Б. Гемоглобинурии.— М.: Медицина, 1972.— 248 с.

Алмазов В. А., Афанасьев Б. В., Зарицкий А. Ю. и др. Лейкопении.— Л.: Медицина, 1981.— 240 с.

Вылков И. Н. Патология лимфатических узлов/Пер. с болг.— София: Медицина и физкультура, 1980.— 246 с.

Идельсон Л. И. Гипохромные анемии.— М.: Медицина, 1981.— 190 с.

Морозова В. Т. Лабораторная диагностика лейкозов.— Л.: Медицина, 1977.— 152 с.

Теодорович В. П., Абдулкадыров К. М. Трепанобиопсия костного мозга при некоторых гематологических заболеваниях.— Л.: Медицина 1977.— 95 с.

(Наyhое F. G. J., Quaglinо D.) *Хейхоу Ф. Г. Дж., Кваглино Д.* Гематологическая цитохимия: Пер. с англ./Под ред. Н. С. Кисляк.— М.: Медицина, 1983.— 319 с.

К разделу 4

Балуда В. П., Баркаган З. С., Гольдберг Е. Д. и др. Лабораторные методы исследования системы гемостаза/Под ред. Е. Д. Гольдберга,— Томск, 1980,— 313 с.

Бокарев И. Н., Буторов В. Н., Логинов Л. Е. Применение хромогенных субстратов для диагностики нарушений свертывания крови и фибринолиза.— Тер. арх., 1981, № 2, с. 118—124.

Детинкина Г. Н., Дьмкина И. М., Торик Ж. Н. Предложения по унификации методов исследования системы гемостаза. Ч. 1, 2, 3.— Лаб. дело, 1984, № 3, с. 140—143; № 4, с. 225—232; № 5, с. 269—276.

Методы исследования фибринолитической системы крови/Под ред. Г. В. Андреевко.— М.: Изд-во Московск. ун-та, 1981.— 132 с.

Наследственные нарушения свертывания крови: Доклад научной группы ВОЗ: Пер. с англ.— Серия техн. докл. ВОЗ. М.: Медицина, 1975.— 60 с.

Папаян А. В., Шабалов Н. П. Геморрагические диатезы у детей: Руководство для врачей.— Л.: Медицина, 1982.— 287 с.

Bowie E. I. W., Thompson I. H., Didisheim P. et al. Mayo clinic laboratory manual of hemostasis.— Philadelphia: W. B. Saunders Company, 1971.— 186 p.

Caen J., Larrieu M. J., Samama M. L'hemostase Methodes d'exploration et diagnostic pratique.— Paris: 1975.

Haemostasia and thrombosis/Ed. by A. L. Bloom, D. P. Thomas.— Edinburgh: Churchill Livingstone, 1981.— 868 p.

Human blood coagulation, haemostasis and thrombosis/Ed. by R. Biggs, C. R. Rizza.— Oxford; Blackwell, 1976.— 600 p.

Ingram G. I. H., Brozovic M., Slater N. G. P. Bleeding disorders: Investigation and management.— Oxford: Blackwell, 1982.— 413 p.

Trombosis and bleeding disorders. Theory and methods/Ed. N. U. Bang et al. Stuttgart: Georg Thieme. 1971.— 554 p.

К разделу 5

Асатиани В. С. Ферментные методы анализа.— М.: Наука, 1969.— 740 с.

Каракашова А. В., Вичев Е. П. Микрометоды в клинической лаборатории: Пер. с болг.— София: Медицина и физкультура, 1968.— 256 с.

Clinical chemistry: Principles and technics/Ed by R. J. Henry, D. C. Cannon, J. W. Winkel-

man.— Hagerstown etc.: Harper and Row, 1974.— 1629 p.
(Moss D. W., Butterworth R. J.) *Масс Д. У., Баттерворт Р. Дж.* Энзимология и медицина: Пер. с англ.— М.: Медицина, 1978.— 287 с.
Tietz N. W. Fundamentals of clinical chemistry.— Philadelphia: W. B. Saunders Company, 1976.— 1263 p.

К разделу 6

Абелев Г. И. Принципы иммунодиагностики опухолей.— Иммунология, 1982, № 4, с. 5—12.
Зильбер Л. А. Основы иммунитета.— М.: Медгиз, 1948.— 495 с. .
Косяков П. Н. Изоантигены и изоантитела человека в норме и патологии.— М.: Медицина, 1974.— 360 с.
Людоговская Л. А., Кульберг А. Я., Кузовлева О. Б. и др. Иммунохимический анализ/ Под ред. Л. А. Зильбера.— М.: Медицина, 1968,— 300 с.
Петров Р. В. Иммунология.— М.: Медицина, 1982.— 368 с.
(Boyd W.) *Бойд У.* Основы иммунологии: Пер. с англ.— М.: Изд. иностр. лит., 1949.— 472 с.

К разделу 7

Методические указания по определению чувствительности микроорганизмов к антибиотикам методом диффузии в агар с использованием дисков.— М., 1983.— 15 с.

Методы бактериологического исследования в клинической микробиологии. Методические рекомендации.— М., 1983.— 39 с.
Навашин С. М., Фомина И. П. Рациональная антибиотикотерапия: Справочник. Изд. 4-е.— М.: Медицина, 1982.— 495 с.
Нейчев С. Клиническая микробиология. Для клиницистов и медицинских микробиологов.— София: Медицина и физкультура, 1977.— 317 с.
Покровский В. И., Фаворова Л. А., Костюкова Н. Н. Менингококковая инфекция.— М.: Медицина, 1976.— 272 с.
Проблемы клинической микробиологии в неинфекционной клинике: Тезисы докл. Всесоюзной научно-практической конференции (Винница, 1983).—М., 1983.—320 с.
Справочник по микробиологическим и вирусологическим методам исследования/Под ред. М. О. Биргера. Изд. 3-е.— М.: Медицина, 1982.— 462 с.
Татарина С. Д. Основные питательные среды, используемые в работе с энтеробактериями.— М., 1980.—28 с.
Bailey W. R. Diagnostic microbiology. 3 ed.— Saint Louis: C. V. Mosby Company, 1970.— 385 p.
McFaddin I. R. Biochemical test for identification of medical bacteria.— Baltimore: The Williams, Wilkins company, 1976.— 312 p.
(The shorter Bergey's manual of determinative bacteriology) *Краткий* определитель бактерий Берги: Пер. с англ./Под ред. Дж. Хоулта, Г. А. Заварзина.— М.: Мир, 1980.—495 с.

ПРЕДМЕТНЫЙ УКАЗАТЕЛЬ

- Абсорбциометрия атомная 28
Абсцесс легкого 94
Автодилутор «Хиратик-21» 37
Агар, способы очистки 298
Агранулоцитоз 124
Аденоматоз легких, цитограмма 94
Адреналин, определение 256
Азотистые вещества низкомолекулярные 215
Азот крови общий аминный 222
— остаточный 215
Актиномикоз легкого 94
Актиномицетов друзы в мокроте 94
— экссудате плевральном 99
Аланинаминотрансфераза 186
Алгоритмический анализ мокроты 95
Алкалоз 48
— гипокалиемический 48
Альбумин, определение 176
Альдолаза 210
Амбурже метод 62
Амеба дизентерийная 77
— непатогенная 77
а-Амилаза, определение 191; см. также *Ферменты*
Аминокислоты в моче при нарушениях обмена у детей 56—58
— крови 222
— хроматографическое разделение 222
д-Аминолевулиновая кислота 229
Аминотрасферазы, определение 186—189; см. также *Ферменты*
Амины биогенные 258
Анализаторы биохимические 45
— гематологические 45
Анализы, основные правила проведения 6
Анемия (и) Аддисона-Бирмера 116, 118, 119
- апластическая 124
- В 12-дефицитная 111, 114, 115, 116, 118, 144
- гемолитическая 108, 111, 113, 114, 116, 121
- несфероцитарная 120
- гиперхромные 116
- гипопластическая 111, 119, 144
- гипохромные 116
- железodefицитная 108, 111, 116, 118, 121
- макроцитарные 115, 116, 118
- мегалоцитарные 116, 118
— нормохромные 116
- серповидно-клеточная см. *Гемоглобинопатия*
— фолиеводефицитная 114, 115, 116, 144
Анизохромия 113
Анизоцитоз 113
Ансона и Мирского метод в модификации Черникова 89
Антиген гепатита В поверхностный 301
- антитела к нему 301
- первичного рака печени, определение 296
Антигиалуронидаза, определение в сыворотке крови 288
Антикоагулянты, характеристика активности 167
Антистрептолизин-О, определение в сыворотке крови 287
Антитела антиядерные, определение 305
- к ДНК, определение 280
- лейкоцитам 280
Апопротеид см. *Липопротеиды*
Аппарат ЭПАУ 20-50 36
Арахноидит цистицеркозный 102
Аринкина метод 141
Аскарида 81
Аспаратаминотрансфераза 186
Аспириноподобный синдром 153
Астальди принцип 127
Асцит 98
Аутокоагулограмма 162
Афибриногенемия 156
Аутокоагуляционный тест 162
Ахлоргидрия 88, 90
Ацетилхолинэстераза 212
Ацетон в моче, экспресс-анализ 52
Ацидоз 48
- гиперхлоремический 48
Ацидотет 90
Ацинетобактер род микроорганизмов 330
- биохимические свойства видов 332
Бабсона метод 186
Базофилия 125

- Базофилы 125
- Базофильная пунктация в эритроцитах 113
- Бактериурия 316
- Бактероиды, идентификация видов 334
- Балантидии 79
- Бациллы, виды 338
- Белки 174—180
- Белковые фракции 177
- осадочные пробы 179
 - электрофоретическое разделение на бумаге 178
 - пленках 177
- Белок Бенс-Джонса 50
- катионный 134
 - общий 174
 - определение 174
- Берлинской лазури реакция образования 93
- Бермана метод обнаружения личинок гельминтов 83
- Бернара—Сулъе болезнь 153
- Бернштейна метод 121
- проба 194
- Берстона метод азосочетания 129
- Бессея—Лоури—Брока метод 206
- Ветке метод 109, 121
- Биала проба 58
- Биггс—Дугласа тест см. *Тромбопластин, тест генерации*
- Билирубин 52
- в кале 68
 - методы определения 225
 - непрямой 53
 - прямой 53
- Билирубинурия 47, 53
- Биуретова реакция см. *Белок общий*
- Биуретовый метод 49
- Бластоцисты 79
- Богомолова проба унифицированная 54
- Боданского метод 206
- Бордетелла, свойства микробов 333
- Боткина—Гумпрехта тени 139
- Брандберга—Робертса—Стольниковая метод унифицированный 48
- Бранхамелла 335
- свойства биохимические 334
- Бунзена штатив 8
- Вальденстрема макроглобулинемия 50, 122, 144
- Ван ден Берга метод 225
- Ванилил-миндальная кислота 257
- Варбурга тест 216
- Вариация аналитическая 11
- допустимая, пределы 15
 - принципы определения 14
 - биологическая 14
- Вейгерта окраска эластических волокон 93
- Белька проба 58
- Вельтмана проба 180
- Вилкоксона тест 12
- Виллебранда болезнь 153, 156
- Влагалище, отделяемое, микроскопия 320
- Власоглав 81
- Возбудители гнойно-воспалительных заболеваний, дифференциация и идентификация 313, 326
- Время активированное частичное тромбопластиновое (АЧТВ) 157
- лизиса эуглобулиновых сгустков 171
 - кровотечения 151
 - протромбиновое 158, 159
 - рекальцификации 155
 - рептилазовое 161
 - свертывания крови 155
 - плазмы 159, 160, 161
 - тромбиновое 160
- Выпот, исследование микробиологическое 323
- микроскопическое 99
 - препаратов нативных 99
 - окрашенных 99
 - обнаружение гистиоцитов 100
 - детрита 99
 - друз актиномицетов 99
 - жировых капель 99
 - клеток мезотелия 100
 - опухолевых 99, 100
 - плазматических 100
 - кристаллов холестерина 99
 - лейкоцитов 99
 - нейтрофильных 99
 - лимфоцитов 99
 - макрофагов 100
 - слизи 99
 - эозинофилов 100
 - эритроцитов 99
 - определение белка по помутнению 98
 - относительной плотности 48
 - плевральный 99, 323
- Гайнеса проба 51
- Гастрин 86
- Гастротест 90
- Гейнца тельца 120
- Гейнца—Эрлиха тельца, тест на образование по Дейчи 120
- Гексозы, связанные с белком, определение 236
- Гексуриновые кислоты, определение 237
- Геллера проба 48
- Гельминтологическое исследование 79

- Гельминты 79
- обнаружение личинок методом Бермана 83
 - Харада и Мори 84
 - яиц 80
 - в перианально-ректальных соскобах 83
 - методом Красильникова 83
 - обогащения 83
 - характеристика яиц 81
- Гемагглютинации определение 282
- реакция пассивная 280
- Гематокрита показатель 115
- величины нормальные 115
 - определение микрометодом 115
 - с помощью автомата 115
 - микроцентрифуги 115
- Гематологические исследования 106
- Гематологический комплекс лабораторный (КГ-2) 40
- Гематурия 47, 59
- Гемиглобинцианидный метод 107
- Гемоглобин 107
- величины нормальные 108
 - взрослый (А) 108
 - гликозилированный, определение 238
 - определение содержания 107
 - примитивный (Р) 108
 - подтип Говера 108
 - фетальный (F) 108, 121
 - форма Александра 108
 - Фессаса и Папаспиру 108
 - формы патологические 109
 - фракции 108
- Гемоглобинометр фотоэлектрический (ГФ-Ц-04) 40
- Гемоглобинопатия 109, 114
- Гемосидерин 93
- Гемостаз, методы исследования системы 149, 151, 155, 170
- коагуляционный 155
 - методы исследования специфические 164
 - тромбоцитарно-сосудистый 151
- Гемофилия А 156
- В 156
- Гемофилус, свойства биохимические 331
- Гемоцитометр кондуктометрический (ГЦМК-3) 39
- Гиперамилаземия 192
- Гиперамилазурия 192
- Гипераминоацидурия 56
- Гиперпротеинемия 175
- Гипоакцелеринемия 156
- Гипопротеинемия 175
- Гипопротромбинемия 156
- Гипофибриногенемия 156
- Гистамин, определение 258, 259
- Гистаминовый тест максимальный 86
- субмаксимальный 86
- Гистиоцитоз Х 148
- Гланцманна тромбастения 153
- Гликоген 133
- Гликозаминогликаны 234
- обнаружение в моче 58
- Гликопротеиды 234
- а-Глицерофосфатдегидрогеназа 132
- Ас-глобулин см. *Факторы свертывания крови, характеристика*
- у-Глутамилтрансфераза, определение 192; см. также *Ферменты*
- Глюкоза, методы определения в крови 231 — 234
- моче 50, 231, 232
- Глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа, определение 194; см также *Ферменты*
- Глюкозурия 51
- «Глюкотест» 50
- Гольдмана метод см. *Липиды*
- Гомогентизиновая кислота, обнаружение в моче 58
- Гомоцистин, обнаружение в моче 56
- Гомоцистинурия 57
- Гормоны 250–260
- экстракция 250
- Горяева камера 61
- Готфрида проба 52
- Гросса проба 179
- Грэхема—Кнолля метод 129
- Гурлера болезнь 238
- Двойных антител метод 33
- Двуустка китайская 82
- кошачья 82
 - ланцетовидная 82
 - легочная 82
 - печеночная 82
- Дебит НС1 88
- Дебит-час, определение 88
- Дебре—де Тони—Фанкони синдром 56
- Дегидрогеназы 132
- Денситометр ДМ-1 36
- Денсона метод 165
- Дефицит глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы 120, 122
- факторов I—XIII 156, 157
 - НС1 88
- Дилутор 8
- Диплобациллы 97

- Дисбактериоз кишечника 322
- Дискэлектрофорез в полиакриламидном геле см. *Липопротеиды, определение фракций*
- Дисфибриногенемия 156
- Дитриха пробки 94
- Дозатор(ы) автоматический 8
- поршневой АХ-3-5 36
 - медицинский А-2 37
 - полуавтоматические пипеточные П] 36
- Дозирующее устройство DS 201E 38
- Дубина—Джонсона синдром 227
- Дьюка метод модифицированный 151
- Единицы СИ основные 9
- производные 9
- Ендрассика—Клегорна—Грофа метод 226
- Ендрассика—Грофа метод 225
- Железо, определение в моче 270
- сыворотке 267, 268
- Желудок, зондирование зондом толстым 85
- тонким 85
 - по Лепорскому 85
- исследование ферментообразующей функции 89
- Желудочная секреция, исследование 85
- методами беззондовыми 90
 - стимуляция отваром из сухой капусты 85
- Желудочно-кишечный тракт, микрофлора 321
- Желудочный сок, запах 86
- кислотность 86
 - нормальные величины 87
 - общая 87
 - определение методом Михаэлиса 86
 - с тремя индикаторами 87
 - Тепффера 87 - микрохимическим способом 87
 - свободная NCL 87
 - способы выражения 87
 - определение молочной кислоты 88
 - протеолитической активности 89
 - примеси 86
 - содержание пепсина 89
 - цвет 86
- Желчные пигменты 52
- Желчный тест см. *Пневмококки, типы*
- Желчь, исследование микробиологическое 322
- Жирные кислоты неэтерифицированные, колориметрическое определение 248
- Жолли тельца 114
- Зингера метод определения гемоглобина 109
- Златкис—Зака метод определения холестерина 242, 243
- Изоферменты сыворотки крови 184, 197, 198, 205
- методы определения 184
- Илька метод определения холестерина общего 242
- Иммунитет гуморальный, исследование факторов 278
- клеточный, исследование факторов 306
- Иммунодиффузионный метод 294
- источники ошибок 303
- Иммунодиффузия в агаровом геле двумерная для определения а-фетопротеина 295
- одномерная для определения иммуноглобулинов 292
 - встречная по Оухтерлони 31
 - радиальная 294
 - по Манчини 31
- Иммунные глобулины 292
- в биологических жидкостях 295
 - определение в испытуемых препаратах 293
 - содержание в стандартных препаратах 294
 - сыворотке здоровых лиц 295
 - комплексы циркулирующие, определение в сыворотке 292
- Иммунного лизиса реакция 284
- Иммунологические методы исследования 277
- Иммунофлюоресцентный метод 305
- Иммунохимические методы 30
- сравнительная характеристика 35
- Иммуноэлектрофорез встречный 301
- классический по Грабарю, Вильямсу 31
- Иммуноэлектрофоретический анализ 297
- подготовка агаровой пластины 298
- Индикан, обнаружение в моче 58, 224
- Индикаторная бумага 49
- Йерсинии, дифференциация внутривидовая 330
- Кал, взятие материала 66
- запах 67
 - исследование гельминтологическое 79
 - макроскопическое 67
 - микроскопическое 70
 - химическое 68 - клетки злокачественных опухолей 74
 - консистенция 67
 - кристаллические образования 74
 - лейкоциты 73
 - макрофаги 74
 - обнаружение простейших 75
 - примеси видимые 67
 - реакция 67
 - на кровь 68

- содержание аминокислот 69
 - аммиака 69
- детрита 70
- жира нейтрального 72
- жирных кислот 72
- клетчатки растительной 71
- кишечного эпителия 73
- крахмала 71
- мыл 72
 - мышечных волокон 70
- слизи 73
 - растворимой 70
 - соединительной ткани 71
- форма 67
- цвет 67
- эритроциты 74
- Каковского—Аддиса метод 61
- Калий, определение в моче 263
 - плазме 261
- Кальций, определение в моче 59
 - плазме 265
- Капилляры, резистентность 151
- Капрала метод 95
- Кардиобактерия 333
- Карта контроля качества исследования 16
- Като метод 80
- Кваглино, Хейхо модификация см. *Нахласа метод определения дегидрогеназ*
- Кебота кольца 114
- Кейя тест в модификации Рысса и Лужис см. *Гистаминовый тест максимальный*
- Кеплоу метод азосочетания 128
- Кетокислоты, обнаружение в моче 57, 58
- Кетоновые тела в моче, обнаружение 53
- Кетонурия 52
- 17-Кетостероиды, определение 250
- Кефалин-холестериновая проба 179
- Кинга—Армстронга метод определения фосфатаз 206
- Кишечная микрофлора, норма 322
- Клебсиелла 330
- Клетки атипичные в пунктате костного мозга 144
 - Березовского—Штернберга 126, 147
 - бластные 126, 138
 - волчаночные 126
 - жирно перерожденные в мокроте 93
 - злокачественных опухолей в кале 74
 - мокроте 94
 - кишечного эпителия 73
 - перстневидные 99
 - Пирогова—Лангханса 147
 - плазматические 126
 - почечного эпителия 60
 - пылевые в мокроте 93
 - ретикулярные 144
 - сердечных пороков 93
 - Гарта 126
 - тучные в миелограмме 144
 - Штернгеймера—Мальбина 59
- Клостридии 341
- Кокки грамположительные факультативно-анаэробные 335
- Колориметры, техническая характеристика 43
- Кольцепреципитация в капиллярах см. *C-реактивный белок*
- Комплемента активность гемолитическая, определение 284
- Контроль качества исследований 15
 - интерпретация результатов 16
 - межлабораторный 19
 - правильности исследований 17
- Копрологическое исследование 66
- Копропорфирин 230
- Коринебактерии 340
- Костный мозг 140
 - подсчет миелограммы 141
 - пункция 140
 - трепанобиопсия 144
- 145
- Красильникова метод обнаружения яиц гельминтов 83
- Креатинин, методы определения 220
- Креатинкиназа, определение активности 195; см. также *Ферменты*
- Креаторея 71
- Кребса цикл 58
- Кривоголовка двенадцатиперстная 81
- Кристаллы в кале 74
 - моче 63—65
- Кристмаса фактор 156
- Кровь, взятие на анализ 106, 149
 - время кровотечения 151
 - свертывания 155
 - исследование микробиологическое 314
 - контроль качества исследований 22
 - окраска мазков 112
 - приготовление мазков 111
 - приспособление для фиксации и окраски мазков (ФОМК-1) 39
- Ксантохромия ликвора 100
 - геморрагическая 100
 - застойная 100
- Кулленкампа метод определения кислой сx-нафтилацетат-эстеразы 131
- Кумбса реакция 278
 - непрямая 279
 - прямая 278

- Кункеля проба см. *Цинк-сульфатная проба*
- Купрометрический метод определения глюкозы 233
- Куршмана спирали 92, 93
- Лаборанты, контроль качества работы 23
- Лабораторная посуда, обработка 7, 150
- Лабораторное оборудование, виды 36
- Лактатдегидрогеназа, изоферменты 197; см. также *Ферменты*
- методы определения 198
 - электрофоретическое разделение 199
- Лактоза, обнаружение в моче 58
- Ламберта-Бера закон поглощения света окрашенными растворами 26
- Ланге проба унифицированная 51
- реакция 104
- Латекс тест в модификации Сперанского см. *Ревматоидный фактор*
- Лейкемоидные реакции 125
- Лейкозы, изменение крови 138
- острые, картина крови 138
 - пунктат лимфатического узла 147
 - формы алейкемические 138
 - хронические, картина крови 138
- Лейкокочендрат 125
- величины нормальные 126
 - метод с гепарином 126
 - трилоном Б 126
- Лейкопения 124
- Лейкоцитарная формула 124
- величины нормальные 125
 - при лейкозах 139
- Лейкоцитоз 123
- Лейкоцитурия 59
- скрытая, определение экспресс-методом 62
- Лейкоциты 122
- активные в моче 59
 - исследование цитохимическое 127
 - миграции реакция 309
 - торможение 309
 - подсчет 123
- Лентец малый 81
- тунгусский 82
 - узкий 82
 - широкий 81
- Лепорского метод зондирования желудка 85
- Леттерера—Зиве болезнь 148
- Леффлера метод определения нафтол-А5-ацетат-эстеразы 131
- Либермана—Бурхарда реакция на холестерин 241
- Лигандин 225
- Ликвор, гиперсекреция 103
- дифференциация клеточных элементов в окрашенных препаратах 101
 - счетной камере 101
 - исследование микроскопическое 101
 - химическое 103
 - клетки опухолевые 103
 - плазматические 102
 - эпителиальные 102
 - коллоидная реакция с хлорным золотом 104
 - кристаллы 103
 - лимфоциты 102
 - липофаги 102
 - макрофаги 102
 - морфология клеточных элементов 102
 - мутность 100
 - нейтрофилы 102
 - определение активности ферментов 105
 - белка 103
 - глобулинов высаливанием 103
 - глюкозы 105
 - осаждением карболовой кислотой 104
 - крови количественное 105
 - хлоридов 105
 - электролитов 105
 - плеоцитоз 101
 - лимфоидный 102
 - подсчет форменных элементов 101
 - тканевые моноциты 102
 - фибринозная пленка 101
 - цвет 100
 - цитоз 101
 - элементы эхинококка 103
 - эозинофилы 102
 - эритроциты 101
- Лимфаденограмма, исследование 146
- при неспецифических лимфаденитах 146
- Лимфатические узлы, биопсия 148
- исследование гистологическое 148
 - цитологическое 145
 - пунктат при острых лейкозах 147
 - цитограмма при злокачественных заболеланиях 147
- Лимфобласты 143
- Лимфогранулематоз 147
- Лимфома гистиоцитарная 147
- Лимфосаркома лимфобластная 147
- лимфоцитарная 147
 - пролимфобластная 147
- Лимфоцитоз 125
- Лимфоциты 125
- В, определение методом розеткообразования 308

- Т, определение активных 308
 - методом розеткообразования 306
 - с аллогенными и аутологичными эритроцитами 308
 - эритроцитами *барана* 307
 - теofilинчувствительности 308
- Липаза, определение 201; см. также *Ферменты*
- Липиды 240—249
 - плазмы крови см. *Липопротеиды*
 - окраска судаком III 135
- Липопротеиды 240
 - определение фракций 248
- Листерии, свойства биохимические 341
- Любальная пункция 100
- Лямблена метод модифицированный см. *Гистаминовый тест судмаксимальный*
- Лямблии 78

- Магний, определение в плазме 266
- Мазона номограмма для вычисления индексов эритроцитов 117
- Маллоя—Евелина метод 225
- Мальтоза, обнаружение в моче 58
- Мегакариобласты 143
- Мегакариоциты базофильные 143
 - оксифильные 143
 - подсчет в пунктате костного мозга 141
 - полихроматофильные 143
- Мегалобласты 113
 - базофильные 145
 - оксифильные 145
 - полихроматофильные 145
- Международная система единиц 9
- Меркуриметрический метод см. *Хлор в биологических жидкостях*
- Метамиелоциты 125, 142
- Метод(ы), воспроизводимость 11
 - диффузии в агар с использованием бумажных дисков 341
 - конкурентного связывания 31
 - корреляционный для оценки статистической связи 12
 - оценка аналитической надежности 10
 - правильности 11
 - проб параллельных 18
 - повторных 18
 - разведений в питательных средах 343
 - регрессии для оценки статистической связи 13
 - референтный 12
 - с бромфеноловым синим по М. Г. Шубичу 134
 - специфичность 13
 - сравнения 12
 - средних нормальных величин 19
 - стандартизация 6
 - чувствительность 13
 - унификация 5
 - эталонный см. *Метод референтный*
- Миелобласты 142
- Миелограмма 144
- Миелокариоциты, подсчет в пунктате костного мозга 140
- Миелопероксидаза см. *Пероксидаза*
- Миелоциты 125, 142
- Микобактерии туберкулеза 97, 101
- Микробиологическое исследование, взятие материала 312
 - выпотов 323
 - крови 314
 - материала патологоанатомического 325
 - полученного на операции 325
 - микроскопия мазка 313
 - мочи 316
 - отделяемого глаз 324
 - дыхательных путей 317
 - женских половых органов 320
 - из носа и зева 319
 - ран 322
 - ушей 324
 - содержимого желудка и кишечника 321
 - цереброспинальной жидкости 319
- Микроорганизмы, культивирование 313
 - определение чувствительности к антибактериальным препаратам 341
- Микросфероцитоз 114, 115
 - наследственный 115, 118
- Михаэлиса метод определения кислотности желудочного сока 86
- Мокрота, анализ алгоритмический 95
 - взятие для исследования 91
 - гемосидерин 93
 - гнойная 91
 - деление на слои 91
 - друзы актиномицета 94
 - запаха 91
 - исследование бактериоскопическое 97
 - макроскопическое 91
 - микроскопическое 92
 - химическое 92
 - клетки жирно перерожденные 93
 - злокачественных опухолей 94
 - пылевые 93
 - консистенция 91
 - кристаллы гематоидина 94
 - холестерина 94
 - Шарко—Лейдена 93

- кровянистая 91
- миелиновые образования 94
- определение белка 92
 - билирубина 92
- пробки Дитриха 94
- реакция 91
- серозная 91
- слизистая 91
- слизисто-гнойная 91
- спирали Куршмана 93
- цвет 91
- экспресс-исследование 96
- эластические волокна 93
- эхинококка элементы 94
- Молони метод определения нафтол-AS-D-хлор-ацетат-эстеразы 131
- Молочная кислота, определение 240
- Монобласты 142
- Моноцитоз 125
- Моноциты 125
- Моракселла 330
 - биохимические свойства видов 332
- Мотульского—Кемпбеля метод 120
- Моча, взятие для микроскопии 61
 - исследование, выявляющее дефекты обмена аминокислот 56
 - микробиологическое 316
 - химическое 48
 - контроль качества исследований 21
 - кристаллические образования в осадке 63
 - микроскопия осадка 59
 - обнаружение белка 56
 - гликозаминогликанов 58
 - гомогентизиновой кислоты 58
 - гомоцистина 56
 - индикана 58
 - кальция 59
 - кетокислот 57
 - лактозы 58
 - мальтозы 58
 - пентоз 58
 - пролина 57
 - фруктозы 58
 - цистина 56
 - осадок неорганизованный 59, 63
 - организованный 59
 - рН 47
 - плотность относительная 48
 - приготовление контроля для токсикологического исследования 22
 - проба с сульфосалициловой кислотой 48
 - прозрачность 47
 - реакция 47
 - содержание ацетона 52
- белка 48
- глюкозы 50
- кетоновых тел 51
- форменных элементов 61, 62
 - цвет 47
- Мочевая кислота, определение 221
- Мочевина, определение 215
- Мочекаменная болезнь 60
- Мукополисахаридозы 238
- Нарциссова модифицированный метод см. *Грэхема—Кнолля метод*
- Наследственные нарушения обмена веществ 56
- Натрий, определение в моче 263
 - плазме 261
- а-Нафтилацетат-эстераза кислая 131
- а-Нафтилацетат-эстераза неспецифическая 130
- Нафтол-А8-ацетат-эстераза 131
- Нафтол-AS-D-хлорацетат-эстераза 131
- Нахласа метод определения дегидрогеназ 132
- Нейбауэра проба бензальдегидная унифицированная 54
- Нейсерии, видовые особенности 334
 - свойства биохимические 34
- Нейтропения 125
- Нейтрофилез 125
- Нейтрофилы палочкоядерные 125
 - сегментоядерные 125
- Некатор 81
- Нематоды см. *Черви круглые*
- Нечипоренко метод 62
- Нитритный тест см. *Моча, исследование микробиологическое*
- Новообразования мочевыводящих путей 60
- Нокардии, свойства биологические 339
- Нонне—Апельта реакция 103
- Норадреналин, определение 256
- Нормобласты 113, 121
 - базофильные 141
 - оксифильные 141
 - полихроматофильные 141
- Нормохромия 113
- Обермайера — Поппера метод определения билирубина в мокроте 92
 - проба см. *Индикан, методы определения*
- Оврена метод 167
- Окраска мазков крови автоматическая 112
 - по Нохту 112
 - Паппенгейму 112
 - Романовскому — Гимзе 112
- по Алексееву 102
 - Возной 102
 - Гехту 73

- Граму 97
- Розиной 101
- Цилю — Нильсену 97
- 5-Оксииндолилуксусная кислота, определение в моче 260
- 11-Оксикортикостероиды 255
- 17-Оксикортикостероиды, определение в моче 253
 - плазме крови 254
- Операционный и патологоанатомический материал, исследование микробиологическое 325
- Оптохиновый тест 336
- Опухоли злокачественные, обнаружение клеток в мокроте 94
 - мезентериальных лимфатических узлов 73
 - мозга 102, 105
 - спинного 103
- Острица 81
- Палочки грамотрицательные анаэробные 333, 341
 - аэробные и факультативно-анаэробные кокки 334
 - факультативно-анаэробные средних размеров 326
 - и коккобациллы 327
- Палочки грамположительные аэробные и факультативно-анаэробные 338
- Панди реакция 103, 104
- Панченкова микрометод определения СОЭ 122
- Парагеомофилия 156
- Паразитарные заболевания 100
- Парапротеинемии симптоматические 122
- Парапротеины 297
- Парка метод в модификации Бажоры 135
- Певзнера диета 66
- Пентагастрин 86
- Пентозы, обнаружение в моче 58
- Пепсин, концентрация в желудочном соке 89
- Пептиды 222
- Пептококки, дифференциация видов 338
- Пептострептококки, дифференциация видов 338
- Пероксидаза 129
- Пигаревского метод модифицированный 134
- Пигменты 224
- Плазмобласты 143
- Планшет для иммунологических реакций 39
- Пневмококки, типы 336
- Пойкилоцитоз 113
- Полифекалия 67
- Поляриметрический метод определения глюкозы в моче 51
- Поппера метод см. *Креатинин, методы определения*
- Порфирины, определение 228
- Порфобилиноген 55
 - методы определения 228
- Прайс-Джонса кривая 114
- Преципитации (я) реакции 291
 - в геле 31
- Проакцелерин см. *Факторы свертывания крови, характеристика*
- Проба (ы) бензидиновая 68
 - гваяковая 68
 - манжеточная 151
 - пирамидоновая 68
 - случайный метод 18
 - смешанный метод 18
- Проконвертин см. *Факторы свертывания крови, характеристика*
- Пролимфоциты 143
- Пролин, обнаружение в моче 57
- Пролинурия 57
- Промегакариоциты 143
- Промегалобласты 145
- Промиелоциты 125, 142
- Промоноциты 142
- Пронормобласты 141
- Проплазмочиты 143
- Простейшие, класс жгутиковых 78
 - корненожек 76
 - ресничных 79
 - споровиков 79
- методы определения 75
 - морфологические особенности 77
 - определение в мазке нативном 75
 - с раствором Люголя 75
 - методом с применением консервантов 76
 - формалин-эфирного обогащения 76
- Протаминсульфатный тест 169
- Протеинурия, формы 50
- Протей, дифференциация внутриродовая 330
- Протеогликаны 235
- Протромбиновое время, методы определения 158, 159
- Псевдомонас, дифференциальные признаки видов 326
- Псевдохолинэстераза, определение 212; см. также *Ферменты*
- Пула хранения болезнь 153
- Разброс результатов см. *Вариация аналитическая*
- Райтмана-Френкеля метод 186, 187, 189
- Рак легкого альвеолярно-клеточный, цитограмма 94
 - железистый, цитограмма 94
 - мелкоклеточный, цитограмма 94

- плоскоклеточный, цитограмма 94
- полиморфно-клеточный, цитограмма 95
- Раневое отделяемое, исследование микробиологическое 322
- Растворы контрольные 22
 - отмеривание 8
- С-реактивный белок, определение 291
- Реактивы, приготовление 7
 - проверка чистоты 7
- Ревматоидный фактор, определение 282
- Результаты, допустимые погрешности 13
 - достоверность различий 12
 - статистическая обработка 12
- Резус-антитела, определение в грудном молоке 280
- Резус-фактор, определение 279
- Релея теория светорассеивания 34
- Рептилазовое время, метод определения 161
- Ретикулосаркома см. *Лимфома гистиоцит арная*
- Ретикулоциты 118, 119
 - подсчет 118
- Ретракция сгустка крови 154
 - метод качественный 154
 - количественный 154
- Ривальта проба 99
- Розенталя болезнь 157
 - фактор 157
- Розеткообразования метод 306
- Розина проба унифицированная 52
- Ротеры проба определения кетоновых тел в моче 52
- Руденса — Буйкиса модификация см. *Берстона метод азосочетания*
- Румпеля — Леде — Кончаловского манжеточная проба 151
- Сали проба десмоидная 90
- Сатурационный анализ см. *Метод конкурентного связывания*
- Светорассеивания исследование 34
- Севела — Товарека метод 199, 203
- Селиванова проба см. *Фруктоза, обнаружение в моче*
- Серологические методы исследования 314; см. также *Микробиологические исследования*
- Серомукоиды 234, 236
- Серотонин, определение 258
- Сиаловые кислоты, определение 235
- Сидеробласты 121
- Сидероциты 121
- Синовиальная жидкость, исследование 323
- Скрининг-тесты у детей 56
- Сомоги-Нельсона метод 233
- Сорбитолдегидрогеназа, определение 203; см. также *Ферменты*
- Сосальщики 82
- Соулсби метод см. *Копропорфирин*
- СОЭ, нормальные величины 122
 - определение 122
- Спектрофотометрия инфракрасная липидов 247
- Спектрофотометры 27
 - техническая характеристика 41
- Спинномозговая жидкость см. *Ликвор*
- Среды питательные для культивирования анаэробов 315
 - определения чувствительности бактерий к антибиотикам 343
- Статистика, критерии непараметрические в определении достоверности результатов 12
- Стафилококки 97
 - видовые особенности 335
 - свойства биологические 335
- Стеаторея 73
- Стеркобилин 68
 - определение 68
- Стеркобилиноген, определение 68
- Стрептококки 97
 - гемолитические 336
 - группы 336
 - зеленящие 336
 - свойства дифференциальные 337
- Стьюдента тест 12
- Стюарта метод в модификации Нагоева 135
 - Прауэра болезнь 156, 166
 - фактор 156, 165
 - определение одностадийное см. *Денсона метод*
- Сукцинатдегидрогеназа, активность 132
- Сулемова проба 180
- Сулковича проба 59
- Сулье — Ларье метод 164
- Таката проба 179
- Талассемия 109, 113, 115, 116, 118, 120, 122
- Тениаринхоз 83
- Тепфера метод определения кислотности желудочного сока 87
- Тест восстановления нитросинего тетразолия (НСТ-тест) 135
 - преднизолоновый 62
- Тимоловая проба 179
- Товарницкого — Волуйской метод 211
- Томинкс 81
- Тонгази метод 186
- Транссудаты 98
 - исследование микроскопическое 99
 - концентрация белка 98
- Трематоды см. *Сосальщики*

- Триглицериды, определение 246
- Трихомонады влагалищные 78
— кишечные 78
- Трихостронгилиды 81
- Тромбиновое время, метод определения 160
- Тромбопластин(ы), тест генерации 162
— тканевые см. *Факторы свертывания крови, характеристика*
- Тромбоциты, агрегация 152
— адгезивность 152
— врожденное нарушение функций 153
— исследование функций 137
— коагуляционная активность 154
— подсчет в автоматическом счетчике 137
— камере 136
— мазках крови (по Фолио) 137
— ретенция см. *Тромбоциты, адгезивность*
- Тромбоэластография 161
- ТТХ-тест см. *Моча, исследование микробиологическое*
- Туберкулезная гранулема 147
- Туголукова метод определения концентрации пепсина 89
— таблица 89
- Углеводы и родственные соединения 230—240
- Ураты 47, 63
- Уридиндифосфоглюкурозилтрансфераза 225
- Уробилиноген, определение 54
- Уробилиноидурия 55
- Уробилиноиды 53
- Уроканиназа, определение активности 204;
см. также *Ферменты*
- Уропепсин 89, 90
- Уропорфирин 230
- Фагоцитарная активность нейтрофилов периферической крови 310
- Фагоцитарный (ое) индекс 311
— число 311
- Фактор(ы) свертывания крови, определение 164—170
— формы врожденной недостаточности 156, 157
— характеристика 156
— фибринстабилизирующий 157
- LE-феномен 126
- Ферментопатии врожденные 58
— наследственные 120
- Ферменты 181—212
— активность 182
— методы определения 183, 185
— группы 181
— формы множественные 184
- а-Фетопроtein 295
- Фибрина продукты деградации, обнаружение в крови 172
- Фибриноген, определение в плазме 168, 169
- Фибринолитическая система крови, методы исследования 170; см. также *Гемостаз*
- Флоранса проба унифицированная 53
- Флотации метод по Поттенджеру 97
- Флюорометрия 28
— поляризационная 35
- Флюорометры, техническая характеристика 44
- Фосфатаза кислая 129, 209
— изоферменты 209
— методы определения 209
— щелочная 128, 205
— изоферменты 205
— методы определения 206
— электрофоретическое разделение 208
- Фосфонуклеотиды, определение 273
- Фосфор и фосфорсодержащие вещества 270
— кислоторастворимый 270
— липидный, метод определения 272
— неорганический, метод определения 271
- Фотометрия 25
— пламенная 28, 261
- Фотометры 27
— пламенные, техническая характеристика 44
- Фридлиндера палочка 97
- Фридмана реакция 104
- Фруктоза, обнаружение в моче 58
- Фруктозо-1,6-дифосфатальдолаза, определение 210; см. также *Ферменты*
- Фука — Розенталя камера 61, 101
- Фуше проба унифицированная 52
- Хагедорна — Йенсена метод 231, 232
- Хагемана болезнь 157
— фактор 157
- Хантера болезнь 238
- Харада и Мори метод обнаружения личинок гельминтов 84
- Харгривеса — Циммера метод исследования LE-клеток 127
- Хенда — Шюллера — Крисчена болезнь 148
- Хлор в биологических жидкостях, определение 275
- Хлористоводородная кислота, свободная 87
— связанная 87
- Холестерин 241
— а-липопротеидов 244
— методы определения 241
— общий, реакции с укусным ангидридом 242
— содержание в крови 244
— свободный и эфирносвязанный 243

- эфиры, определение 243
- Холинэстераза истинная см. *Ацетилхолинэстераза*
- Хроматография тонкослойная 257
- Цветовой показатель 115
 - величины нормальные 116
- Целлоскоп 114
- Центрифуги 9
- Цепень вооруженный 81
 - карликовый 81
 - крысиный 81
 - невооруженный 81
 - тыквовидный 81
- Цестоды см. *Черви ленточные*
- Цилиндрурия 61
- Цилиндры восковидные 61
 - гиалиновые 60
 - зернистые 61
 - лейкоцитарные 61
 - пигментные 61
 - эпителиальные 61
 - эритроцитарные 61
- Цинк-сульфатная проба 179
- Цинкхама — Конли метод в модификации Новоселовой см. *LE-феномен*
- Цистин, обнаружение в моче 56
- Цистинурия 57
- Цистицеркоз 80, 102
- Цисты амёб 77
 - лямблий 78
- Цитологическая диагностика опухолей легких 94
- Цитохимические исследования лейкоцитов 127
 - эритроцитов 121
- Черви круглые 81
 - ленточные 81
- Чувствительность микроорганизмов к антибактериальным препаратам, методы определения 341, 343
- Шабадаша метод 133
- Шарко — Лейдена кристаллы в кале 74
 - мокроте 93
- Шафрана модифицированный метод см. *Грэхема — Кнолля метод*
- Шистосома Мансона 82
 - японская 82
- Шихобаловой нанофитес 82
- Шмидта диета 66
 - проба 68
- Эберлейна метод определения общего билирубина и его фракций 227
- Экспресс-анализ ацетона в моче 52
 - мокроты 96
 - тесты для определения билирубина 53
 - скрытой крови в кале 68
- Экссудаты геморрагические 98
 - гнойные 98
 - исследование микроскопическое 99
 - концентрация белка 98
 - серозные 98
 - хилезные 98
 - хилусоподобные 98
 - холестериновые 98
- Эластические волокна в мокроте 93
 - обызвествленные 93
 - окраска резорцин-фуксином Вейгерта 93
- Электрокоагулография 161
- Электрофорез ракетный 31
- ЭЛИСА метод 33
- Эмпиема 323
- Энтеробактерии, дифференциация родов 328
 - классификация 327
- Энтеробиоз 83
- Энтерококки, дифференциальная диагностика 337
- Эозинофилия 125
- Эозинофильная гранулема 148
- Эозинофилы 125
- Эритремия 115, 122, 128, 138, 139
- Эритробласты 113, 141
- Эритрокарициты костного мозга 141
- Эритрохромия ликвора 100
- Эритроцитов 111
 - вторичный 11, 115, 122
 - абсолютный 111
 - относительный 111
- Эритроцитометрия 114
- Эритроцитурия 59
- Эритроциты, активность ферментов 120
 - базофильная пунктация 113
 - величины нормальные 111
 - гемоглобина средняя концентрация 116
 - гемолиз 120
 - гипохромия 113
 - диаметр средний 114, 118
 - величины нормальные 114, 118
 - исследование цитохимическое 121
 - мишеневидные 113
 - морфология 111
 - резистентность 119
 - скорость оседания 122
 - объем средний 117
 - величины нормальные 117

- подсчет автоматический ПО
 - в счетной камере 110
- полихроматофилия 113
- с остатками ядер 114
 - ядром 113
- формы серповидной 114
 - шаровидной 114
- Эрлиха тетрада 93
- Эстераза(ы) кислая а-нафтилацетат 131
 - а-нафтилацетат 130
 - нафтол-А5-ацетат 131
 - нафтол-А5-0-хлорацетат 131
- неспецифические 130
- Этаноловый тест 169
- Эхинококк легкого 94
 - элементы в мокроте 94
- Эхинококкоз 103
- Юдена график 21
 - метод 20
- Яйца гельминтов, ошибки при определении 84
- Якоби линия 100
- Яффе цветная реакция см. *Креатинин*

ОГЛАВЛЕНИЕ

Предисловие	3
-------------	---

Раздел I

ОСНОВЫ ЛАБОРАТОРНОЙ АНАЛИТИКИ

1.1. Принципы унификации и стандартизации клинических лабораторных методов исследования. <i>В. В. Меньшиков, Л. Н. Делекторская.</i>	5
1.2. Основные правила проведения лабораторных анализов. <i>И. С. Балаховский.</i>	6
1.2.1. Подготовка рабочего места и реактивов	6
1.2.2. Мытье посуды	7
1.2.3. Приготовление реактивов и проверка их чистоты	7
1.2.4. Отмеривание растворов, взвешивание, центрифугирование	8
1.3. Единицы СИ в клинической лабораторной диагностике. <i>В. В. Меньшиков, Л. Н. Делекторская.</i>	9
1.4. Оценка аналитической надежности клинических лабораторных методов исследования. <i>В. В. Меньшиков, Л. Н. Делекторская.</i>	10
4.1. Воспроизводимость	11
4.2. Правильность	11
4.3. Статистическая оценка правильности результатов	12
4.4. Специфичность	13
4.5. Чувствительность	13
4.6. Принципы определения допустимых погрешностей результатов лабораторных исследований	13
1.5. Контроль качества клинических лабораторных исследований. <i>Е. Н. Гаранина.</i>	15
5.1. Внутрилабораторный контроль качества	15
5.2. Межлабораторный контроль качества	19
5.3. Особенности контроля качества отдельных видов лабораторных исследований	21
5.4. Контроль качества работы лаборантов	23
1.6. Характеристика физико-химических принципов методов и аппаратуры клинико-диагностических лабораторий. <i>И. С. Балаховский.</i>	25
1.6.1. Фотометрия и фотометрическая аппаратура	25
1.6.2. Флюорометрия	28
1.6.3. Пламенная фотометрия и атомная абсорбциометрия	28
1.6.4. Иммунохимические методы	30
1.6.5. Некоторые виды лабораторного оборудования. <i>Т. И. Лукичева.</i>	36

Раздел 2

ХИМИКО-МИКРОСКОПИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ. *Н. Г. ПЛЕТНЕВА*

2.1. Моча	47
2.1.1. Физические свойства	47
2.1.2. Химическое исследование	48
2.1.3. Скрининг-тесты для выявления наследственных или приобретенных нарушений обмена веществ у детей	56
2.1.4. Микроскопия осадка мочи	59
2.2. Кал	66
2.2.1. Подготовка больного и сбор материала	66
2.2.2. Физические свойства	67
2.2.3. Химическое исследование	68
2.2.4. Микроскопия	70
2.2.5. Обнаружение простейших	75
2.2.6. Обнаружение гельминтов	79

2.3.	Желудочная секреция	85
2.3.1.	Методы желудочного зондирования	85
2.3.2.	Исследование желудочного содержимого	86
2.3.3.	Беззондовые методы	90
2.4.	Мокрота	91
2.4.1.	Физические свойства (определение характера и общих свойств мокроты)	91
2.4.2.	Химическое исследование	92
2.4.3.	Микроскопия	92
2.4.4.	Алгоритмический анализ мокроты	95
2.4.5.	Бактериоскопия	97
2.5.	Экссудаты и трансудаты	98
2.5.1.	Виды пунктатов	98
2.5.2.	Физико-химические свойства	98
2.5.3.	Микроскопия	99
2.5.4.	Бактериоскопия	100
2.6.	Спинальная жидкость	100
2.6.1.	Физические свойства	100
2.6.2.	Микроскопия	101
2.6.3.	Химическое исследование	103

Раздел 3

МЕТОДЫ ГЕМАТОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ. Р. П. ЗОЛТНИЦКАЯ

3.1.	Взятие крови	106
3.2.	Гемоглобин	107
3.2.1.	Содержание гемоглобина	107
3.2.2.	Фракции гемоглобина	108
3.2.3.	Патологические формы гемоглобина	109
3.3.	Эритроциты	110
3.3.1.	Подсчет количества	110
3.3.2.	Исследование морфологии эритроцитов	111
3.3.3.	Эритроцитометрия (измерение диаметра эритроцитов)	114
3.3.4.	Общий объем эритроцитов (гематокритная величина)	115
3.3.5.	Индексы эритроцитов	115
3.3.6.	Ретикулоциты	118
3.3.7.	Резистентность эритроцитов	119
3.3.8.	Пробы на ферментопатию эритроцитов	120
3.3.9.	Цитохимические исследования эритроцитов	121
3.3.10.	Скорость оседания эритроцитов (СОЭ)	122
3.4.	Лейкоциты	122
3.4.1.	Подсчет количества	123
3.4.2.	Лейкоцитарная формула	124
3.4.3.	Лейкоконцентрат	125
3.4.4.	Исследование волчаночных клеток (LE-клетки)	126
3.4.5.	Цитохимические исследования лейкоцитов	127
3.5.	Тромбоциты	136
3.5.1.	Подсчет количества	136
3.5.2.	Исследование функций тромбоцитов	137
3.6.	Изменения крови при лейкозах	138
3.7.	Костный мозг	140
3.7.1.	Пункция костного мозга	140
3.7.2.	Подсчет миелокарицитов	140
3.7.3.	Подсчет мегакарицитов	141
3.7.4.	Морфологическое исследование форменных элементов с подсчетом миелограммы	141
3.7.5.	Трепанобиопсия костного мозга	144
3.8.	Лимфатические узлы	145
3.8.1.	Цитологическое исследование	145
3.8.2.	Гистологическое исследование	145

Раздел 4

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ СИСТЕМЫ ГЕМОСТАЗА. А. Я. СМОЛЯНИЦКИЙ

4.1.	Взятие и обработка крови	149
4.2.	Обработка лабораторной посуды	150
4.3.	Методы исследования тромбоцитарно-сосудистого гемостаза (первичного гемостаза)	151
4.3.1.	Время кровотечения	151

4.3. 2.	Резистентность (ломкость) капилляров	151
4.3. 3.	Количество (подсчет) тромбоцитов	152
4.3. 4.	Ретенция (адгезивность) тромбоцитов	152
4.3. 5.	Агрегация тромбоцитов	152
4.3. 6.	Коагуляционная (коагулянтная, прокоагулянтная) активность тромбоцитов	154
4.3. 7.	Ретракция сгустка крови	154
4.4.	Методы исследования свертывания крови (коагуляционный гемостаз, коагуляционное звено или компонент системы гемостаза)	155
4.4. 1.	Время свертывания крови	155
4.4. 2.	Время рекальцификации стабилизированной крови (плазмы)	155
4.4. 3.	Активированное частичное (парциальное) тромбопластиновое время (АЧТВ)	157
4.4. 4.	Протромбиновое время (протромбиновый индекс)	158
4.4. 5.	Время свертывания плазмы при активации фактора X	159
4.4. 6.	Время свертывания плазмы при прямой стимуляции превращения фибриногена в фибрин (тромбиновое и рептилазовое время)	160
4.4. 7.	Тромбоэластография	161
4.4. 8.	Электрокоагулография	161
4.4. 9.	Аутокоагуляционный тест	162
4.4.10.	Тест генерации тромбопластина	162
4.4.11.	Одностадийное определение факторов VIII, IX, XI и XII	164
4.4.12.	Одностадийное определение фактора X (фактора Стюарта — Прауэра)	165
4.4.13.	Одностадийное определение фактора II	166
4.4.14.	Одностадийное определение фактора V	167
4.4.15.	Одностадийное определение фактора VII	167
4.4.16.	Методы, характеризующие концентрацию (активность) антикоагулянтов	167
4.4.17.	Методы, характеризующие конечный этап свертывания крови (фибриноген и его производные, активность фактора XIII)	168
4.5.	Методы исследования фибринолитической системы крови (фибринолитического звена или компонента системы гемостаза)	170
4.5.1.	Время лизиса эуглобулиновых сгустков	171
4.5.2.	Методы, основанные на применении фибриновых пластин	171
4.5.3.	Продукты деградации фибрина (ПДФ)	172

Раздел 5

МЕТОДЫ КЛИНИЧЕСКОЙ БИОХИМИИ

5.1.	Белки. <i>В. В. Меньшиков, Л. Н. Делекторская.</i>	174
5.1.1.	Общий белок	174
5.1.2.	Альбумин	176
5.1.3.	Белковые фракции	177
5.1.4.	Осадочные пробы	179
5.2.	Ферменты. <i>В. В. Меньшиков, Л. Н. Делекторская.</i>	181
5.2.1.	Общая часть	181
5.2.2.	Аминотрансферазы	186
5.2.3.	α-Амилаза	191
5.2.4.	γ-Глутамилтрансфераза	192
5.2.5.	Глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа	194
5.2.6.	Креатинкиназа	195
5.2.7.	Лактатдегидрогеназа, изоферменты лактатдегидрогеназы	197
5.2.8.	Липаза	200
5.2.9.	Сорбитолдегидрогеназа	203
5.2.10.	Уроканиназа	204
5.2.11.	Щелочная фосфатаза, изоферменты щелочной фосфатазы	205
5.2.12.	Кислая фосфатаза, фракции кислой фосфатазы	209
5.2.13.	Фруктозо-1,6-дифосфат-альдолаза	210
5.2.14.	Псевдохолинэстераза	212
5.3.	Низкомолекулярные азотистые вещества. <i>Л. Н. Делекторская.</i>	215
5.3.1.	Мочевина	215
5.3.2.	Креатинин	219
5.3.3.	Мочевая кислота	221
5.3.4.	Аминокислоты и пептиды	222
5.3.5.	Индикан	224
5.4.	Пигменты. <i>Л. Н. Делекторская.</i>	224
5.4.1.	Билирубин	225
5.4.2.	Порфирины	228
5.4.3.	Порфобилиноген	228

5.4.4.	Дельта-аминолевулиновая кислота	229
5.4.5.	Копропорфирин, уропорфирин.	230
5.5.	Углеводы и родственные соединения. <i>И. С. Балаховский.</i>	230
5.5.1.	Глюкоза	230
5.5.2.	Углеводные компоненты гликопротеидов	234
5.5.3.	Сиаловые кислоты.	235
5.5.4.	Связанные с белком гексозы.	236
5.5.5.	Гексуроновые кислоты.	237
5.5.6.	Гликозилированный гемоглобин.	238
5.5.7.	Молочная кислота.	240
5.6.	Липиды. <i>И. С. Балаховский.</i>	240
5.6.1.	Холестерин и его эфиры.	241
5.6.2.	Экстракционные методы определения холестерина и его эфиров.	243
5.6.3.	Холестерин а-липопротеидов	245
5.6.4.	Триглицериды.	246
5.6.5.	Инфракрасная спектрофотометрия липидов.	247
5.6.6.	Неэстерифицированные жирные кислоты.	248
5.6.7.	Липопротеиды.	248
5.7.	Гормоны. <i>И. С. Балаховский.</i>	250
5.7.1.	Экстракция и очистка растворителей.	250
5.7.2.	17-Кетостероиды.	251
5.7.3.	17-Оксикортикостероиды.	253
5.7.4.	11-Оксикортикостероиды.	255
5.7.5.	Адреналин, норадреналин.	256
5.7.6.	Ванилил-миндальная кислота.	257
5.7.7.	Гистамин, серотонин.	258
5.7.8.	5-Оксииндолилуксусная кислота.	260
5.8.	Неорганические вещества. <i>Я. С. Балаховский.</i>	261
5.8.1.	Натрий и калий.	261
5.8.2.	Кальций.	264
5.8.3.	Магний.	266
5.8.4.	Железо.	267
5.8.5.	Фосфор и фосфорсодержащие вещества.	270
5.8.6.	Неорганический фосфор.	271
5.8.7.	Липидный фосфор.	272
5.8.8.	Фосфонуклеотиды.	273
5.8.9.	Хлор.	275

Раздел 6

МЕТОДЫ КЛИНИЧЕСКОЙ ИММУНОЛОГИИ. *Д. В. БЕЛОКРИНИЦКИЙ*

6.1.	Особенности методов клинической иммунологии.	277
6.2.	Исследование факторов гуморального иммунитета — реакция агглютинации.	278
6.2.1.	Антитела к эритроцитам.	278
6.2.2.	Резус-фактор.	279
6.2.3.	Антитела к лейкоцитам.	280
6.2.4.	ДНК и антитела к ДНК.	280
6.2.5.	Ревматоидный фактор.	282
6.3.	Реакция иммунного лизиса.	284
6.3.1.	Гемолитическая активность комплемента.	284
6.3.2.	Антистрептолизин-О.	287
6.3.3.	Антигиалуронидаза.	288
6.4.	Реакции преципитации.	291
6.4.1.	С-реактивный белок.	291
6.4.2.	Циркулирующие иммунные комплексы.	292
6.4.3.	Иммунные глобулины.	292
6.4.4.	Альфа-фетопротейн.	295
6.4.5.	Парапротеины.	297
6.4.6.	Поверхностный антиген гепатита В и антитела к нему.	301
6.4.7.	Количественный анализ антигенов.	303
6.4.8.	Возможные источники ошибок и неспецифические реакции при использовании иммунодиффузионных методов.	303
6.5.	Антиядерные антитела.	305
6.6.	Исследование факторов клеточного иммунитета.	306
6.6.1.	Т-лимфоциты.	306