

В. Г. Колб, В. С. Камышников

**СПРАВОЧНИК  
ПО КЛИНИЧЕСКОЙ  
ХИМИИ**

Электронная версия данной книги создана исключительно для ознакомления только на локальном компьютере! Пользуясь данным файлом, вы берёте на себя полную ответственность за его дальнейшее использование и распространение, согласно действующему законодательству. При приобретении, вы подтверждаете своё согласие с данными утверждениями!

Реализация данной электронной книги в любых интернет-магазинах, и на CD (DVD) дисках с целью получения прибыли, незаконна и запрещена! По вопросам приобретения печатной или электронной версии данной книги обращайтесь непосредственно к законным издателям, их представителям, либо в соответствующие организации торговли

[vagus@yandex.ru](mailto:vagus@yandex.ru)





# ОГЛАВЛЕНИЕ

Предисловие . . . . .	3
Глава I. Применение Международной системы единиц (СИ) в клинической лабораторной диагностике . . . . .	7
Глава II. Оценка надежности клинико-биохимических исследований . . . . .	11
Глава III. Методы исследования белкового обмена . . . . .	29
Определение общего белка в сыворотке (плазме) крови и других биологических жидкостях . . . . .	29
Унифицированный способ определения общего белка в сыворотке (плазме) крови . . . . .	31
Исследование белкового спектра крови . . . . .	35
Определение белковых фракций сыворотки крови методом электрофореза на бумаге . . . . .	37
Определение белковых фракций сыворотки крови методом электрофореза на ацетатцеллюлозе . . . . .	43
Методика электрофоретического исследования белков сыворотки крови на пленках из ацетатцеллюлозы . . . . .	45
Диск-электрофорез . . . . .	47
Методика диск-электрофоретического фракционирования белков сыворотки крови . . . . .	51
Глава IV. Пробы коллоидоустойчивости . . . . .	59
Коагуляционная лента Вельтмана . . . . .	59
Проба Вельтмана в модификации Тейфля . . . . .	60
Сулемовая проба . . . . .	61
Сулемовая проба (по Гринстедту) . . . . .	62
Тимоловая проба . . . . .	62
Тимоловая проба (по Хуэрго и Попперу) . . . . .	63
Глава V. Определение остаточного азота и его компонентов . . . . .	65
Определение остаточного азота крови гипобромитным методом (метод Раппопорта — Эйхгорна) . . . . .	67
Методы определения мочевины . . . . .	71
Определение мочевины в сыворотке крови экспресс-методом с применением реактивной бумаги «Уреатест» . . . . .	73
Определение мочевины в сыворотке крови и в моче по цветной реакции с диацетилмонооксидом . . . . .	73
Определение мочевины в сыворотке крови уреазным методом по реакции с фенолгипохлоритом . . . . .	75
Определение мочевины крови уреазным методом по реакции с реактивом Несслера . . . . .	77
Методы определения креатинина и креатина в крови и моче . . . . .	80
Определение креатинина в сыворотке крови и в моче по	

цветной реакции Яффе (метод Поппера с соавт.) . . .	81
Определение креатина в крови и моче . . .	85
Геморенальные пробы . . .	87
Клубочковая фильтрация и канальцевая реабсорбция . . .	88
Проба Реберга . . . . .	89
Определение коэффициента очищения от мочевины . . .	89
Амниный азот . . . . .	90
Определение свободного амниного азота в сыворотке крови (по методу Г. А. Узбекиова в модификации З. С. Чулковой) . . .	91
Определение азота свободных аминокислот сыворотки крови по содержанию перегнанного аммиака . . .	92
Мочевая кислота . . . . .	93
Определение мочевой кислоты в сыворотке крови унифицированным фосфорновольфрамовым методом . . .	95
Определение мочевой кислоты по методу Мюллера—Зейфerta . . . . .	97
Индикац . . . . .	100
Определение индикана в сыворотке крови и моче . . .	100
<b>Глава VI. Методы изучения активности ферментов . . . . .</b>	<b>102</b>
Методы определения активности альдозаз в сыворотке крови . . .	103
Определение активности фруктозо-1,6-дифосфатальдолазы в сыворотке крови (метод В. И. Товарицкого, Е. И. Волуйской в модификации В. А. Апаньева и В. В. Обуховой) . . .	104
Установление активности фруктозо-1-фосфатальдолазы (метод Шапиро в модификации Д. М. Брагинского) . . .	108
Определение активности аминотрансфераз (трансампаза) . . .	110
Колориметрический диитрофенилгидразиновый метод исследования активности аминотрансфераз в сыворотке крови (по Райтману, Френкелю, 1957) . . . . .	111
Определение активности фосфатаз . . . . .	116
Определение активности щелочной фосфатазы в сыворотке крови по гидролизу р-нитрофенилфосфата (метод Бессея, Лоури, Брока) . . . . .	118
Определение активности щелочной и кислой фосфатаз в сыворотке крови по гидролизу $\beta$ -глицерофосфата (метод Боданского) . . . . .	121
Определение активности $\alpha$ -амилазы в сыворотке крови и моче . . .	126
Исследование активности $\alpha$ -амилазы (диастазы) в сыворотке крови и моче амилотестическим методом . . . . .	128
Определение активности $\alpha$ -амилазы со стойким крахмальным субстратом (метод Каравея) . . . . .	130
Модификация метода определения активности $\alpha$ -амилазы по Каравею . . . . .	131
Определение общей активности лактатдегидрогеназы . . . . .	134
Колориметрический диитрофенилгидразиновый метод исследования активности лактатдегидрогеназы в сыворотке крови (по Севелу и Товареку) . . . . .	135
Методика разделения изоферментов лактатдегидрогеназы в полиакриламидном геле . . . . .	138
Определение активности холинэстераз . . . . .	143
Определение активности сывороточной холинэстеразы колориметрическим методом . . . . .	144
Определение активности холинэстеразы в сыворотке крови экспресс-методом с применением индикаторной бумаги . . .	115

Исследование активности $\gamma$ -глутамилтранспептидазы . . . . .	147
Определение активности $\gamma$ -глутамилтранспептидазы в сыворотке крови . . . . .	148
Исследование активности аргиназы в сыворотке крови . . . . .	152
Метод определения активности аргиназы в сыворотке крови . . . . .	152
Определение активности сывороточной сорбитдегидрогеназы . . . . .	154
Метод исследования активности сорбитдегидрогеназы в сыворотке крови . . . . .	154
Определение активности лейцинаммонопептидазы в моче и сыворотке крови . . . . .	156
Метод исследования активности лейцинаммонопептидазы в моче и сыворотке крови . . . . .	157
Исследование активности трансаминазы в биологических жидкостях . . . . .	159
Определение активности трансаминазы в сыворотке крови и моче . . . . .	159
Исследование активности креатинфосфокиназы (креатинкиназы) . . . . .	162
Определение изоферментов креатинкиназы в сыворотке крови методом диск-электрофореза . . . . .	164
<b>Глава VII Изучение углеводного обмена . . . . .</b>	166
Определение глюкозы в крови . . . . .	166
Определение глюкозы в крови и моче по цветной реакции с ортотолуидином . . . . .	168
Определение глюкозы биологических жидкостей анилинным методом . . . . .	171
Определение глюкозы в крови, плазме (сыворотке) и спинномозговой жидкости глюкозооксидазным методом . . . . .	172
Изучение углеводного обмена методом нагрузок (тесты толерантности к глюкозе — ТТГ) . . . . .	176
Ход выполнения тестов толерантности к глюкозе . . . . .	176
Патофизиологические механизмы, обуславливающие изменение концентрации глюкозы крови после углеводной нагрузки . . . . .	178
Проба с двойной нагрузкой (по Штаубу—Трауготту) . . . . .	181
Проба Экстона—Розе . . . . .	181
<b>Глава VIII. Методы изучения углеводсодержащих белков и их компонентов в крови . . . . .</b>	182
Исследование общего количества гликопротеидов в сыворотке крови с использованием триптофана . . . . .	183
Метод определения содержания гексоз, связанных с белками, по реакции с триптофаном . . . . .	184
Определение гексоз в сыворотке крови орциновым методом после гидролиза серной кислотой . . . . .	185
Определение общего количества гексоз, гексоз гликопротеидов и гликозаминогликанов сыворотки крови . . . . .	187
Исследование серогликоидов в крови . . . . .	189
Определение серогликоидов в сыворотке крови по содержанию в них гексоз . . . . .	189
Турбидиметрический метод определения серогликоидов в сыворотке крови . . . . .	190
Методы определения сialовых кислот . . . . .	193
Определение сialовых кислот по методу Гесса . . . . .	191

Определение сиаловых кислот в сыворотке крови по реакции с резорцином (по Свеннерхольму) . . . . .	195
Методы исследования метаболитов углеводного обмена . . . . .	197
Определение пировиноградной кислоты в крови модифицированным методом Умбрайта . . . . .	198
Определение пировиноградной кислоты энзимным методом . . . . .	198
Определение молочной кислоты энзимным методом . . . . .	200
Глава IX. Методы изучения обмена липидов . . . . .	201
Исследование общих липидов и их фракций . . . . .	201
Определение общих липидов в сыворотке крови по цветной реакции с сульфифосфованилиновым реактивом . . . . .	202
Холестерин . . . . .	204
Метод определения общего холестерина в сыворотке крови, основанный на реакции Либермана—Бурхарда (метод Илька) . . . . .	206
Метод определения холестерина по Abell . . . . .	208
Методы определения свободного и эстерифицированного холестерина в сыворотке крови . . . . .	210
Непрямой метод определения свободного и эстерифицированного холестерина в сыворотке крови по реакции Златкиса—Зака . . . . .	211
Определение свободного и эстерифицированного холестерина в сыворотке крови прямым методом, основанным на реакции Либермана—Бурхарда . . . . .	213
Определение общих фосфолипидов в крови . . . . .	215
Определение общих фосфолипидов в сыворотке крови по содержанию в них фосфора . . . . .	216
Методика разделения фосфолипидов сыворотки крови на пластинках «Силуфол UV-254» . . . . .	218
Определение липидного фосфора . . . . .	219
Методы определения триацилглицеринов в сыворотке крови . . . . .	220
Определение триацилглицеринов в сыворотке крови по цветной реакции с хромотроповой кислотой (модификация метода Ганделя и Зильверсмита) . . . . .	221
Определение триацилглицеринов в сыворотке крови колориметрическим методом (по Gottfried и Rosenberg, 1973) . . . . .	223
Определение триацилглицеринов в сыворотке крови по цветной реакции с ацетилацетоном (метод Gottfried и Rosenberg, 1973, в модификации Н. Л. Асланяна, В. М. Шухяна, Л. А. Бабаяна, 1977) . . . . .	224
Состав и свойства липопротеидов сыворотки крови . . . . .	226
Методы фракционирования липопротеидов . . . . .	227
Разделение липопротеидов методом зонального электрофореза . . . . .	228
Определение липопротеидов в сыворотке крови методом электрофореза на бумаге (Сван, 1953; Л. К. Бауман, 1961; В. Г. Колб, 1970) . . . . .	230
Определение липопротеидов сыворотки крови методом электрофореза в полиакриламидном геле (по Е. Я. Маграчевой, 1973) . . . . .	231
Количественная оценка диск-электрофореграмм липопротеидов сыворотки крови (В. С. Камышников, В. Г. Колб, 1976) . . . . .	233
Определение фракционного состава липопротеидов сыво-	



ротки крови в геле одной концентрации (В. Г. Колб, А. Д. Таганович, Г. Л. Гуревич, 1979)	236
Электрофорез липопротеидов в геле агарозы (В. Н. Титов, И. Г. Кантраджян, Н. К. Филиппов, 1978)	238
Метод определения холестерина липопротеидов высокой плотности ( $\alpha$ -холестерина)	239
Определение содержания $\beta$ - и пре- $\beta$ -липопротеидов сыворотки крови турбидиметрическим методом (по Буриштену и Самаю)	241
Определение патологической фракции липопротеидов (липопротеида-X) в сыворотке крови	242
Исследование липопротеидлиазной активности плазмы крови	243
<b>Глава X. Исследование пигментного обмена</b>	248
Методы определения билирубина в сыворотке крови	249
Определение содержания билирубина и его фракций в сыворотке крови колориметрическим диазометодом (по Пендрашику, Клеггору, Грофу)	251
Определение билирубина в малом объеме сыворотки крови	253
Ультрамикрометод определения билирубина в капиллярной крови (по Rote)	255
<b>Глава XI. Исследование минерального обмена</b>	257
Исследование электролитов в крови и моче методом пламенной фотометрии	258
Определение электролитов в крови и моче методом пламенной фотометрии	259
Методы определения кальция в сыворотке крови	268
Определение общего кальция в сыворотке крови фотометрическим методом, основанным на реакции с глюксальбис [2-оксанилом]	270
Определение общего кальция в сыворотке и плазме крови по цветной реакции с о-КФК	270
Исследование магния в сыворотке (плазме) крови, эритроцитах, моче	272
Определение магния в сыворотке (плазме) крови и эритроцитах по цветной реакции с титановым желтым	273
Определение магния в эритроцитах	275
Методы определения хлорид-ионов в крови, моче и спинномозговой жидкости	275
Определение ионов хлора в сыворотке крови, моче и спинномозговой жидкости меркуриметрическим методом с индикатором дифенилкарбазоном	277
Неорганический фосфор	279
Определение неорганического фосфора в сыворотке крови и моче по восстановлению фосфорномолибденовой кислоты	281
Методы определения железа и железосвязывающей способности сыворотки крови	283
Батофенаптолиновый метод определения железа сыворотки крови	284
Определение общей и ненасыщенной железосвязывающей способности сыворотки (ОЖСС, НЖСС) крови	287
Медь и церулоплазмин	289

Определение меди в сыворотке крови методом Шмидта в модификации А. Г. Рахманкулова и И. А. Контевой . . . . .	289
Определение активности церулоплазмينا в сыворотке крови модифицированным методом Ревина (С. В. Бестужева, В. Г. Колб) . . . . .	290
Глава XII. Исследование гормонально-медиаторного обмена	292
Гормоны надпочечников . . . . .	292
Методы определения 17-кетостероидов в моче . . . . .	294
Определение 17-кетостероидов в моче по реакции с метадинитробензолом . . . . .	296
Определение кортикостероидов в моче . . . . .	301
Определение 17-оксикортикостероидов в моче по реакции с фенилгидразином после ферментативного гидролиза (метод Silber, Porter, 1957, в модификации И. А. Юдаева и М. А. Креховой, 1960) . . . . .	303
Определение кортикостероидов в периферической крови . . . . .	307
Определение 11-оксикортикостероидов в плазме крови по их флюоресценции в серноспиртовом реактиве (Ю. А. Панков, И. Я. Усватова, 1965) . . . . .	309
Исследование обмена катехоламинов . . . . .	313
Определение адреналина и норадrenalина в моче флюориметрическим методом после дифференциального окисления катехоламинов подом при различных значениях рН (В. В. Меньшиков, 1961) . . . . .	316
Определение адреналина, норадrenalина, дофамина и диоксифенилаланина (ДОФА) в одной порции мочи (Э. Ш. Матлина, З. М. Киселева, И. Э. Софиева, 1965) . . . . .	321
Методы определения метилированных продуктов обмена катехоламинов в моче . . . . .	328
Определение ванилил-миндальной кислоты с использованием электрофореза на бумаге (В. В. Меньшиков, Т. Д. Большакова, 1966) . . . . .	329
Метод определения в моче ванилил-миндальной, 5-оксииндолуксусной кислот и тирамина (В. С. Камышников, 1971) . . . . .	331
Исследование системы серотонин—5-гидроксииндолуксусная кислота . . . . .	338
Определение серотонина в крови флюориметрическим методом с о-фталевым альдегидом . . . . .	339
Определение 5-гидроксииндолуксусной кислоты в моче . . . . .	341
Определение 5-гидроксииндолуксусной кислоты в моче по реакции с $\alpha$ -нитрозо- $\beta$ -нафтолом (Юденфренд, Титус, Вайсбах, 1955) . . . . .	342
Определение 5-гидроксииндолуксусной кислоты в моче по реакции с $\alpha$ -нитрозо- $\beta$ -нафтолом (В. С. Камышников, 1968) . . . . .	344
Исследование системы гистамин—гистаминназа . . . . .	349
Определение гистамина в цельной крови по флюоресценции продуктов, образующихся при реакции с о-фталевым альдегидом (модификация метода С. А. Мещеряковой) . . . . .	351
Определение активности гистаминназы в сыворотке крови . . . . .	354
Рекомендуемая литература . . . . .	358

Табл. 4. Изменения, внесенные в наименования и обозначения единиц величин, наиболее широко применяемых в клинико-биохимических исследованиях

Величина	Устаревшие		Рекомендуемые	
	наименования	обозначения	наименования	обозначения
Длина	микрон	мк	микрометр	мкм
	миллимикрон	ммк	нанометр	нм
Масса	гамма	γ	микрограмм	мкг
Количество вещества	грамм-моль	г-моль	моль	моль
	грамм-молекула	г-молекула		
	грамм-атом	г-атом		
	грамм-ион	г-ион		
	грамм-эквивалент	г-экв		
Массовая концентрация	миллиграмм-эквивалент	мг-экв	миллимоль	ммоль
	микрограмм-эквивалент	мкг-экв	микромоль	мкмоль
	грамм на миллилитр	г/мл	килограмм на литр	кг/л
	грамм-промилле	г‰	грамм на литр	г/л
	грамм-процент	г%	10 граммов на литр	10 г/л
	грамм на 100 миллилитров	г/100 мл		
	грамм на децилитр			
	миллиграмм на 100 миллилитров	мг/100 мл	10 миллиграммов на литр	10 мг/л
	миллиграмм-процент	мг%		
	микрограмм на 100 миллилитров	мкг/100 мл	10 микрограммов на литр	10 мкг/л
микрограмм-процент	мкг%			
гамма-процент	γ%			
Температура практическая	градус	град	градус Цельсия	°С

Вместе с основной единицей времени (секунда) возможно применение таких единиц, как минута, час, сутки.

В качестве единиц объема наряду с кубическим метром довольно широко используется единица «литр» (кубический дециметр). Не допускаются единицы, дольные от литра: мл (миллилитр, см<sup>3</sup>); мкл (микролитр, мм<sup>3</sup>); нл (нанолитр); пл (пиколитр); фл (фемтолитр). Более полное представление о размерности этих величин можно получить при рассмотрении табл. 3. Принято относить содержание какого-либо биохимического компонента к 1 литру биологической жидкости.

Табл. 5 облегчает ориентировку в современных показателях нормы для основных видов клинико-биохимических исследований, выполненных с применением унифицированных методик. Для перехода от прежних значений к вновь утвержденным показатели устаревших величин следует умножить на коэффициент пересчета. Для осуществления обратного перехода значение показателя, выраженного в новых единицах, необходимо разделить на коэффициент пересчета.

Для преобразования показателей прежних калибровочных кривых и таблиц, выраженных в старых единицах, в новые старые показатели следует умножить на предлагаемые коэффициенты пересчета. При построении новых калибровочных графиков и таблиц значения концентрации стандарта пересчитываются в новые единицы аналогичным способом.

Хочется обратить внимание читателей на следующие моменты, обусловленные в табл. 5:

1. При исследовании кислотно-основного равновесия парциальное давление должно быть выражено в килопаскалях (кПа).

2. В связи с тем что при оценке активности ферментов учитывается вид примененного субстрата, необходимо всегда давать ссылку на использованный метод определения.

3. Если ранее показатель величины экскреции исследуемого компонента с суточным объемом мочи относили к 24 часам, то сейчас количество выводимого с мочой вещества относят к рекомендованной единице измерения «сутки».

## Глава II

### ОЦЕНКА НАДЕЖНОСТИ КЛИНИКО-БИОХИМИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Одно из проявлений научно-технического прогресса в медицине — возрастание удельного веса лабораторных исследований, имеющих значение для осуществления своевременной профилактики, диагностики заболеваний и их лечения. Расширяется диапазон лабораторных тестов, увеличивается количество выполняемых анализов. Все это отражается на надежности получаемой с использованием лабораторных методов информации.

В 1947 г. после опубликования Белком и Сандерманном (США) результатов выполнения в различных лабораториях аналогичных биохимических исследований на одном и том же биологическом ма-



Табл. 5. Показатели нормы, выраженные в старых, новых единицах, и коэффициенты их пересчета

Наименование биохимического теста	Значение нормы в единицах, подлежащих замене	Коэффициент пересчета	Показатели нормы в единицах СИ
<i>Плазма (сыворотка) крови</i>			
Адреналин	0,35—0,45 мкг/л	5,458	1,91—2,46 нмоль/л
Аланинаминотрансфераза	0,10—0,68 мкмоль/(ч·мл)	1,000	0,10—0,68 ммоль/(ч·л)
Аспартатаминотрансфераза	0,10—0,45 мкмоль/(ч·мл)	1,000	0,10—0,45 ммоль/(ч·л)
Альбумины	4,0—5,0 г/100 мл	10,000	40—50 г/л
Альфа-амилаза	16—30 мг/(ч·мл)	1,000	16—30 г/(ч·л)
Аммиак	30—132 мкг/100 мл	0,600	17—78 мкмоль/л
Белок общий	6,5—8,5 г/100 мл	10,000	65—85 г/л
Белковые фракции:			
Альбумины	56,5—66,8 %	1,000	56,5—66,8 %
Глобулины	33,2—43,5 %	1,000	33,2—43,5 %
альфа <sub>1</sub> -	3,5—6,0 %	1,000	3,5—6,0 %
альфа <sub>2</sub> -	6,9—10,5 %	1,000	6,9—10,5 %
бета-	7,3—12,5 %	1,000	7,3—12,5 %
гамма-	12,8—19,0 %	1,000	12,8—19,0 %
Билирубин	0,5—1,2 мг/100 мл	17,104	8,55—20,52 мкмоль/л
Галактоза	до 4,3 мг/100 мл	0,055	до 0,24 ммоль/л
Гистамин (в цельной крови)	2—8 мкг/100 мл (0,02—0,08 мкг/мл)	0,090	0,18—0,72 мкмоль/л

Наименование биохимического теста	Значение нормы в единицах, подлежащих замене	Коэффициент пересчета	Показатели нормы в единицах СИ
Гаптоглобин	28—190 мг/100 мл	0,010	0,28—1,90 г/л
Глюкоза	0—100 мг/100 мл	0,055	2,78—5,55 ммоль/л
γ-ГТП	—	—	0,6—3,96 ммоль/(ч·л)
Гликопротеиды (общие)	120—160 мг/100 мл	0,010	1,2—1,6 г/л
Гексозы, связанные с белками	105—115 мг/100 мл	0,010	1,05—1,15 г/л
Железо:			
у мужчин	80—140 мкг/100 мл	0,179	14,32—25,06 мкмоль/л
у женщин	60—120 мкг/100 мл	0,179	10,74—21,48 мкмоль/л
Индикан	22—80 мкг/100 мл	0,040	0,87—3,13 мкмоль/л
Калий:			
Калий в сыворотке	3,6—5,4 мг-экв/л	1,000	3,6—5,4 ммоль/л
	14—21 мг/100 мл	0,256	3,6—5,4 ммоль/л
Калий в эритроцитах	310—440 мг/100 мл	0,256	79,4—112,6 ммоль/л
Литий	0,35—1,4 мг/100 мл	1,440	0,5—2,0 ммоль/л
Кальций	8—11 мг/100 мл	0,250	2,0—2,75 ммоль/л
	4,0—5,5 мг-экв/л	0,499	2,0—2,75 ммоль/л
Кортикостероиды (17-ОКС)	5,0—20,0 мкг/100 мл	0,028	0,14—0,55 мкмоль/л
Креатинин	0,5—1,0 мг/100 мл	0,088	0,044—0,088 ммоль/л

Наименование биохимического теста	Значение нормы в единицах, подлежащих замене	Коэффициент пересчета	Показатели нормы в единицах СИ
Креатинкиназа	до 20 Е/л	0,060	до 1,2 ммольР/(ч·л)
Кислотно-основное равновесие:			
Бикарбонат стандартный	4,5—5,5 мг-экв/л	1,000	4,5—5,5 ммоль/л
рН (активная реакция крови)	7,35—7,45 ед	1,000	7,35—7,45 ед
Избыток оснований (в крови)	(-2,3) — (+2,3) мг-экв/л	1,000	(-2,3) — (+2,3) ммоль/л
Парциальное давление углекислого газа рСО <sub>2</sub> (в крови)	34—45 мм рт. ст.	0,133	4,52—5,99 кПа
Парциальное давление О <sub>2</sub> (в артериальной крови)	90—95 мм рт. ст.	0,133	12,0—12,6 кПа
Парциальное давление О <sub>2</sub> (в венозной крови)	35—45 мм рт. ст.	0,133	4,66—5,99 кПа
Лактатдегидрогеназа	0,8—4,0 мкмоль/(ч·мл)	1,000	0,8—4,0 ммоль/(ч·л)
Липиды общие	400—800 мг/100 мл	0,010	4,00—8,00 г/л
Липопротеиды	350—750 мг/100 мл	0,010	3,50—7,50 г/л
Магний сыворотки	1,9—2,2 мг/100 мл	0,411	0,78—0,91 ммоль/л
Магний ликвора	2,5—3,5 мг/100 мл	0,411	1,03—1,43 ммоль/л
Медь	70—140 мкг/100 мл	0,157	11—22 мкмоль/л
Молочная кислота (в венозной крови)	5—15 мг/100 мл	0,111	0,56—1,67 ммоль/л

Наименование биохимического теста	Значение нормы в единицах, подлежащих замене	Коэффициент пересчета	Показателя нормы в единицах СИ
Молочная кислота (в артериальной крови)	3—7 мг/100 мл	0,111	0,33—0,78 ммоль/л
Мочевая кислота	2—4 мг/100 мл	0,059	0,12—0,24 ммоль/л
Мочевина	15—50 мг/100 мл	0,166	2,50—8,33 ммоль/л
Натрий сыворотки	130—150 мг-экв/л	1,000	130—150 ммоль/л
Натрий эритроцитов	12,5—21,7 мг-экв/л	1,000	12,5—21,7 ммоль/л
Норадреналин	0,65—0,90 мкг/л	5,911	3,84—5,31 ммоль/л
17-оксикортикостероиды	5—20 мкг/100 мл	0,027	0,138—0,550 мкмоль/л
Пировиноградная кислота (в крови)	0,4—1,0 мг/100 мл	114	45,6—114 мкмоль/л
Протромбин	10—15 мг/100 мл	0,140	1,4—2,1 мкмоль/л
	%	1,000	%
Серомукоид (серогликонды общие)	22—28 мг/100 мл	0,010	0,22—0,28 г/л
Серотонин (в плазме)	4,4±0,9 мкг/100 мл	0,0567	0,25±0,05 мкмоль/л
Серотонин (в крови)	9,0—18,0 мкг/100 мл	0,0567	0,51—1,02 мкмоль/л
Сиаловые кислоты	62—73 мг/100 мл	0,323	2,00—2,36 ммоль/л
Тимоловая проба	0—4 ед S—H	1,000	0—4 ед S—H
Трансферрин	200—250 мг/100 мл	0,179	35,80—44,75 ммоль/л



Наименование биохимического теста	Значение нормы в единицах, подлежащих замене	Коэффициент пересчета	Показатели нормы в единицах СИ
Триглицериды (триацилглицерины)	40—165 мг/100 мл	0,011	0,44—1,82 ммоль/л
Фибриноген (в плазме)	200—400 мг/100 мл	0,010	2,00—4,00 г/л
	200—400 мг/100 мл	0,029	5,9—11,7 мкмоль/л
Фосфатаза кислая	0,05—0,13 мкмоль/(ч·мл)	1,000	0,05—0,13 ммоль/(ч·л)
Фосфатаза щелочная	0,5—1,3 мкмоль/(ч·мл)	1,000	0,5—1,3 ммоль/(ч·л)
Фосфолипиды общие	195—225 мг/100 мл	0,013	2,52—2,91 ммоль/л
Фосфор липоидный	6,1—14,5 мг/100 мл	0,323	1,97—4,68 ммоль/л
Фосфор неорганический	2—4 мг/100 мл	0,323	0,646—1,292 ммоль/л
Фруктоза (в крови)	0,5—5,0 мг/100 мл	5,551	2,77—27,75 мкмоль/л
Хлор (хлорид-ионы)	96—108 мг-экв/л	1,000	96—108 ммоль/л
Холестерин	140—260 мг/100 мл	0,026	3,64—6,76 ммоль/л
Холинэстераза	160—340 мкмоль/(ч·мл)	1,000	160—340 ммоль/(ч·л)
<i>Моча</i>			
Аммиак	0,5—1,0 г/24 ч	60,000	30—60 ммоль/сут
Адреналин	3—15 мкг/24 ч	5,458	16,4—82,0 нмоль/сут
Альдостерон	1—15 мкг/24 ч	2,774	2,8—41,6 нмоль/сут
Альфа-амилаза	28—160 мг/(ч·мл)	1,000	28—160 г/(ч·л)
Белок	‰	1,000	г/л

Наименование биохимического теста	Значение нормы в единицах, подлежащих замене	Коэффициент пересчета	Показатели нормы в единицах СИ
Белок Бенса — Джонса	%	1,000	г/л
Ванилил-миндальная кислота	0,7—3,8 мг/сут	5,046	3,53—19,2 мкмоль/сут
Глюкоза	следы, мг (г)	5,551	следы, мкмоль (ммоль)
ДОФА (диоксифенилаланин)	8—111 мкг/сут	5,071	40,6—563,0 нмоль/сут
Дофамин	112—450 мкг/сут	6,528	732—2940,0 нмоль/сут
Калий	38,4—89,5 мг-экв/л	1,000	38,4—89,5 ммоль/л
17-кетостероиды:			
у мужчин	6,6—23,4 мг/24 ч	3,467	22,9—81,1 мкмоль/сут
у женщин	6,4—18,02 мг/24 ч	3,467	22,2—62,5 мкмоль/сут
Клиренс креатинина:			
фильтрация	80—120 мл/мин	1,000	80—120 мл/мин
реабсорбция	97—99%	0,010	0,97—0,99
Креатин	0—60 мг/24 ч	0,076	0—0,456 ммоль/сут
Креатинин	0,5—2 г/24 ч	8,800	4,4—17,6 ммоль/сут
Магний	1,4—2,4 мг-экв/л	0,500	0,7—1,2 ммоль/л
Мочевая кислота	400—1000 мг/24 ч	0,006	2,36—5,9 ммоль/сут
Мочевина	20—35 г/24 ч	16,65	333,0—582,8 ммоль/сут

Наименование биохимического теста	Значение нормы: в единицах, подлежащих замене	Коэффициент пересчета	Показатели нормы в единицах СИ
<b>Прегнандиол:</b>			
у женщин	0,3—15 мг/24 ч	3,120	9,36—46,8 ммоль/сут
у мужчин	0,38—1,48 мг/24 ч	3,120	1,19—4,62 ммоль/сут
Норадреналин	10—40 мкг/24 ч	5,910	59—236 мкмоль/сут
5-оксиндолуксусная кислота	5,0±0,65 мг/сут	5,230	26,15±3,4 мкмоль/сут
17-оксикортикостероиды суммарные	1,31—7,39 мг/24 ч	2,758	3,61—20,38 мкмоль/сут
Плотность	1,012—1,020 г/мл	1,000	1,012—1,020 кг/л
pH	5,0—7,0 ед.	1,000	5,0—7,0 ед
Фосфор неорганический	0,8—1,50 г/24 ч	0,032	0,026—0,048 ммоль/сут
<b>Эстрогены:</b>			
у женщин	5—60 мкг/24 ч	3,530	17,65—211,8 нмоль/сут
у мужчин	до 10 мкг/24 ч	3,530	до 35,3 нмоль/сут
<i>Спинномозговая жидкость</i>			
Глюкоза	45—70 мг/100 мл	0,055	2,50—3,89 ммоль/л
Белок	0,22—0,33 ‰	1,000	0,22—0,33 г/л
Хлор	120—130 мг-экв/л	1,000	120—130 ммоль/л

остро встал вопрос о необходимости осуществления контроля качества лабораторных исследований. Авторами работы были получены неудовлетворительные результаты определения общего альбумина, мочевины, хлоридов, кальция и гемоглобина почками в половине из всех проверенных лабораторий. Аналогичные данные со временем были получены и другими исследователями (Тонкс, 1961 — Канада; Говенлок, 1969 — Великобритания). Проведенный в Москве и Свердловске контроль качества лабораторных исследований также выявил значительные расхождения между результатами выполнения одного и того же биохимического теста (В. В. Меньшиков с соавт., 1973). Вот почему оценка надежности клиничко-биохимических исследований рассматривается как одна из актуальнейших задач дальнейшего совершенствования лабораторной службы.

Качество выполнения лабораторных анализов определяется главным образом особенностями применяемого метода, тщательностью его исполнения, квалификацией лаборантов, техническим совершенством аппаратуры, чистотой реактивов и точностью мерной посуды.

Контроль качества работы лабораторий, критериями которого являются воспроизводимость и правильность результатов, невозможен без предварительной оценки применяемого метода исследования.

Международной Федерацией Клинической Химии (МФКХ) различается несколько групп аналитических методов.

1. Окончательные — методы, которые после всестороннего теоретического и практического исследования признаны не имеющими источников ошибок. Пример одного из них — способ определения кальция масс-спектрометрией с изотопным разведением. Окончательные методы дорогостоящи, вследствие чего возникает потребность в других, более доступных способах, для проведения которых необходимы теоретические расчеты, гарантирующие их правильность.

2. Методы, правильность которых оценивается сравнением с окончательными, именуются референтными. Выполняемые с помощью доступного оборудования, они позволяют получать результаты, статистически неотличимые от таковых, получаемых с использованием окончательных методов. Примером одного из них является атомно-абсорбционный способ исследования кальция. Указанные методы налаживаются в точно работающих референтных лабораториях. К настоящему времени они предложены лишь для небольшого количества исследуемых компонентов.

3. Рутинные методы — способы исследования, характеризующиеся известным отклонением, установленным в результате оценки их надежности. Это официально утвержденные (унифицированные) методы клиничко-биохимических исследований, применяемые в повседневной практике лабораторных работ.

4. Методы с неизвестным отклонением. К этой группе относятся методы, аналитические качества которых ранее не изучались.

Для суждения о достоверности получаемой с использованнием пригодных методов исследования информации и должен систематически, изо дня в день осуществляться контроль качества (КК), который кратко и в самом общем виде можно охарактеризовать как надежность лабораторной информации о больном. Эту информацию составляют не только лабораторные результаты, но и основные све-



дения, необходимые для правильной интерпретации результатов: циркадные и другие вариации (биологические ритмы), влияние лекарств и данные о соответствующих нормальных пределах или референтных величинах. Следует заметить, что большинство этих факторов находятся вне контроля сотрудников лаборатории.

В более узком смысле слова под КК понимают оценку правильности и воспроизводимости выполнения аналитических методов.

Различают межлабораторный (внешний) и внутрिलाбораторный (внутренний) контроли качества, имеющие единую теоретическую основу.

Прежде чем излагать сущность контроля качества, необходимо расшифровать ряд критериев, определяющих в целом аналитическую пригодность метода, а именно: специфичность, точность, сходимость, воспроизводимость, правильность, избирательность и чувствительность.

Специфичность — это способность метода выявлять лишь тот компонент, для определения которого данный способ исследования предназначается. Иначе говоря, это свойство метода качественно и количественно обнаруживать одно и то же вещество. На специфичности анализа сказывается прежде всего интерференция веществ, то есть выраженное в разной степени влияние посторонних продуктов на результаты оценки содержания того или иного компонента. Примером метода с низкой специфичностью является редуктометрический способ Хагедорна — Йенсена, используемый для установления концентрации группы редуцирующих веществ, главным образом глюкозы крови. Примерами методов с высокой специфичностью могут быть ферментативные (гексокиназный и уреазный) способы определения глюкозы и мочевины в крови. Одна из задач клинической биохимии состоит в замене неспецифических методов более специфическими.

Под точностью понимается качество измерений, отражающих близость их результатов к истинному значению исследуемой величины.

Показатель сходимости (воспроизводимость в серии) дает представление о близости друг к другу результатов исследований, выполняемых в одинаковых условиях (в серии). В отличие от сходимости показатель воспроизводимости характеризует близость друг к другу результатов исследований, производимых в различных условиях (обычно во времени, месте). В целом воспроизводимость оценивается как степень разброса результатов, получаемых анализируемым методом.

Правильность — это качество измерений, отражающее близость к нулю систематических погрешностей в результатах анализа. Она показывает, насколько полученные данным методом значения отличаются от истинных. Систематическая ошибка вызывает отклонение результатов от истинного значения в одну сторону и характеризует правильность метода. Она повторяется при каждом измерении концентрации исследуемого вещества. Случайная же ошибка обуславливает разброс результатов и определяет воспроизводимость метода. Поэтому для выявления случайных ошибок используется контроль воспроизводимости, для установления систематических — контроль правильности.

Говоря о чувствительности, следует различать понятия «чувствительность» и «пределы чувствительности метода». Чувствитель-

Суть метода — это его способность выявлять наименьшее различие между двумя значениями концентрации исследуемого вещества. Она прямо пропорциональна величине отношений разности между показаниями фотометрического прибора к разности показателей измеряемых концентраций:

$$\Delta E / \Delta C,$$

где  $\Delta E$  и  $\Delta C$  — разница в величинах экстинкции и концентрации анализируемых проб. Чем больше величина этого отношения, тем выше чувствительность метода. Иными словами, чувствительность метода соответствует тому наименьшему количеству вещества, которое еще можно определить, то есть отличить от нуля. Представление о чувствительности метода можно получить по наклону калибровочной кривой.

Предел же чувствительности аналитического метода — это такая концентрация исследуемого вещества, которая соответствует наименьшему результату измерения, еще отличимому от показателей холостой пробы. Причем следует учитывать объем биологического материала, общий объем пробы, тип аппарата, на котором выполнено исследование, и диапазон линейной зависимости калибровочной кривой. Данный способ можно использовать при условии, что вытекающая из закона Бугера — Ламберта — Беера зависимость сохраняется при широких концентрациях. В качестве примера можно привести оценку чувствительности диацилмонооксидного метода установления мочевины. Для этого способа предел чувствительности составляет 1,5 мг/100 мл (объем сыворотки крови — 0,2 мл, объем проб — 5,5 мл, тип аппарата — ФЭК-М, толщина слоя кюветы — 10 мм, диапазон линейной зависимости калибровочной кривой — от 0 до 100 мг/100 мл). Чувствительность  $\Delta E / \Delta C = 0,03$ .

Дабкер (1973) помимо вышеперечисленных критериев надежности ввел еще и понятие избирательности метода. По его мнению, избирательность является полной, если каждый из определяемых компонентов измеряется по своему собственному количеству, зависящему лишь от концентрации одного этого компонента.

Еггер, Готе (1969) к аналитическим критериям метода отнесли и помехоустойчивость.

Средством контроля качества биохимических исследований является так называемый контрольный материал. Это может быть бычья, лошадиная и другие сыворотки, изготовленные производственным путем. Так, в Ставрополе выпускается сухая лиофилизированная лошадиная сыворотка, используемая для определения общего белка, глюкозы, холестерина и мочевины. Средствами контроля служат и слитые сыворотки, приготовленные в самой лаборатории. В настоящее время контрольный материал с известным по содержанию компонентом широко применяется в повседневной работе лабораторий (важно использовать сыворотку одной серии).

Практическое осуществление внутрилабораторного контроля качества воплощается в нескольких этапах.

Первый этап контроля качества проводят не менее чем за 20 дней (обычно за 20—30 дней). При этом ежедневно делают два параллельных анализа контрольной сыворотки и из результатов определений вычисляют среднюю величину. Сильно отличающиеся величины («выскочки») исключают. Затем (второй этап) из полученных усредненных значений находят среднее арифметическое  $\bar{x}$  по формуле:

$$\bar{x} = \frac{\Sigma x}{n},$$

где  $\Sigma x$  — сумма отдельных результатов исследования;  $x$  — усредненный результат ежедневного исследования;  $n$  — число определений (обычно 20).

Статистическим показателем разброса результатов относительно средней  $\bar{x}$  является стандартное отклонение  $S$ , или среднеквадратическое отклонение:

$$S = \sqrt{\frac{\Sigma (\bar{x} - x)^2}{n - 1}},$$

где  $(\bar{x} - x)$  — отклонение каждого определения от средней величины;  $\Sigma$  — знак суммирования;  $n$  — число определений.

Установить  $S$  можно также путем сравнения результатов двух параллельных определений:

$$S = \sqrt{\frac{\Sigma (d)^2}{n}},$$

где  $d$  — разница между параллельными исследованиями. Однако последний способ менее эффективен и величина  $S$ , найденная путем двойных параллельных исследований, как правило, ниже, чем та, которую получают при многократном исследовании одного и того же биологического материала.

Каракашов, Вичев (1968) установили, что если распределение результатов не является нормальным, то для получения точных данных число определений  $n$  должно быть не менее 30.

Для иллюстрации изложенного дается расчет результатов исследования в контрольном материале одного из биохимических компонентов (глюкозы) (табл. 6).

Табл. 6. Данные определения глюкозы в крови

$n$	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
$x_1$	98	102	100	101	95	105	101	99	97	100
$\bar{x} - x$	2	2	0	1	5	5	1	1	3	0
$(\bar{x} - x)^2$	4	4	0	1	25	25	1	1	9	0
$n$	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
$x_1$	103	99	98	100	102	104	101	96	99	100
$\bar{x} - x$	3	1	2	0	2	4	1	4	1	0
$(\bar{x} - x)^2$	9	1	4	0	4	16	1	16	1	0

$$\bar{x} = \frac{2000}{20} = 100,$$

$$S = \pm \sqrt{\frac{\Sigma (\bar{x} - x)^2}{n - 1}} = \pm \sqrt{\frac{122}{19}} = \pm 2,5$$

Определение величины  $S$  служит основанием для установления предела точности измерений.

$$(\bar{x} \pm 1S; \bar{x} \pm 2S; \bar{x} \pm 3S).$$

В приведенном примере  $\bar{x} \pm 1S$  составляет  $100 \pm 2,5$ ;  $\bar{x} \pm 2S$  —  $100 \pm 5$  (мг/100 мл).

Результаты статистической обработки показали, что 68,3 % всех полученных величин находятся в пределах  $\bar{x} \pm 1S$ , 95,5 % — в пределах  $\bar{x} \pm 2S$  и 99,7 % — в пределах  $\bar{x} \pm 3S$ .

Если на первом этапе рутинных биохимических исследований коэффициент вариации до  $3S$  считается хорошим, то свыше  $3S$  он расценивается как плохой.

Важно отметить, что величина  $S$  не может быть использована для сравнения воспроизводимости различных методов, поскольку она выражается в тех же единицах, что и  $\bar{x}$ , и зависит от величины  $\bar{x}$ .

Сравнение воспроизводимости методов возможно лишь с помощью коэффициента вариации  $V$  как относительного измерителя разброса результата:

$$V = \frac{S}{\bar{x}},$$

где  $V$  равен среднеквадратическому отклонению в процентах от среднего значения.

Поскольку величина  $V$  зависит от  $\bar{x}$ , коэффициент вариации следует рассчитывать отдельно для серии с нормальными и патологическими результатами. Чем меньше  $V$ , тем выше точность анализа;  $V$  при сходимости всегда бывает ниже, чем при определении воспроизводимости.

Воспроизводимость метода устанавливают по опыту хорошо работающих (референтных) лабораторий путем длительного испытания способа исследований в различных условиях.

Для определения допустимой величины коэффициента вариации (допустимые пределы ошибок — ДПО) Тонкс (1963) предложил исходить из пределов нормальных величин, считая, что не может быть четкой дифференциации между нормальными и патологическими величинами, если  $V$  выше пределов нормы в процентах от среднего значения. Формула Тонкса такова:

$$1/4 \cdot \frac{\text{Верхний предел нормы} - \text{нижний предел нормы}}{\text{средняя величина нормы}} \cdot 100.$$

Применительно к методу определения глюкозы по Хагедорну — Пенсену расчет по формуле Тонкса приобретает следующий вид:

$$1/4 \cdot \frac{120 - 80}{100} \cdot 100 = \frac{1/4 \cdot 40}{100} \cdot 100 = 10 \%$$

В системе лабораторной службы нашей страны формула Тонкса несколько изменена — вместо показателя  $1/4$  принято значение  $1/8$ .

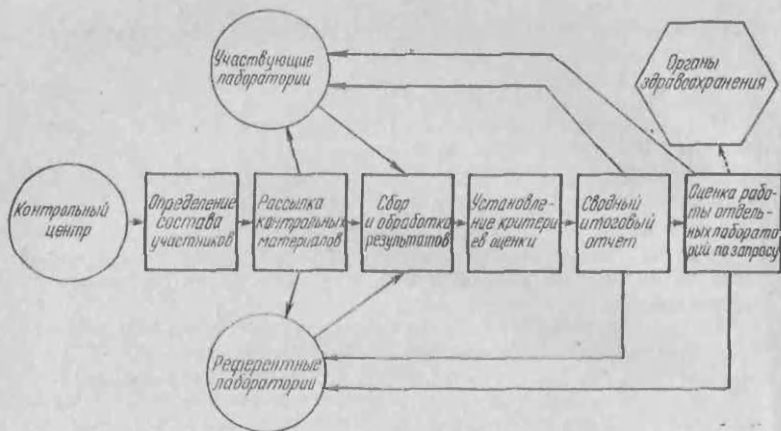


Рис. 1. Схема проведения межлабораторного контроля качества.

$$1/8 \cdot \frac{\text{(разница в диапазоне нормы)}}{\text{средняя величина нормы}} \cdot 100.$$

Для каждого вещества в референтной лаборатории выводят свой допустимый предел ошибок. Колледж американских патологов в 1970 г. рекомендовал допустимую величину коэффициента корреляции, равную  $1/8$  области нормы, но не превышающую 10 %.

Коэффициент вариации используют не только для оценки воспроизводимости метода и сравнения воспроизводимости различных методов, но и для оценки качества работы различных лабораторий (рис. 1).

После определения значений коэффициентов приступают к методике построения контрольных карт для каждого показателя. На оси абсцисс откладывают даты контрольных анализов, на оси ординат — их результаты. Параллельно оси абсцисс проводят линии, соответствующие среднему содержанию определяемого компонента и значению  $S (+1S, \pm 2S)$  среднеквадратического отклонения. Результаты анализов контрольной сыворотки наносят на карту в виде точек, обозначаемых символом х. На картах желательно также отмечать использование вновь приготовленных реактивов, изменение типов пипеток, шприцев, смену лаборантов, приборов и т. д. В зоне графика, отведенной горизонталями, соответствующими  $\pm 2S$  (доверительная вероятность 95 %), должно расположиться не менее 95 % всех полученных при исследовании контрольной сыворотки результатов. Сигналом для принятия мер служит выход точки на карте за эти пределы. В таких случаях лабораторные работники, прежде чем начать повседневные анализы проб, обязаны найти причины этого отклонения.

Контрольную карту считают правильной, если точки располагаются по обе стороны от средней линии.

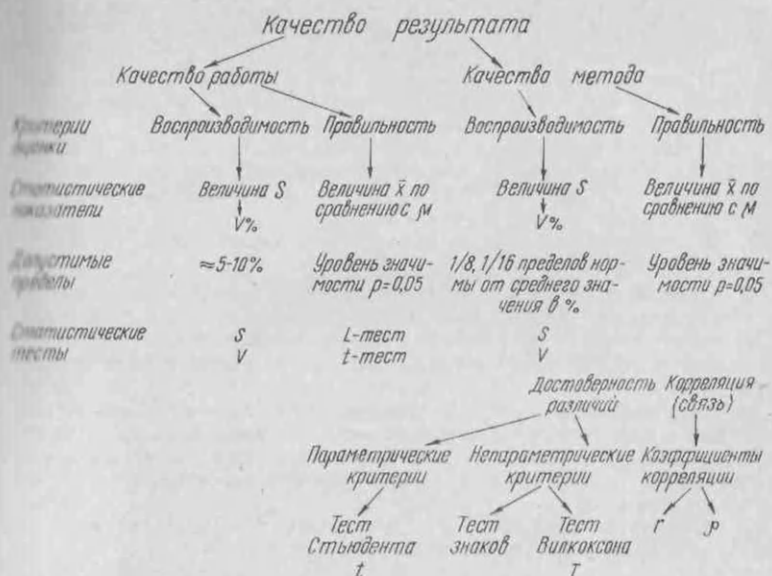


Рис. 2. Критерии оценки лабораторного исследования.

Для оценки контрольной карты используют предупредительные и контрольные критерии.

Предупредительные критерии говорят о наличии такой ошибки, при которой лабораторный анализ еще не утратил своего значения для диагностики. В случае же отклонений в результатах, соответствующих найденным контрольным критериям, анализом пользоваться нельзя.

Предупредительными считают критерии, если:

- 1) 6 значений подряд находятся по одну сторону от линии средней величины  $\bar{x}$ ;
- 2) 3 следующих друг за другом значения располагаются вне пределов  $\pm 1S$ ;
- 3) одно значение лежит вне пределов  $\pm 2S$ ;
- 4) 6 следующих друг за другом значений возрастают или понижаются.

Контрольными считают критерии, если:

- 1) 8 значений подряд находятся по одну сторону от средней арифметической;
- 2) 4—5 следующих друг за другом значений лежат вне пределов  $\pm 1S$ ;
- 3) 2—3 значения находятся вне пределов  $\pm 2S$ .

Контрольные карты используют для осуществления не только внутреннего, но и внешнего контроля качества (рис. 2).

Для оценки правильности результатов обычно применяют сыво-

ротку, содержащую определенное количество исследуемого вещества; концентрация этого вещества неизвестна исполнителю.

При определении правильности используют:

1) способ добавки — внесение в биологическую жидкость точно взвешенного количества анализируемого вещества и последующее измерение его с помощью исследуемого метода;

2) способ смешивания проб — биологические жидкости с низкой и высокой концентрацией анализируемого вещества смешивают в различных соотношениях; этот способ может применяться в методах определения активности ферментов;

3) сравнение с методом, правильность которого уже установлена (референтный метод).

Способы добавки и смешивания проб позволяют найти систематическую ошибку метода, если таковая не связана с его низкой специфичностью. Наиболее информативным является способ сравнения с методом, правильность которого определена ранее, например, с референтным.

Следовательно, смысл установления правильности результатов состоит в сравнении полученных данных с результатами правильного метода или в сопоставлении полученных данных с теоретически рассчитанными результатами при использовании способов добавки или смешивания проб.

Для статистической оценки правильности результатов рекомендуется использовать различные критерии:

$$1. \text{ Процентное отклонение от заданной величины} = \frac{\text{(заданная велич. — истинная велич.)}}{\text{заданная велич.}} \cdot 100.$$

В случае если процентное отклонение от заданной величины меньше  $3S$ , правильность результатов находится в допустимых пределах.

2. Критерий *t* Studenta:

$$t = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{\sqrt{m_1^2 + m_2^2}}$$

Следует заметить, что применение теста Стьюдента без предварительного установления частоты распределения результатов часто приводит к неправильным выводам. Если распределение результатов не является нормальным или вид распределения невозможно установить из-за малого числа наблюдений, рекомендуется использовать непараметрические критерии — критерий знаков, тест Вилкоксона, коэффициент корреляции рангов (В. В. Миньшиков, 1975, и др.) (см. п. 6).

3. Разностный метод критерия *t* Стьюдента. В каждом случае вычисляют разность между результатом определения и истинной величиной с учетом знаков. Затем получают сумму разностей с учетом знаков и среднее значение этой разности:

$$M = \frac{\text{сумма разностей}}{\text{количество исследований}}$$

Устанавливают отклонения от средней разности и возводят в квадрат, находят сумму квадратов отклонений  $\Sigma D^2$ . Рассчитывают значение средней ошибки  $m$ :

$$m = \sqrt{\frac{\Sigma D^2}{(n-1)n}}$$

Затем рассчитывают показатель существенности разницы  $t$ :

$$t = \frac{M}{m}$$

На основании величины  $t$  и числа степени свободы  $(n-1)$  по таблице Стьюдента определяют степень достоверности различий  $p$ : если показатель достоверности меньше 0,05, различие рассматриваемых результатов считают достоверным, что свидетельствует о неправильности полученных в лаборатории данных. В таком случае при  $p > 0,05$  результаты будут правильными.

4. F-тест. При применении контрольной сыворотки с известным стандартным отклонением  $\pm 2S$  рекомендуется пользоваться F-тестом:

$$F = \frac{S_2^2}{S_1^2}$$

где  $S_1^2$  и  $S_2^2$  — соответствующие средние квадратические отклонения контрольной сыворотки и результатов, полученных при анализе этой сыворотки в лаборатории. Найденное значение  $F$  сравнивают с данными таблицы для установления достоверности различий (П. Ф. Рошницкий, 1973, табл. 5,6).

5. Тест Лорда. Он позволяет достоверно определить, отклоняется ли среднее значение отдельной пробы от заданного значения или же различие является случайным. С помощью этого теста сравнивают результаты 10 параллельных исследований контрольной сыворотки со значением, приведенным в аннотации к контрольной сыворотке. Тест Лорда рассчитывают по формуле:

$$L = \frac{\bar{x} - \mu}{x_n - x_1}$$

где  $\mu$  — величина, данная в аннотации;  $\bar{x}$  — среднее значение результатов проверки по 10 определениям;  $x_n - x_1$  — разница между максимальной и минимальной величинами из 10 определений.

При вероятности ошибки, равной 5%, и при числе исследований, равном 10,  $L$  должно составлять 0,23. Если  $L > 0,23$ , то разница между средним значением 10 контрольных определений и значением, указанным в аннотации, достоверна, то есть результаты неправильны. Следовательно, при правильных результатах и при соблюдении наведенных условий  $L$  должно быть меньше 0,23.

6. Непараметрические критерии: критерии знаков и критерий Т Вилкоксона. Преимуществом непараметрических критериев является их независимость от формы распределения.

Критерий знаков выводят подсчетом числа однонаправленных эффектов в парных сравнениях. При большом числе пар критерий знаков весьма эффективен, хотя он учитывает не степень различий в каждой паре, а лишь их направленность (знак).



Оценка степени отклонения в парных сравнениях обеспечивается более сложным критерием Т Вилкоксона. Его расчет основан на следующем приеме. Вначале вычисления разности между связанными параметрами наблюдений позволяют определить ранговые номера в порядке возрастания абсолютных ее значений (без учета знака). Совпадающим наблюдениям дают ранговые номера, равные средним из их порядковых значений. Например, одинаковые разности, стоящие на 3-м и 4-м местах, получают ранг 3,5. Затем вычисляют величину Т, равную сумме ранговых номеров разности с отрицательным значением (то есть разности, противоположной наблюдаемой в большинстве опытов). В табл. Owen (1962) для числа парных наблюдений от 5 до 20 приводят максимальные значения Т, при которых различия можно считать значимыми с  $P_T = 0,01$  и  $P_T = 0,05$ .

Некоторые авторы полагают, что для оценки правильности результатов следует определять лишь характер связи между результатами исследуемого и референтного методов с расчетом коэффициента корреляции.

В последние годы (В. В. Меньшиков с соавт., 1974) появились работы, в которых для оценки правильности результатов рекомендуется устанавливать: 1) достоверность различий; 2) наличие связи между результатами исследуемого и правильного метода, поскольку, по мнению авторов, определение одной только связи с расчетом коэффициента корреляции недостаточно для оценки правильности метода.

При установлении связи часто рассчитывают обычный коэффициент корреляции (П. Ф. Рокицкий, 1973) по формуле:

$$r = \frac{\sum(x_i - \bar{x}) \cdot (y_i - \bar{y})}{\sqrt{\sum(x_i - \bar{x})^2 \cdot \sum(y_i - \bar{y})^2}},$$

где  $x$  и  $y$  — результаты сравниваемых методов. В ряде случаев применяют коэффициент корреляции рангов Спирмена:

$$\rho = 1 - \frac{6 - \sum(r_i - r'_i)^2}{n(n^2 - 1)},$$

где  $\sum(r_i - r'_i)^2$  — сумма квадратов разностей соответствующих рангов.

О тесной корреляции можно говорить только в том случае, когда  $r$  не ниже 0,9. Коэффициент корреляции ниже 0,7 указывает на слабую связь.

Таким образом, воспроизводимость и правильность результатов в целом характеризуют точность метода.

Поскольку воспроизводимость и правильность тем выше, чем меньше их количественные характеристики, документ Комитета стандартов вводит еще и такие понятия, как невозпроизводимость, разброс (величина, обратная воспроизводимости), а также отклонение от истинной величины (неправильность).

На основании изложенного следует, что всякий новый метод исследования (особенно представленный к публикации) должен быть оценен по критериям специфичности, воспроизводимости, правильности результатов, полученных одним из перечисленных методов, с расчетом достоверности различий, коэффициента корреляции и использованием регрессионного анализа (П. Ф. Рокицкий, 1973), а также чувствительности. Перечисленные критерии оценки метода дают характеристику его аналитической пригодности.

## МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ БЕЛКОВОГО ОБМЕНА

Для диагностики ряда патологических состояний, сопровождающихся нарушениями в метаболизме белков, большое значение приобрели методы определения общего белка и белковых фракций в различных биологических жидкостях. Знание величины содержания общего белка в плазме крови позволяет не только выявить синдромы гипер- и гипопротенемии, но и произвести расчет концентрации различных фракций (альбуминов, глобулинов:  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  и др.) в размерности г/л. Такой способ оценки протеинограммы дает гораздо больше информации о состоянии белкового обмена, чем обычно применяемое выражение белковых фракций в относительных процентах.

### ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОБЩЕГО БЕЛКА В СЫВОРОТКЕ (ПЛАЗМЕ) КРОВИ И ДРУГИХ БИОЛОГИЧЕСКИХ ЖИДКОСТЯХ

Все известные способы определения концентрации общего белка в сыворотке (плазме) крови подразделяют на следующие основные группы:

1) азотометрические, основывающиеся на установлении количества белкового азота (к ним относится классический метод Кьельдаля (1883) и его различные модификации);

2) способы, состоящие в определении плотности сыворотки (плазмы);

3) весовые (гравиметрические), в этих случаях белки сыворотки крови осаждают, высушивают до постоянного веса и взвешивают на аналитических весах;

4) рефрактометрические;

5) колориметрические, основывающиеся на цветных реакциях белков с определенными реактивами (из них наиболее широкое применение нашла биуретовая реакция. В методе Лоури наряду с биуретовой используют реакцию Фолина на ароматические аминокислоты, что значительно повышает чувствительность определения);

6) нефелометрические, количество белка устанавливают по степени помутнения, производимого реактивами;

7) поляриметрические;

8) спектрофотометрические, заключающиеся в измерении степени светопоглощения в ультрафиолетовой области (200—220 или 280 нм);

9) другие методы.

При использовании азотометрических способов следует исходить из того, что белки содержат в среднем 16 % азота. Поэтому полученная при определении содержания белкового азота величина умножается на 6,25 (100 : 16). Нужно иметь в виду, что в плазме крови всегда обнаруживается небелковый (остаточный) азот. К тому же фактор пересчета 6,25 является неточным, так как процент содержания азота в различных белковых молекулах колеблется от 14 до 19, что вызывает отклонение этого коэффициента в пределах от 5,3 до 8,1.

Методы, основанные на определении плотности сыворотки крови (способом падающей капли), неточны, так как плотность зависит от содержания не только белков, но и других веществ, находящихся в плазме. Рефрактометрический способ измерения концентрации общего белка также несовершенен: даже в норме часть рефракции обусловливается иными компонентами сыворотки, например минеральными веществами, углеводами. При некоторых патологических состояниях содержание указанных веществ увеличивается, что приводит к значительным ошибкам в определении (исследование желтушных и хилезных сывороток, а также сывороток больных сахарным диабетом и уремии).

Весовые методы являются весьма трудоемкими (необходимо отделить белок от небелковых веществ и идеально его обеззодить) и требуют большого количества сыворотки.

Из колориметрических способов определения уровня общего белка особого внимания заслуживают биуретовые методы, основанные на биуретовой реакции; впервые она описана в 1914 г. Сущность ее состоит в том, что в щелочной среде ионы меди образуют с белками комплексы фиолетового цвета. Для выполнения реакции разбавленный раствор белка подщелачивают, добавляют сегнетовую соль и избыток сульфата меди. Через некоторое время измеряют интенсивность окраски раствора, зависящей от содержания в нем белка. В соответствии с методом, описанным Гарнетом с соавт., содержание белка устанавливают по интенсивности светопоглощения при 540—580 нм.

В дальнейшем последовал ряд модификаций этого метода, направленных на увеличение стабильности биуретового реактива с помощью этиленгликоля, тартрата, цитрата и других реагентов.

В 1962 г. Элмиани предложил определять содержание белка биуретовым методом по измерению поглощения ультрафиолетового света с длиной волны 263 нм. Чувствительность биуретовой реакции при этом возросла в 10—15 раз в сравнении с аналогичным показателем при модификации метода, основанного на измерении светопоглощения в видимой области спектра. Итцхэки и Гилл (1964 г.) рекомендовали замерять оптическую плотность образцов при 310 нм, поскольку, как выяснилось, в присутствии значительных количеств ДНК регистрация абсорбции при 263 нм может дать значительную ошибку. Так как на биуретовую реакцию не влияет присутствие в крови ароматических аминокислот (тирозина, триптофана), фенолов, мочевой кислоты, указанный метод по праву считается самым специфичным, весьма точным и практически доступным.

Более чувствительный метод Лоурн обладает рядом существенных недостатков, обусловленных прежде всего малой специфичностью (свободные ароматические аминокислоты и некоторые иные соединения образуют с реактивом Фолина комплексы характерной окраски) и сложностью приготовления основного реагента.

Другие колориметрические методы, а также нефелометрические, поляриметрические, спектрофотометрические пока еще не получили широкого распространения в клинической лаборатории.

Таким образом, в качестве единого для использования в клинической практике выбран колориметрический биуретовый метод определения общего белка в сыворотке (плазме) крови. Отечественной промышленностью налажен выпуск наборов для исследования концентрации общего белка в сыворотке крови по биуретовой реакции.

На этом же принципе основано измерение уровня общего белка в биологических жидкостях с помощью наборов реактивов, поставляемых в нашу страну фирмой «Лаксма» (ЧССР).

### Унифицированный способ определения общего белка в сыворотке (плазме) крови

**Принцип.** Белки сыворотки (плазмы) крови, реагируя в щелочной среде с серпокислой медью, образуют соединения, окрашенные в фиолетовый цвет.

**Реактивы.** 1. Раствор хлористого натрия. 0,9 г NaCl растворяют в 100 мл дистиллированной воды.

2. 0,2 н раствор едкого натра, освобожденный от углекислого газа. 20 мл 1 н раствора NaOH доводят до объема 100 мл прокипяченной дистиллированной водой.

3. Биуретовый реактив. 4,5 г сегнетовой соли ( $KNaC_4H_4O_6$ ) растворяют в 40 мл 0,2 н NaOH. После растворения прибавляют 1,5 г  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$  и 0,5 г KJ. Раствор доводят до 100 мл 0,2 н NaOH. Его следует хранить в темном месте (или в посуде из темного стекла). Реактив пригоден около месяца.

4. 0,5 % раствор йодистого калия в 0,2 н растворе едкого натра. 0,5 г KJ растворяют в 100 мл 0,2 н NaOH. Хранить в посуде из темного стекла не более двух недель.

5. Рабочий раствор биуретового реактива. 20 мл биуретового реактива (3) смешивают с 80 мл раствора KJ (4). Хранить в темном месте не более двух недель.

6. Стандартный раствор альбумина (из человеческой или бычьей сыворотки). 1,0 г альбумина растворяют (в небольшом цилиндре или точной мерной пробирке) в 6—7 мл физиологического раствора NaCl (1) с последующим доведением им до конечного объема 10 мл. 1 мл стандартного раствора содержит 0,1 г белка (100 г/л).

**Ход определения.** К 5 мл рабочего раствора биуретового реактива добавляют, избегая образования пены, 0,1 мл сыворотки крови. Через 30 мин, самое позднее через 1 ч, пробу колориметрируют на ФЭКе в кювете с шириной слоя 10 мм при зеленом светофильтре (с максимумом пропускания 510—560 нм, лучше 546 нм). Показатели экстинкции учитывают в сравнении с таковыми контрольной пробы, которую готовят путем доливания к 5 мл рабочего раствора биуретового реактива 0,1 мл реактива 1 (практически раствор NaCl можно и не добавлять). Расчет ведут по калибровочной кривой.

Для построения калибровочного графика из основного стандартного раствора белка (реактив 6) готовят рабочие стандартные растворы, как указано в табл. 7 (0,1 мл основного стандартного раствора содержит 0,01 г белка). Из каждого разведения берут по 0,1 мл рабочего раствора и вносят в пробирки, содержащие по 5,0 мл рабочего биуретового реактива. Через 30—60 мин замеряют на ФЭКе оптическую плотность стандартных проб, учитывая экстинкцию контрольной пробы (см. ход определения).

Калибровочную кривую можно строить лишь тогда, когда будет уверенность в том, что метод достаточно налажен. При этом для каждой концентрации стандартного раствора нужно сделать не менее 3—5 (обычно 5—10) определений. Всего этим методом исследуют 2—3 серии стандартных окрашенных растворов.

Табл. 7. Данные к построению калибровочного графика для определения общего белка сыворотки крови

№ про- бирок	Стандартный раствор белка (мл)	Физиологический раствор NaCl (мл)	Содержание белка в пробе (г)	Концентрация белка (г/л)
1	0,4	0,6	0,04	40,0
2	0,6	0,4	0,06	60,0
3	0,8	0,2	0,08	80,0
4	1,0	—	0,10	100,0

При построении калибровочной кривой серию стандартных растворов обрабатывают так же, как и опытные пробы. Измерения оптической плотности стандартных растворов начинают с растворов наименьшей концентрации. Средние значения оптической плотности (соответствующие различным концентрациям) наносят на миллиметровую бумагу. На оси абсцисс (горизонтальной) с соблюдением одинаковых интервалов равномерно откладывают значения концентрации стандартных растворов белка; на оси ординат (вертикальной) — соответствующие им величины оптической плотности. Масштаб выбирают так, чтобы кривая располагалась под углом 45°. Затем хорошо отточенным карандашом наносят среднее значение экстинкции из нескольких определений и через полученные точки (а кое-где и между ними) проводят прямую линию. При этом удобно пользоваться прозрачной линейкой. Если точка значительно выходит за пределы линии, то пробы переделывают.

При оценке результатов, чтобы каждый раз не восстанавливать и не опускать перпендикуляры к оси ординат (оптической плотности) и к оси абсцисс (концентраций), составляют таблицу пересчета (градуировочную таблицу или калибровочный график), в которой напротив наиболее часто встречающихся значений экстинкций приводят соответствующие величины концентрации.

Калибровочную кривую нужно время от времени проверять. При этом не имеет смысла все точки строить заново. Достаточно взять несколько растворов известной концентрации белка и посмотреть, укладываются ли соответствующие им точки на прежней калибровочной кривой. Если это так, то кривую не переделывают.

Значения концентрации общего белка в сыворотке крови практически здоровых людей составляют: у взрослых — 65—85 г/л, у детей до 6 лет — 56—85 г/л, у новорожденных — 53—89 г/л. В норме содержание общего белка в моче равно 25—70 мг/сутки, в ликворе — 150,0—450,0 мг/л.

Примечания: 1. Описанным способом (без предварительной концентрации) белок в моче и ликворе не определяется.

2. По данным Каракашова (1968), калибровочная кривая для рассматриваемого метода показывает линейную зависимость до  $E=0,5$  (это значение экстинкции соответствует концентрации белка около 100 г/л), что совпадает с результатами других авторов. Поэтому при более высоком содержании белка сыворотку разводят пополам физиологическим раствором, берут 0,1 мл смеси и полученный результат умножают на коэффициент разведения (2).

3. Все реактивы, используемые в методике, готовят на прокипяченной дистиллированной воде.

1. Ряд соединений, сопутствующих белку, мешает его точному определению. Известно, что декстраны, находящиеся в сыворотке крови, дают сильное помутнение с биуретовым реактивом из-за образования комплексного соединения, содержащего медь. Чтобы предотвратить развитие помутнения, используются различные приемы, в том числе добавление к биуретовому реактиву мочевины (до конечной концентрации 6 моль/л), внесение в пробу 1% пропандиола, растворяющего медно-белковый комплекс.

В 1976 г. был предложен модифицированный биуретовый реактив, содержащий маннит. Последний, как и другие полигидроксисоединения (глицерин, сорбит и др.), может растворять декстран и образовывать комплексные соединения с медью. Некоторые другие соединения также способны искажать результаты исследования (трис-буфер, глицерин, сульфат аммония и др.). Присутствие в образцах большого количества липидного материала может вызывать выраженное помутнение раствора, которое устраняется встряхиванием проб с диэтиловым или петролевым эфиром и последующим центрифугированием.

### *Клинико-диагностическое значение определения общего белка*

Для оценки содержания общего белка в сыворотке (плазме) крови используют понятия: нормопротенемия (нормальное содержание общего белка), гипопротенемия (пониженная концентрация общего белка) и гиперпротенемия (его повышенное содержание).

Изменения концентрации общего белка могут иметь как абсолютный, так и относительный характер. Последний обычно наблюдается при изменении объема крови (плазмы). Так, гидремия (нагрузка водой, водное отравление) приводит к относительной гипопротенемии, дегидратация (обезвоживание) — к относительной гиперпротенемии. Дегидратация может скрыть абсолютную гипопротенемию, поскольку при данном сочетании цифры концентрации белка в плазме крови не всегда отличаются от нормы.

Для того чтобы отличить абсолютные изменения содержания белка в плазме от относительных, необходимо установить объем плазмы либо определить гематокрит. Ориентировочные данные можно получить, подсчитав количество эритроцитов и измерив уровень гемоглобина.

Наиболее частыми причинами развития гипопротенемического синдрома являются следующие состояния:

1. Недостаточное поступление белка пищи, наблюдаемое при недоедании, голодании, сужении пищевода (стриктура, опухоль), нарушении функции желудочно-кишечного тракта (вследствие ухудшения переваривания и всасывания белковых компонентов пищевых продуктов), например, при продолжительных воспалительных процессах кишечника.

По мнению А. А. Покровского, даже несбалансированный аминокислотный состав пищи может иногда приводить к гипопротенемии.

Для обеспечения нормальных процессов жизнедеятельности организм усиленно утилизирует альбуминовую фракцию белков плазмы крови. При повышенном расходе альбуминов, обуславливающих онкотическое давление крови, развиваются так называемые голодные, или кахектические, отеки. Вообще уменьшение содержания белка в плазме крови ниже 50 г/л, вызванное разными причинами, часто сопровождается гипопротенемическими отеками тканей.

2. Понижение процессов биосинтеза белка как следствие хронических паренхиматозных гепатитов, сопровождающихся выраженными цирротическими изменениями, а также интоксикаций от некото-

рых химических веществ, острых и хронических заболеваний, длительных воспалительных процессов, злокачественных новообразований, тяжелых тиреотоксикозов и т. д. Все это сказывается на подавлении протеосинтетической функции печени. Пораженные же печеночные клетки, являющиеся местом образования альбуминов, фибриногена и части глобулинов, оказываются не в состоянии синтезировать эти белки плазмы крови в достаточном количестве, в результате чего и развивается гипопротейнемия, обусловленная в основном гипоальбуминемией и гипофибриногенемией.

3. Потеря белка организмом при острых и хронических кровотечениях, резко увеличенной проницаемости капиллярных стенок (вследствие токсического их поражения, когда белки крови выходят в ткани), при кровоизлияниях, образовании обширных экссудатов, выпотов в серозные полости, отеках.

Выход белков (главным образом альбуминов) из русла крови происходит при нарушении почечного фильтра в результате органических заболеваний почек (особенно нефрозов и амилоидозов, когда белок почти всегда обнаруживается в моче), а также при ожогах.

Как уже упоминалось, альбумины и глобулины не выходят из кровяного русла равномерно — в большем количестве выделяются мелкодисперсные альбумины, поэтому уменьшение концентрации общего белка в плазме крови обуславливается главным образом гипоальбуминемией.

4. Дефектопротеинемия, то есть встречающиеся иногда у больных нарушения в синтезе белков крови, например аальбуминемия, врожденное отсутствие или недостаточное содержание церулоплазмина в плазме крови при болезни Вильсона.

5. Нередко понижение содержания белка в плазме крови отмечается у женщины в период лактации и последних месяцев беременности.

Гиперпротеинемия — явление сравнительно редкое. Кратковременная относительная гиперпротеинемия наблюдается вследствие сгущения крови из-за значительных потерь жидкости, что бывает при профузных поносах, усиленном потоотделении, неукротимой рвоте, сахарном диабете, холере, непроходимости кишечника, генерализованном перитоните, тяжелых ожогах, лишении воды.

Незначительная абсолютная гиперпротеинемия встречается при инфекционном или токсическом раздражении ретикулоэндотелиальной системы, в клетках которой синтезируются глобулины. Это отмечается, в частности, при хроническом полнартрите и других хронических воспалительных процессах.

Стойкая гиперпротеинемия (до 120 г/л и выше) бывает при миеломной болезни (плазмоцитоме), макроглобулинемии Вальденштрема, когда в плоских костях черепа появляются дополнительные очаги образования патологических белков — парапротеинов. Поэтому при больших цифрах содержания общего белка в плазме крови большого необходимо обследовать дополнительно на предмет выявления этих форм патологии.

Из сказанного следует, что гипопротейнемия связана почти всегда с гипоальбуминемией, гиперпротеинемия — с гиперглобулинемией. Абсолютного повышения количества альбуминов в сыворотке до сих пор не наблюдалось.

Важное диагностическое значение имеет выяснение количественных взаимоотношений между отдельными фракциями сыворотки кро-



Их изучение позволяет дифференцировать заболевания даже тогда, когда содержание общего белка в сыворотке оказывается неизменным.

## ИССЛЕДОВАНИЕ БЕЛКОВОГО СПЕКТРА КРОВИ

Для более глубокого изучения белкового спектра сыворотки (плазмы) крови предложены разнообразные способы фракционирования, а именно:

1. Осаждение нейтральными солями. В основе метода лежит способность отдельных белков плазмы выпадать в осадок при воздействии на них растворов солей различных концентраций. С этой целью широко используются сернокислый аммоний, сернокислый натрий, фосфорнокислый натрий. Так, хорошо известно, что полунасыщенный раствор сернокислого аммония или раствор сернокислого натрия (1,5 г/100 мл) осаждает глобулины. Этот метод разделения белков плазмы имеет значение главным образом для установления коэффициента отношения альбумины / глобулины, который, варьируя в норме в пределах от 1,5 до 2,3, может значительно изменяться при ряде патологических состояний, связанных с нарушением белкового состава плазмы.

В последние годы для осаждения белковых фракций сыворотки крови применяют смесь фосфатов. Так, при воздействии на сыворотку крови раствором фосфата (состав —  $\text{KH}_2\text{PO}_4 / \text{Na}_2\text{HPO}_4$ , соотношение 1:1) различной концентрации (1,1; 1,6; 2,0; 2,4 и 3 моль/л) при pH 5,5 соответственно осаждаются фибриноген,  $\gamma$ -,  $\beta$ -,  $\alpha$ -глобулины и альбумин. Белок в каждой из полученных фракций определяют нефелометрическим, биуретовым или другим методом.

2. Электрофоретическое фракционирование. Различают свободный и зональный (на поддерживающих средах-носителях) электрофорез. Свободный электрофорез, представленный классическим методом Тизелнуса и его модификациями, требует сложной и дорогостоящей аппаратуры, что весьма затрудняет его клиническое применение. Более широкое использование в клинической практике получают зональный электрофорез. В качестве поддерживающей среды применяют бумагу, ацетат целлюлозы, гели, а также комбинированные среды.

Электрофорез в агаровом геле, предложенный Гордоном с соавт. (1949) и во многом усовершенствованный Грабаром с соавт. (1953, 1959, 1964), позволяет получать более четкое разделение фракций, чем таковое на бумаге. Недостатками этого вида электрофореза является сложность процедуры приготовления геля и невозможность его длительного хранения в готовом виде.

Электрофорез в крахмальном геле разработан Смитис (1959) и подробно описан в работах Тодорова (1968), Э. Г. Ларского (1971) и других исследователей. Для электрофоретического фракционирования обычно используют гель, приготовленный из растворимого крахмала (15 г/100 мл).

Электрофорез в полиакриламидном геле (диск-электрофорез). По сравнению с крахмальным полиакриламидный гель обладает многими преимуществами: он более прозрачен, прочен, термостабилен и т. д. С помощью электрофореза в полиакриламидном геле можно получить до 30 белковых фракций. Существенный недостаток элек-



трофореза в полиакриламидном геле — трудность последующей точной количественной оценки полученных фракций.

Электрофорез на бумаге — исследование, проводимое в настоящее время почти во всех лабораториях нашей страны. Метод электрофореза на бумаге был введен в 50-х годах (Даррум) и с тех пор широко применяется в клинико-диагностических лабораториях.

Недостатками этого вида исследования являются не всегда четкое разделение белков из-за химической неоднородности бумаги, а также длительность процессов разделения, окрашивания, отмывания, элюции и др. Результаты фракционирования белков методом электрофореза на бумаге могут быть получены лишь на 2—3-й день.

Электрофорез на ацетате целлюлозы с каждым годом используется все более широко, вытесняя метод электрофореза на бумаге. Распространен он и за рубежом. Этот метод, предложенный Коном (1958), был модифицирован В. А. Хромовым (1976), И. А. Пушкаревым с сотр. (1977) и другими исследователями. Химическая однородность ацетата целлюлозы и одинаковый размер пор позволяют повысить четкость фракционирования образца и сократить время, необходимое для разделения белков. Для получения четкой электрофореграммы достаточно всего лишь 0,1—0,3 мкл сыворотки крови, возникающий после окрашивания фон легко смывается, абсорбция белка пленкой весьма незначительна.

3. Иммунологические методы. Они основаны на иммунных свойствах белковых фракций. Иммунизируя животных, можно получить специфические сыворотки против каждого белка. Добавление этих сывороток к исследуемой плазме вызывает специфическую преципитацию белков.

4. Иммуоэлектрофорез (иммунофорез: комбинация иммунологических методов с электрофорезом Грабара, Буртэна, 1963, и др.) для определения белков сыворотки крови применяется редко, что связано с полуколичественной оценкой результатов в этом методе. Кроме того, преципитация белков во многом зависит от вида и качества используемых сывороток (Г. Маурер, 1971).

5. Седиментационные методы, предложенные Сведбергом, основаны на различной зависимости скорости оседания белков от массы и величины их молекул. В клинической лаборатории эти методы не получили широкого распространения из-за необходимости использования дефицитной и дорогостоящей аппаратуры.

6. Осаждение белков этиловым спиртом (по Кону). Метод базируется на способности отдельных белков осаждаться спиртом различных концентраций. Чтобы избежать денатурирующего действия спирта, фракционирование проводят при низких (отрицательных) температурах. Метод имеет большое значение для получения лечебных препаратов, несмотря на то, что отличается большой трудоемкостью.

7. Хроматография с использованием ионообменных смол.

8. Фильтрация через гель. Применяя фильтрацию через гели (главным образом декстрановые — Сефадекс G-25, G-50), можно выделять различные фракции белков.

9. Другие способы.

Среди перечисленных способов разделения белков в клинико-диагностических лабораториях наиболее распространены методы электрофореза на бумаге в ацетатцеллюлозной пленке.

## Определение белковых фракций сыворотки крови методом электрофореза на бумаге

Принцип метода основан на том, что под влиянием постоянного электрического поля белки сыворотки, обладающие электрическим зарядом, движутся по смоченной буферным раствором бумаге со скоростью, зависящей от величины заряда и молекулярного веса частиц. Вследствие этого белки сыворотки крови разделяют обычно на 5 фракций: альбумины и  $\alpha_1$ -,  $\alpha_2$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - глобулины.

Существуют различные аппараты для проведения электрофореза на бумаге. Однако основные требования к приборам и процессу осуществления электрофореза общие. Наиболее важные из них следующие:

1. Источник постоянного тока должен давать постоянный ток силой 50—100 мА при напряжении 180—400 В.

2. Камера, в которой проводится электрофорез, должна отвечать следующим условиям:

а) создавать и поддерживать определенную влажность воздуха для предохранения бумаги от высыхания;

б) камеру желательно охлаждать: нагревание бумаги приводит к усиленному испарению буферного раствора в середине полосы и середине ленты, что обуславливает изменение формы пятен фракций белков после их электрофоретического разделения;

в) буферный раствор в разных отделах камеры должен иметь одинаковый уровень, чтобы избежать его перелива через ленту в результате сифонного действия;

г) концы бумажных полос нельзя погружать в буферный раствор, в котором находятся электроды. Электрическую связь между лентами и электродами устанавливают посредством фитильков из ваты, марли или бумажных полосок, смоченных буферным раствором: этим устраняется передача изменений рН буфера в то пространство, куда погружены ленты.

3. Полоса бумаги может быть расположена горизонтально (горизонтальный электрофорез) или под углом (вертикальный электрофорез). В первом случае получаются лучшие результаты. Важно, чтобы бумажная лента была хорошо натянута. Желательно, чтобы соединяющий обе ванны мостик имел шипы для укладывания на них полосок. Это предотвращает образование тонкого капиллярного слоя буферного раствора между полоской фильтровальной (хроматографической) бумаги и пластиной; капиллярный слой буферного раствора в значительной мере ухудшает качество электрофоретического разделения.

4. Большое значение имеют также свойства фильтровальной бумаги. Она должна быть однородной и плотной (хроматографической).

В качестве носителя чаще всего используют фильтровальную бумагу марки «хроматографическая быстрая» или «хроматографическая медленная». Избранный сорт нельзя менять, так как полученные результаты в определенной степени зависят от этого обстоятельства. Если электрофореграмму обрабатывают денситометром, то рекомендуют быстро впитывающий сорт, в остальных случаях предпочтительнее пользоваться бумагой для медленного впитывания (марки «М»). Бумага марки «М» имеет гладкую лицевую и рубчатую обратную стороны. При внимательном рассмотрении обратной стороны можно

заметить грубые и крупные штрихи, идущие параллельно более длинной стороне листа. Эти штрихи отражают ход волокон целлюлозы. Бумажные полоски, применяемые для электрофореза, размером 35×40 см или других соотношений нарезают таким образом, чтобы волокна целлюлозы шли вдоль полосок. Благодаря этому каждая полоска бумаги представляет собой систему продольно идущих капилляров, что способствует продвижению белков (и других веществ) и препятствует их растеканию к краям полоски. Кроме того, расщепляемая лента, в отличие от таковой с поперечным ходом волокон целлюлозы, меньше деформируется при увлажнении и высыхании. На одном из концов каждой полоски простым карандашом отмечают номер анализа и дату забора крови для исследования.

Направление хода волокон целлюлозы в бумаге можно определить и по растеканию на ней капли воды, принимающей форму эллипса, длинник которого и соответствует распространению волокон целлюлозы.

5. Перед электрофорезом камеру устанавливают строго горизонтально (при помощи вмонтированных в ее дно вращающихся винтов). Пластинки с электродами от камеры отсоединяют. Кюветы прибора заполняют буферным раствором таким образом, чтобы уровень жидкости в них был одинаков, и оба отделения каждой кюветы соединяют друг с другом полоской фильтровальной бумаги. Укрепляют пластинки с электродами. На мостик, связывающий обе кюветы, помещают полоски хроматографической бумаги. Необходимо, чтобы концы бумажных полос оказались погруженными в буферный раствор, во внутренние отделения электродных кювет. Затем прибор закрывают крышкой и дают бумажным полосам пропитаться буферным раствором, после этого крышку снова снимают и на заранее отмеченные у катода участки бумаги наносят сыворотку (иногда на расстоянии 2 см от середины полоски в сторону катода). Этот метод пропитывания бумаги буферным раствором дает хорошие результаты электрофоретического разделения белков сыворотки крови. Однако на практике в целях экономии времени ленты обычно смачивают в буфере и слегка высушивают, отжимая их между листами фильтровальной бумаги.

6. На узкий край шлифовального стекла (покровного, предметного) или полоски отмытой рентгеновской пленки наносят из 0,1-миллилитровой микропипетки 0,01 мл свежеполученной (негемолизированной) сыворотки. Аппликатор приставляют нижним ребром к увлажненной бумаге и после впитывания сыворотки — отнимают. Нужно следить за тем, чтобы между боковыми гранями аппликатора и краями полос оставался промежуток шириной 5—6 мм.

Наносить сыворотку на бумагу можно и непосредственно из пипетки таким образом, чтобы след сыворотки составил поперечную (по отношению к длиннику бумаги) полоску. В том и другом случаях нужно соблюдать следующие правила: если используют микропипетку на 0,1 мл, в нее насыпают сыворотку до метки 0,085. Пипетку зажимают между пальцами в вертикальном положении, причем верхнее ее отверстие не следует закрывать пальцем. Небольшое количество сыворотки, находящееся в пипетке, не вытекает из нее, так как жидкость удерживается капиллярными силами. Слегка касаясь бумаги нижним краем пипетки, перемещают ее назад и вперед по бумажной полосе в поперечном направлении (не доводя пипетку на 2 мм до каждого края), пока мениск сыворотки не опустится

до метки 0,095. Удобно пользоваться и автоматической микропипеткой.

Допустимо окрашивание сыворотки перед ее нанесением на полосу хроматографической бумаги. Для этого к 0,5 мл сыворотки добавляют несколько крупинок (проще всего на кончике стеклянной иглы) порошка бромфенолового синего. По перемещению пятна красителя, связывающегося прежде всего с альбуминами, можно визуальнo следить за миграцией пятен.

Затем крышку камеры плотно закрывают, включают прибор и через бумажные полоски начинают пропускать постоянный электрический ток.

7. Электрофоретическое разделение белков сыворотки крови осуществляют при комнатной температуре и градиенте потенциала от 4 до 8 В на 1 см длины бумажной полоски. Сила тока, зависящая от величины подаваемого напряжения, разновидности и рН буферного раствора, толщины бумаги и температуры, при которой происходит электрофоретическое разделение, не должна превышать 0,1—0,3 мА на 1 см поперечного сечения бумажной полосы (плотность тока). Оптимальное время электрофореза подбирают опытным путем. Обычно оно составляет 7—12—16—20 ч.

По окончании электрофореза отключают источник постоянного тока, из камеры извлекают бумажные полоски и прикрепляют их на деревянные рамки или развешивают на стеклянные палочки. Затем бумажные полоски помещают в горячий сушильный шкаф так, чтобы они не соприкасались ни между собой, ни с металлическими стенками и деталями шкафа (это предохраняет электрофореграммы от смазывания фракций).

Ленты высушивают в шкафу при +95—105 °С в течение 10—15 мин, но не более 20—30 мин. Поскольку связывание краски белками при последующей обработке зависит от условий фиксации (температуры, времени прогревания), необходимо строго соблюдать их постоянство.

8. Для окраски электрофореграмм после фиксации сухие ленты кладут в развернутом виде на дно плоских эмалированных кювет. В процессе обработки реагентами электрофореграммы нельзя помещать друг на друга и сворачивать. Окраску белковых фракций раствором бромфенолового производят, погружая бумажные полосы на определенное время в кювету с красящим раствором.

**Реактивы.** 1. Для достижения электрофоретического фракционирования белков при приготовлении буферных растворов большое значение имеет рН, так как от этого зависит знак и величина электрического заряда молекул белков. Существенное влияние на разделение белков оказывает также ионная сила буферной смеси.

В качестве электролита (буферного раствора) чаще всего применяют вероналовый (веронал-мединаловый), веронал-ацетатный, мединаловый буферы. Реже используют боратный, фосфатный и другие буферные смеси. В последнее время для разделения белков все большее распространение получает трис-буфер, в который для улучшения его свойств нередко вносят некоторые другие компоненты.

В основном применяют следующие буферные растворы:

а) вероналовый (веронал-мединаловый) буфер с рН 8,6. Для приготовления буфера 10,32 г мединала (натриевая соль веронала) растворяют в химическом стакане емкостью 500 мл в 300 мл дистиллированной воды. После растворения мединала сюда же добавляют

1,84 г вероната и, помешивая, нагревают смесь на водяной бане до его растворения. После охлаждения (до комнатной температуры) раствор количественно полностью переносят в мерную колбу емкостью 1000 мл. Для этого химический стакан несколько раз обмывают дистиллированной водой, сливая раствор в мерную колбу. Остывший раствор доводят до метки и определяют рН;

б) веронал-ацетатный буфер с рН 8,6. В 30 мл дистиллированной воды растворяют 8,71 г вероната, 1,89 г едкого натра и 6,48 г уксуснокислого натрия. Доливают к раствору 60 мл 0,1 моль/л раствора соляной кислоты и доводят его объем дистиллированной водой до 1 л.

А. С. Циркина, Л. И. Кальпова, Н. Г. Шевченко (1969) рекомендуют свой способ приготовления веронал-ацетатного буфера с рН 8,6 ионной силы 0,1. 120 мл 0,4 н раствора NaOH, 4,0 г вероната, 1,43 мл ледяной уксусной кислоты вносят в мерную колбу емкостью 1 л, содержащую 300 мл воды, и после растворения всех ингредиентов доводят дистиллированной водой до метки;

в) некоторые авторы добивались хороших результатов, применяя в повседневной работе медиаловый буфер с рН 7,6. Для его приготовления 11,5 г медиала растворяют в 1 л воды;

г) очень хорошее разделение сыворотки (на 9 фракций) удается получить при использовании трис-буфера с рН 8,9. В 1 л дистиллированной воды растворяют 60,5 г триоксиметиламинометана (трис), 6 г этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА) и 4,6 г борной кислоты.

II. Окрашивающие реагенты. Для выявления белков электрофореграммы обычно окрашивают растворами, содержащими бромфеноловый синий, кислотный сине-черный, амидочерный 10В и другие красители:

1. Красящий раствор с водорастворимым бромфеноловым синим и сулемой: бромфеноловый синий (индикатор) — 0,5 г, сулема — 10,0 г, уксусная кислота (ледяная) — 20 мл, вода дистиллированная — 980 мл. 10 г сулемы растворяют в небольшом количестве кипящей дистиллированной воды, добавляют 20 мл ледяной уксусной кислоты и 0,5 г растертого в порошок бромфенолового синего, смесь взбалтывают, охлаждают и доводят до метки в мерной колбе на 1000 мл, после чего фильтруют; светлый раствор имеет яркий, насыщенный вишнево-красный цвет.

2. Красящий раствор с бромфеноловым синим и серноокислым цинком: а) бромфеноловый синий (индикатор) — 0,1 г, кристаллический серноокислый цинк — 50 г, уксусная кислота (ледяная) — 50 мл, вода дистиллированная — 900 мл. Способ приготовления тот же, что и для раствора 1, однако обработка электрофореграмм в нем осуществляется в течение ночи;

б) бромфеноловый синий (индикатор) — 0,5 г, кристаллический серноокислый цинк — 10 г, уксусная кислота ледяная — 20 мл, дистиллированная вода — 500 мл. Способ приготовления аналогичен описанному выше, время обработки полос — 30 мин.

3. Красящий раствор с кислотным сине-черным красителем (краска, аналогичная амидочерному 10 В): кислотный сине-черный краситель — 0,2 г, уксусная кислота (ледяная) — 100 мл, метиловый спирт — 900 мл. 0,2 г кислотного сине-черного красителя растворяют в 100 мл ледяной уксусной кислоты и доводят объем до 1000 мл

метиловым спиртом либо 0,2 г красителя растворяют в смеси 100 мл уксусной кислоты и 900 мл метилового спирта.

4. Если используют краситель амидочерный 10В, то 100 мг краски растворяют в 100 мл ледяной уксусной кислоты и добавляют 900 мл метилового спирта.

Сухие ленты выдерживают в этом красителе в течение 30 мин.

**Примечание.** Сулема, сульфат цинка и уксусная кислота необходимы в качестве фиксаторов.

Затем фореграммы обрабатывают в нескольких (обычно 3—5) сменах отмывающего раствора для удаления несвязавшейся с белком краски, пока фон лент не сделается белым, а промывная жидкость не перестанет окрашиваться в желтый цвет.

III. Растворы для отмывания электрофореграмм от не связавшейся с белком краски имеют разный состав (в зависимости от применявшегося красителя): а) при окраске бромфеноловым синим используют раствор уксусной кислоты, получаемый добавлением к 30 мл ледяной уксусной кислоты 980 мл дистиллированной или водопроводной воды;

б) амидочерный 10 В или сине-черный красители отмывают приготовленной смесью следующего состава: уксусной кислоты (ледяной) — 100 мл, фенола (расплавленного) — 40 мл, воды водопроводной — 860 мл.

Отмытые ленты высушивают на воздухе при комнатной температуре (желательно в затемненном месте, если в качестве красителя использовали бромфеноловый синий). В последнем случае для получения более интенсивной окраски фракций высушенные ленты проносят над открытой бутылкой с концентрированным раствором аммиака. Пары аммиака нейтрализуют остатки уксусной кислоты. При этом пятна белковых фракций из слабо-зеленых превращаются в ярко-синие. Сухие окрашенные электрофореграммы хранят в темноте.

Дальнейшая количественная обработка электрофореграмм состоит в извлечении краски из бумаги (элюция) с последующим измерением оптической плотности окрашенных растворов на фотоэлектрокolorиметре либо учете с помощью денситометра.

При денситометрии в проходящем свете ленты пропитывают просветляющей жидкостью. Смоченную ленту промокают между листами фильтровальной бумаги и вставляют в денситометр таким образом, чтобы против щели камеры находился неокрашенный участок. Записанная на денситометре кривая позволяет судить о числе фракций и о содержании в них белка. Для этого кривую делят на ряд участков, соответствующих отдельным фракциям. Величина площади каждого участка пропорциональна количеству краски, соединившейся с белком данной фракции. Соотношение между этими площадями вычисляют по весу вырезанных участков бумаги, определенному на горизонтальных весах. Общий вес всех участков принимают за 100 % или же за содержание общего белка в плазме в г/л и вычисляют, какой процент по отношению к нему составляет вес каждого участка (фракции).

Если денситометр снабжен планиметром, то учет результатов еще более облегчается.

Для просветления электрофореграммы перед обработкой ее на денситометре применяют следующие жидкости: а) вазелиновое мас-

ло; б) раствор  $\alpha$ -бромнафталина в вазелиновом масле (90 мл вазелинового масла смешивают с 10 мл  $\alpha$ -бромнафталина).

При элюировании определяют величину экстинкции каждой фракции и общую сумму экстинкций, которую принимают за 100 % (выражая результаты в относительных процентах) или же за величину содержания общего белка (если результаты содержания отдельных белковых фракций хотят выразить в абсолютных единицах).

Сухие электрофореграммы разрезают по числу фракций, ориентируясь на самый светлый участок между ними. Каждую фракцию помещают в отдельную пробирку и заливают 3 мл элюирующего раствора. К альбуминовой фракции добавляют 9 мл этого раствора, на основании чего величину оптической плотности первой пробирки умножают на 3. Можно в каждую пробирку вносить и по 5 мл элюирующего раствора. Контролем служит участок фореграмм, не содержащий белка. Пробирки осторожно встряхивают и оставляют в затемненном месте на 30 мин (лучше на 40 мин — 1 ч). Определение плотности испытуемых растворов производят на фотоэлектроколориметре любого типа с зеленым светофильтром. В контрольные кюветы наливают элюирующий раствор, по которому устанавливают нулевое положение гальванометра.

Растворы для элюции краски из окрашенных электрофореграмм (экстрагирующие растворы) имеют следующий состав: а) для извлечения бромфенолового синего применяют 0,01 н раствор едкого натра (допускается его приготовление путем внесения 0,4 г NaOH в 1000 мл дистиллированной воды). Лучше использовать раствор карбоната натрия ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , 5 г / 100 мл), так как в нем окраска более устойчива, чем в растворе едкого натра;

б) для извлечения кислотного сине-черного красителя применяют 0,1 н раствор едкого натра.

Определение процентного соотношения белковых фракций методом элюирования с последующим фотометрированием считается более точным, чем проведение его с помощью денситометра.

Расчет производят следующим образом. Сумму цифр оптических плотностей принимают за 100 %, тогда каждая фракция составит  $x$  от 100.

**Пример.** Оптическая плотность ( $E$ ) фракции альбуминов — 0,52, глобулинов:  $\alpha_1$ —0,02,  $\alpha_2$ —0,05,  $\beta$ —0,10,  $\gamma$ —0,15, в сумме она равна 0,84 (100 %), тогда 0,52 от 100 составит  $x$ ,  $x = (0,52 \cdot 100) / 0,84 = 61,9(\%)$ . Следовательно, содержание альбуминов равно 61,9 %. Подобным же образом рассчитывают процентное содержание всех остальных фракций. Полученные результаты выражают в относительных процентах.

Нужно отметить, что более правильно представлять результаты не в относительных, а в абсолютных единицах. К этому можно прийти, если сумму экстинкций всех фракций отнести к концентрации общего белка сыворотки крови. Тогда, пользуясь аналогичным расчетом, легко найти действительную концентрацию альбуминов и всех подфракций глобулинов.

**Пример.** Общее количество белка в сыворотке крови — 82 г/л. Сумма экстинкций всех фракций — 0,84. На долю альбуминов приходится 0,52 ед. оптической плотности. Если  $E = 0,84$  соответствует 82 г/л, то  $E = 0,52$  —  $x$ .

Отсюда:  $x = (82 \cdot 0,52) / 0,84 = 50,7$  (г/л), то есть концентрация альбуминов в сыворотке крови равна 50,7 г/л. Зная концентрацию общего белка плазмы (сыворотки) крови обследуемого, легко перевести относительные проценты в абсолютные единицы: 100—82 г/л; 61,9— $x$ , тогда  $x = (61,9 \cdot 82) / 100 = 50,7$  (г/л).



Для лучшего запоминания норм процентного содержания перечисленных глобулиновых фракций сыворотки крови рекомендуют исходить из ряда чисел:  $4 \pm 1$ ;  $8 \pm 1$ ;  $10 \pm 2$ ;  $16 \pm 4$ , где 4, 8, 10, 16 — средние величины концентрации  $\alpha_1$ -,  $\alpha_2$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -глобулинов, а числа, следующие за знаком  $\pm$  — отклонения. Для  $\alpha_1$ -глобулинов показатели процентной концентрации колеблются в пределах от 3 до 5, для остальных фракций они имеют значения 7—9; 8—12; 12—20.

У практически здоровых взрослых людей концентрация белковых фракций, выраженная в абсолютных единицах, составляет для альбуминов,  $\alpha_1$ -,  $\alpha_2$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -глобулинов соответственно: 42,0—51,0; 2,0—5,0; 1,0—7,0; 5,0—9,0; 8,0—17,0 г/л.

### Определение белковых фракций сыворотки крови методом электрофореза на ацетатцеллюлозе

Весьма перспективным является проведение электрофореза белков сыворотки крови на ацетатцеллюлозных пленках. Метод получил широкое распространение прежде всего для анализа различных высокомолекулярных веществ, мукополисахаридов, аминокислот и других биополимеров. Внедрение его в СССР долгое время тормозилось отсутствием отечественных образцов пленок из ацетатцеллюлозы. Однако несколько лет тому назад во Всесоюзном научно-исследовательском институте синтетических смол (ВНИИСС — г. Владимир) была разработана технология получения пористых ацетатных пленок для электрофореза и отлажена установка для массового их производства. Пленку выпускают в виде белых полосок длиной  $180 \pm 2$  мм, шириной  $25 \pm 1$  мм и толщиной 0,1 мм. По желанию заказчика ее габариты могут быть изменены. Упаковывают пленку сериями по 10, 25, 50 и 100 полосок в коробке.

Мембраны из ацетатцеллюлозы в качестве поддерживающей среды обладают рядом больших преимуществ перед бумагой: они прозрачны, имеют равномерную пористость, быстро и хорошо смачиваются водой, а также водными растворами различных веществ. При их использовании заметно уменьшается адсорбция белков, что практически исключает образование «хвоста» зоны альбумина; эдосмос в листках целлюлозоацетата весьма незначителен. Полоски из ацетатцеллюлозы не содержат токсических и взрывоопасных веществ, не меняют своих свойств при хранении в течение года, если относительная влажность воздуха будет составлять 50—80 %, а температура — от  $+10$  до  $50^\circ$ . Замена ими бумажных полос позволяет сократить время электрофоретического разделения белков сыворотки крови с 7—20 ч до 60—80 мин. Нанесение на пленку всего лишь 0,001—0,002 мл (1—2 мкл) сыворотки крови четко выявляет фракции преальбумина, альбумина, нередко три фракции  $\alpha$ -глобулинов, часто две фракции  $\beta$ -глобулинов и  $\gamma$ -глобулины (при определенных условиях разделения обнаруживается восемь фракций вместо пяти, выявляемых на бумаге). Прозрачность полос значительно облегчает количественное определение фракций методом денситометрии.

Простота и быстрота проведения анализа, использование минимальных объемов биологических жидкостей делает этот электрофоретический метод особенно удобным для изучения белкового спектра сыворотки крови.

При осуществлении электрофореза на ацетатцеллюлозных плен-



как большинство исследователей используют веронал-мединаловый, мединал-цитратный буферы с рН 8,6. В последние годы было доказано преимущество применения для этой цели трис-буфера, обеспечивающего более четкое разделение фракций.

Согласно методике Уилкинсона (1968), процесс подготовки ацетатцеллюлозной пленки к электрофоретическому разделению исследуемых смесей заключается в том, что в середине каждой ленты (размером  $10 \times 2,5$  см) мягким карандашом проводят поперечную линию, служащую отметкой для нанесения образца (эта отметка должна быть сделана на полосках прежде, чем они будут смочены раствором). Затем ленты помещают на поверхность веронал-мединалового буфера (рН 8,6; 0,07 моль/л) для удаления воздуха из пор мембраны. Слишком быстрое погружение полосок в буфер приводит к тому, что пузырьки воздуха задерживаются в порах. Избыток буфера затем удаляют, а полоски промокают фильтровальной бумагой. После этого их располагают в заранее заполненном буферным раствором приборе. Для нанесения сыворотки на ацетатцеллюлозную пленку используют как аппликаторы, так и специальные микропипетки.

Условия проведения электрофореза отчасти зависят от типа применяемой аппаратуры. Электрофоретическое разделение на отечественных приборах типа ЭФПА-250-0,05 и ЭПАУ-20-50 проводят в течение 20 мин при напряжении 150 В и силе тока 0,4 мА на 1 см поперечника полосы ацетатцеллюлозной пленки. Как правило, электрофорез на ацетилцеллюлозе осуществляют при градиенте потенциала 15 В/см и плотности тока до 0,5 мА/см.

Для окраски ацетатцеллюлозных электрофореграмм чаще всего используют нигрозин, амидочерный 10 В, азокармин, бромфеноловый синий. Трудность выбора красителя заключается в различной способности индикаторов к связыванию с отдельными белковыми фракциями. Большинство окрашивающих реагентов имеет сродство с альбуминами. Многие авторы отдают предпочтение пунцовому С (Ponceau S) индикатору, приобретающему при рН 10 красную, а при рН 12,5 пурпурную окраску. Обычно раствор этого красителя готовят на трихлоруксусной кислоте или в смеси трихлоруксусной и сульфосалициловой кислот. Учитывая дефицитность пунцового С, сотрудники Всесоюзного научно-методического и контрольного центра по лабораторному делу (1978) провели сравнительное исследование электрофореграмм, окрашенных упомянутым красителем и бромфеноловым синим. При этом они получили совпадающие результаты. Подтверждено, что бромфеноловый синий имеет большое сродство с альбумином. М. Д. Лудик с соавт. (1972) проявляли электрофореграммы за 20 мин в растворе амидочерного 10 В (0,05 г/100 мл), приготовленного на смеси из метанола, воды и уксусной кислоты (5:5:1), и затем доокрашивали их в реагенте, получаемом растворением 0,005 г нигрозина в уксусной кислоте концентрации 2,0 г/100 мл. Избыток красителя отмывали в смеси метанола, воды и уксусной кислоты (5:5:1). В. А. Храмов с соавт. (1976) для окраски электрофореграмм использовали различные красители, рецепты приготовления которых были заимствованы ими из руководства Тодорова (1968). Наиболее эффективными красителями оказались амидочерный 10 В (процесс обработки идет в течение 30 мин с последующим 2—3-часовым отмыванием электрофореграмм в растворе уксусной кислоты концентрации 5,0 г/100 мл) и нигрозин (длительность процесса — 1—2 ч с дальнейшим отмыванием образцов в течение 30 мин в растворе уксу-

ной кислоты концентрацией 20 г/л). Отмывание заметно ускоряется механическим встряхиванием кюветы с раствором красителя и ацетатцеллюлозными пленками на шуттель-аппарате.

Оценка результатов осуществляется методом денситометрии или флориметрически — после элюирования отдельных фракций белков 0,1 н раствором NaOH.

Наряду с отечественным денситометром типа БИАН-170 можно использовать денситометры зарубежных фирм, например ER1-65 (ГДР). Последний позволяет производить запись как в прямом, так и в отраженном свете.

После апробации различных модификаций способа электрофоретического фракционирования белков на ацетатцеллюлозе мы предлагаем достаточно простой и доступный для широкого использования в клинике метод электрофореза, позволяющий быстро достичь четкого разделения белков на пять хорошо известных фракций (альбумины,  $\alpha_1$ -,  $\alpha_2$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -глобулины).

#### Методика электрофоретического исследования белков сыворотки крови на пленках из ацетатцеллюлозы

Принцип метода основан на электрофоретическом разделении белков сыворотки крови на пленках из ацетатцеллюлозы с последующим фотометрическим определением белковых фракций.

**Реактивы.** 1. Мединал-вероналовый буфер, рН 8,6. Готовят из расчета 10,32 г мединала (натриевой соли веронала, диэтилбарбитурата натрия) и 1,84 г веронала на 1 л дистиллированной воды (см. подраздел «Определение белковых фракций сыворотки крови методом электрофореза на бумаге» — Приготовление буферных растворов).

На практике хорошо оправдал себя такой способ приготовления барбитуратного буфера. В большую круглую плоскодонную колбу (на 6—7 л) вносят 51,5 г мединала, 9,2 г веронала, а затем осторожно вливают 5 л дистиллированной воды комнатной температуры (нагревание воды необязательно). Полное растворение барбитуратов происходит при периодическом помешивании буферной смеси в течение 3 ч. Достижение нужного значения рН во многом зависит от точности взвешивания навесок мединала и веронала.

2. Краситель — раствор индикатора амидочерный 10 В в смеси этанол-уксусная кислота.

Для приготовления раствора красителя используют как отечественный, так и импортный (венгерский, фирмы «Реанал») препарат. В первом случае необходимо брать 0,5 г, во втором — 0,2 г амидочерного 10 В на 100 мл смеси. Отечественный краситель создает темно-коричневое, импортный — темно-синее окрашивание белковых фракций. Мы использовали индикатор фирмы «Реанал». Для получения раствора красителя в объеме 1 л 2 г реактива вносят в смесь, состоящую из 9 частей (900 мл) 96° этанола и 1 части (100 мл) концентрированной (ледяной или обычной, 98 г/100 мл) уксусной кислоты. Смесь готовят в мерном (на 1 л) цилиндре, затем переливают раствор в соответствующего объема колбу. После внесения индикатора краситель «созревает» в течение одних-двух суток. Однако пользоваться им рекомендуется спустя 10—14 дней — во избежание скручивания в нем полос. Краситель сохраняет стойкость на протяжении до 1,5 мес (при комнатной температуре, в темноте).

3. Отмывающий раствор — уксусная кислота концентрацией 4 г/100 мл.

**Ход определения.** После заполнения специально приспособленных для электрофореза на ацетатцеллюлозе камер стандартного (типа ЭФПА-250-0,05 и др.) или любого иного прибора буферным раствором полоски ацетатцеллюлозы смачивают буфером, осторожно погружая их в буферную смесь (на 5 мин). Избыток влаги из лент удаляют фильтровальной бумагой. Затем полоски туго натягивают (они не должны провисать) и закрепляют в электрофоретической камере. Последнюю закрывают крышкой, через ленты в течение 5 мин пропускают ток при градиенте потенциала 10—12 В/см (см. подраздел «Определение белковых фракций методом электрофореза на бумаге» — Условия проведения электрофореза). После отключения камеры на поверхность ацетатцеллюлозной пленки наносят образец в объеме 4—5 мкл (для этой цели удобно использовать либо микропипетки на 10 мкл (0,01 мл), входящие в комплект чешских наборов фирмы «Лаксма» для определения мочевины, либо специальные аппликаторы). Нанесение сыворотки производят в соответствии с изложенными (в подразделе «Определение белковых фракций методом электрофореза на бумаге») принципами, вдоль какого-либо ориентира или по метке, которая предварительно отмечается шариковой ручкой с мягким стержнем. Прибор включают вновь и проводят электрофоретическое разделение белков сыворотки крови около двух часов при градиенте потенциала 12 В/см и плотности тока 0,5 мА/см (конкретные условия осуществления электрофореза устанавливают опытным путем). После отключения прибора пленки вынимают и сразу же помещают их на 5—10 мин в раствор красителя. Свежеприготовленный раствор окрашивает фракции в течение нескольких минут; в дальнейшем полосы деформируются. Отмывают пленки от избытка красителя до тех пор, пока не исчезнет окраска фона, для чего используют две порции отмывающего раствора: сначала полоски на несколько минут погружают в первую порцию уксусной кислоты (ее выливают), затем на 10 мин — во вторую (эту порцию можно сохранить в колбе для последующего отмывания электрофореграмм). По завершении рассматриваемого процесса в ту же кювету наливают дистиллированную воду, где электрофореграммы при необходимости могут быть оставлены на сутки и более. Извлеченные из дистиллированной воды полоски укладывают на чистый лист фильтровальной бумаги, белковые фракции электрофореграмм вырезают и помещают в пробирки, куда вносят элюирующий раствор: в пробирку с фракцией альбумина — 8,0 мл, в остальные — по 4,0 мл. Через 20 мин содержимое пробирок переливают в кюветы ФЭКа (с толщиной слоя 5 мм) и колориметрируют при красном светофильтре (630—690 нм). Ответ выражают в относительных или абсолютных единицах (что лучше), учитывая вдвое больший объем элюата в первой пробе.

**Примечания:** сотрудники Всесоюзного научно-методического и контрольного центра по лабораторному делу предлагают: 1. Вместо веропал-мединалового использовать мединал-цитратный буфер, рН 8,6. Способ его приготовления состоит в следующем: 7,36 г мединала и 0,3 г лимонной кислоты (цитрата) растворяют в 700 мл дистиллированной воды в мерной колбе емкостью 1 л и доводят водой до метки.

2. Заменить краситель амидочерный 10 В раствором пунцового С в 5 г/100 мл растворе трихлоруксусной кислоты. При отсутствии пунцового С рекомендуют также применять раствор бромфенолового синего, приготовленный по следующей прописи: бромфенолового синего (индикатор) — 0,5 г.

удельная масса — 10,0 г. уксусной кислоты ледяной — 20,0 мл, воды дистиллированной — 980 мл.

3. Извлеченные после отключения электрофоретической камеры пленки сушить вначале на воздухе, затем в сушильном шкафу при +100 °С в течение 10 мин (следить, чтобы пленка была натянута).

4. Полученные электрофореграммы подвергать денситометрии на стандартном денситометре типа БИАИ-170.

Гертел и Жапецки (1976) при параллельном исследовании 150 образцов крови методом электрофореза на ацетатцеллюлозных пленках (с окраской пунцовым С) и методом электрофореза на бумаге выявили некоторое различие в результатах. Этот факт нужно учитывать при переходе с одного вида биохимического анализа на другой.

Показатели нормы, полученные рекомендованным нами методом, практически не отличаются от результатов, известных для метода электрофореза на бумаге.

### Диск-электрофорез

Новый этап в клинической протеинологии связан с открытием Орнстейном и Дэвисом (1959) диск-электрофореза — метода зонального электрофореза, в котором в качестве поддерживающей среды применили полиакриламидный гель (ПААГ). Впервые этот реагент был использован одновременно в двух лабораториях (Орнстейн и Дэвис, 1959; Раймонд и Вейнтрауб, 1959). Новая поддерживающая среда позволила значительно увеличить разрешающую способность электрофоретического исследования. В последующие годы (1964) авторы метода усовершенствовали его, предложив простую и удобную технику исполнения.

Метод обладает неоспоримыми преимуществами — это возможность стандартизации величины пор, абсолютная прозрачность геля, его эластичность, твердость, термоустойчивость, отсутствие явлений адсорбции и электроосмоса, небольшая потребность в реактивах для производства анализов, простота аппаратуры, образование предельно узкой стартовой зоны, весьма небольшие количества анализируемого биологического материала (1—100 мкг), часто отсутствие необходимости в предварительном концентрировании разбавленных растворов веществ, подлежащих разделению, быстрота разделения (30—60 мин), высокая разрешающая способность и простота исследования (белков, ферментов, нуклеиновых кислот и других метаболитов). Поэтому число исследователей, использующих в своей работе данный метод для фракционирования различных белковых смесей, возрастает.

Для получения геля применяют смесь двух веществ — собственно акриламида ( $\text{H}_2\text{C}=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}_2$ ) и N, N'-метиленабисакриламида ( $\text{H}_2\text{C}=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}=\text{CH}_2$ ). В зависимости от соотношения этих соединений получают полимеры с различной частотой и размерами пор. Размеры пор определяет количество N, N'-метиленабисакриламида в реакционной смеси, поскольку он содержит так называемые поперечные метиленовые мостики, от количества которых зависит в конечном счете и диаметр пор геля.

При диск-электрофорезе значения рН и размеры пор неодинаковы в разных частях колонки, благодаря чему возникает эффект концентрирования: в верхней (например, «кислой») части колонки вещества собираются в резко ограниченной зоне, в нижней они разделя-

ются. Верхняя часть геля с крупными порами, через которые вещества проходят беспрепятственно, называется концентрирующим гелем, нижняя часть с мелкими порами — разделяющим. Благодаря эффекту концентрирования диск-электрофорезу можно подвергать такие разбавленные белковые растворы, как спинномозговая жидкость и др.

Таким образом, разделение веществ этим способом основано на сочетании эффекта концентрирования и эффекта молекулярного сита.

Особый интерес представляет метод диск-электрофореза для разделения белков сыворотки крови, так как благодаря его высокой разрешающей способности создается возможность качественной и количественной оценки значительно большего числа фракций, чем то, которое выявляется при электрофорезе на других носителях. А это, в свою очередь, формирует предпосылки для установления генетических типов белковых фракций сыворотки крови. Различные модификации методики Дэвиса (1964) и Орнштейна (1964) позволяют регистрировать от 20—25 до 40 фракций.

Подробное описание метода диск-электрофореза белков сыворотки крови в полиакриламидном геле приводят Маурер (1971), Э. Г. Ларский (1971), Т. Ф. Пирогова (1975), широко использовавшая разработанный ею способ автоматизированной (на ЭВМ) количественной обработки денситограмм диск-электрофореграмм.

Как справедливо отметил Л. В. Велик с соавт. (1972), при выполнении этого вида исследования прежде всего необходимо обратить внимание на генетическую связь белковой системы сыворотки крови с тем либо иным типом гаптоглобина, поскольку от решения этого вопроса зависит правильная оценка диск-электрофореграммы.

Тип Нр 1-1 гаптоглобина (Нр) представлен только одной, часто раздвоенной фракцией, следующей сразу за трансферрином — наиболее постоянной и всегда четко выделяемой фракцией белков сыворотки (плазмы) крови. Сыворотки с гаптоглобином типа Нр 2-1 содержат помимо этой еще шесть его фракций, располагающихся в катодной области посттрансферриновой зоны. Сывороточный тип Нр 2-2 не представлен отмеченными фракциями, но характеризуется пятью компонентами с подвижностью меньшей, чем таковая при сывороточном типе Нр 2-1, поэтому указанные фракции локализуются в катодной трети посттрансферриновой зоны.

Для идентификации всех выявленных дисков Эванс и Квик (1966) ввели индекс  $R_T$ , показывающий соотношение относительной подвижности данной фракции к подвижности известной и всегда имеющейся фракции трансферрина. Фельгенауэр с соавт. (1967) пользовались индексом  $R_A$ , представляющим собой относительную подвижность, рассчитанную по отношению к альбумину. К сожалению, распознавание фракций по одним лишь этим показателям требует максимальной, не всегда выполнимой стандартизации условий опытов и, главное, не учитывает генетических вариантов белков сыворотки. Поэтому для более точной идентификации отдельных белковых фракций исследователи предложили к применению специальные окраски на различные протенды. Качество выявления белковых фракций во многом зависит от природы красителя, связывающегося с белком, а также от используемого способа окрашивания.

Так, показано, что амидочерный 10 В обладает более низкой чувствительностью, чем кумаси R-250 в метаноле и кумаси R-250 в ТХУ; уровень фона при окраске кумаси R-250 в метаноле значительно вы-

ше, чем у других красителей. Амидочерный 10 В позволяет обнаруживать только одну полосу в зоне преальбуминов, в то время как кумаси R-250 в ТХУ и G-250 — две. Это обусловлено, вероятно, существованием сродства определенных белковых фракций к указанным красителям типа кумаси.

При необходимости получить быстрые (в течение 2 ч) результаты М. Ю. Васильев и В. В. Калашников (1979) рекомендуют использовать для окраски белков раствор G-250, применение которого не требует отмывки. При анализе сложных белковых смесей методом выбора является использование кумаси R-250, растворенного в ТХУ. Метод обладает высокой чувствительностью и позволяет получать результаты через сутки.

Изучение биологических жидкостей неизвестного белкового состава вызывает необходимость применить несколько методов окраски с целью выбора оптимального красителя.

Мы изучали методом диск-электрофореза состав углеводно-белковых комплексов сыворотки крови, для чего использовали реагенты, окрашивающие не белковый, а углеводный компоненты белков. При этом достигали весьма четкого разделения белковых фракций сыворотки крови.

Для выявления гликопротеидов столбики полиакриламидного геля фиксируют в течение ночи в водном растворе изонпропанола (25 г/100 мл), затем за 2 ч отмывают дистиллированной водой и погружают на 50 мин в раствор йодной кислоты концентрацией 1 г/100 мл, приготовленной в 0,2 моль/л раствора ацетата натрия. После повторного отмывания дистиллированной водой (в течение 1 ч) столбики полиакриламидного геля помещают на 50 мин в реактив Шиффа. Для приготовления указанного реактива 1,5 г фуксина растворяют в 500 мл кипящей дистиллированной воды, охлаждают до +55 °С и фильтруют. К охлажденному до +40 °С раствору добавляют 25 мл 2 н HCl и 3,75 г метабисульфита натрия, все хорошо перемешивают для ускорения растворения. Объем доводят дистиллированной водой до 500 мл. Закрыв сосуд пробкой, ставят его на 16 ч в холодильник. Затем к раствору добавляют 1,25 г активированного угля и спустя 40—60 с смесь быстро фильтруют. Приготовленный реактив хранят в холодильнике при температуре +4 °С, в котором гели выдерживаются в темноте. После этого их в течение 10 мин (лучше 3 раза по 10 мин) обрабатывают свежеприготовленным 0,5 г/100 мл раствором метабисульфита натрия и отмывают дистиллированной водой. Гели хорошо сохраняются в растворе уксусной кислоты концентрацией 7 г/100 мл.

Из индивидуальных белков сыворотки крови особый интерес представляет определение трансферрина, церулоплазмينا и гаптоглобина, для чего применяют специальные красители.

Трансферрин является специфическим переносчиком железа в плазме крови. В настоящее время с помощью различных способов электрофореза идентифицировано около 20 вариантов трансферрина. Для получения электрофореграммы трансферрина рекомендуется (Х. С. Рафиков, 1977) к 0,5 мл исследуемой сыворотки добавить 0,5 мл 1,5 г/100 мл раствора риванола (осаждающего все белки сыворотки крови, кроме иммуноглобулинов и трансферрина) и центрифугировать смесь в течение 10 мин при 3000 об/мин. Диск-электрофорез (см. подраздел «Методика диск-электрофоретического фракционирования белков сыворотки крови») надосадочной жидко-

сти проводят в 7,5 % полиакриламидном геле с концентрацией по акриламиду 7,5 г/100 мл в триглицидном буфере с рН 8,3 в течение 80—120 мин при силе тока 2—3 мА на одну колонку. Компоненты трансферрина выявляют реактивом, обычно применяемым для обнаружения пероксидазы. Каждый столбик геля инкубируют при +37 °С 2—3 ч в смеси из 8—10 мл бензидин-гваяколового раствора (его готовят из 50 мг бензидина + 135 мг гваякола + 25 мл 10 г/100 мл уксусной кислоты; реагент перед употреблением разводят дистиллированной водой в соотношении 1:5), 1 мл 0,2 моль/л ацетата натрия, 0,1 мл ммоль/л сульфата марганца и 1—2 капель перекиси водорода (концентрация 30 г/100 мл). Смесь указанного состава используют также для окрашивания компонентов белка гаптоглобина и гемоглобина. Сыворотку для электрофореза готовят общепринятым способом (см. подраздел «Методика диск-электрофоретического фракционирования белков сыворотки крови» — Нанесение проб исследуемой биологической жидкости). После процедуры разделения гели выдерживают в бензидин-гваяколовом растворе в течение 10—20 мин с последующим 2—3-кратным отмыванием их раствором уксусной кислоты концентрацией 10 г/100 мл. На прозрачном фоне геля компоненты железосодержащих белков окрашиваются в коричневый или корпчиново-красный цвет. Идентификацию вариантов трансферрина проводят на основании относительной электрофоретической подвижности трансферрина СС.

Маурер (1971) для выявления гаптоглобина рекомендует пользоваться смесью, которую готовят следующим образом: к 0,2 г бензидина добавляют 0,5 мл ледяной уксусной кислоты и 100 мл дистиллированной воды, после тщательного перемешивания раствора в него вносят 0,2 мл 30 г/100 мл  $H_2O_2$ . При инкубации в течение 30 мин образуются синие полосы, длительное выдерживание в воде превращает их в темно-коричневые.

Для определения церулоплазмينا гели инкубируют в растворе парафенилендиамина (1 г/100 мл, рН 5,7) при температуре +37 °С в течение часа.

С целью количественного учета диск-электрофореграмм белков сыворотки крови пользуются либо способом элюции связанного с белком красителя либо методом денситометрии.

Опыт нашей работы показал, что добавление в элюирующий раствор реагента, облегчающего выход связанного с белком красителя за счет частичного разрушения структуры полиакриламидного геля (додецилсульфат натрия, диметилформамид и другие), все-таки не обеспечивает полноты элюции, а сам процесс разрезания столбика геля на зоны (желательно его предварительно замораживать) не лишен возможности внесения в исследование множества погрешностей и неточностей.

Вот почему в последние годы предпочтение отдается прямому сканированию диск-электрофореграмм в проходящем монохроматическом световом потоке, хотя некоторые авторы рекомендуют фотографировать гели и лишь затем обрабатывать негативы или позитивы методом денситометрии.

Поскольку серийный выпуск микроденситометров еще не налажен, для получения денситограмм диск-электрофореграмм приспособляют микроскопметры (типа МФ-4, ИФО-451 и другие), спектрофотометры, микроскопы, а также широко распространенный в нашей стране денситометр ЕР1-65 (ГДР). В научных учреждениях исполь-



уют и специальные приборы зарубежных фирм, например Chromoscan. Денситограммы в дальнейшем подвергаются как качественной (на основании значений  $R_T$ ), так и количественной (по площадям пиков и прочим параметрам) обработке.

Т. Ф. Пирогова доказала возможность автоматизированной расшифровки денситограмм с применением ЭВМ.

Мы, как и некоторые другие авторы, всю диск-электрофореграмму разбиваем на восемь основных зон, каждой из которых соответствуют свои значения электрофоретической подвижности (табл. 8). Большинство зон включает в себя ряд отдельных белковых фракций.

Табл. 8. Наименование зон и  $R_T$  белков и гликопротеидов, разделенных методом электрофореза в ПААГ

Обозначение зон	Наименование зон	$R_T$ белков и гликопротеидов
I	Альбуминовая	2,07—1,55
II	Постальбуминовая	1,50—1,23
III	Трансферриновая	1,0
IV	Комплементарные глобулины	0,83—0,70
V	Быстрые посттрансферрины	0,65—0,50
VI	Медленные посттрансферрины	0,47—0,36
VII	Иммуноглобулины, гаптоглобины	0,24—0,12
VIII	Макроглобулиновая	0,10—0,02

Альбуминовая зона образована  $\alpha_1$ -гликопротеидом и альбумином. Постальбуминовую зону составляют  $\alpha_1$  и  $\alpha_2$ -глобулины. Трансферрин относится к быстрым  $\beta$ -глобулинам. Посттрансферриновая зона включает в себя фракции гаптоглобина, церулоплазмينا, иммуноглобулинов А и G. Этой зоне предшествуют комплементарные глобулины, представленные комплементарными белками, гаптоглобалинами. Последняя, макроглобулиновая, зона образована  $\alpha_2$ -макроглобулином,  $\beta$ -липопротеидом, иммуноглобулинами G, M.

#### Методика диск-электрофоретического фракционирования белков сыворотки крови

Принцип метода. Электрофорез в полиакриламидном геле, как и другие виды аналогичных исследований, основан на использовании неодинаковой электрофоретической подвижности различных белковых фракций. Кроме того, как уже отмечалось, гель играет роль молекулярного сита: вещества, имеющие размеры молекул большие, чем диаметр пор геля, проходят через гель, не проникая внутрь его частиц; соединения же, характеризующиеся размерами молекул, меньшими диаметра пор геля, будут проходить через гель по порам, и



поэтому их движение окажется замедленным. Благодаря своей способности избирательно адсорбировать более мелкие молекулы молекулярное сито позволяет разделять фракции с различной молекулярной массой.

**Реактивы.** Исходные реагенты: 1) 1 н соляная кислота (HCl); 2) ТРИС — трис(оксиметил)аминометан; 3) ТЕМЕД — N, N, N', N'-тетраметилэтилендиамин; 4) БИС (или МБА) — N, N'-метиленабисакриламид; 5) надсерноокислый аммоний (персульфат аммония); 6) рибофлавин; 7) сахароза; 8) уксусная кислота ледяная; 9) 1 н раствор КОН; 10) 1 моль/л раствора ортофосфорной кислоты (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>).

Все реактивы готовят на бидистиллированной или дистиллированной воде.

Схемы получения исходных растворов для полимеризации геля: раствор 1, рН 8,9: 1 н соляная кислота — 48 мл, ТРИС — 36,6 г, ТЕМЕД — 0,23 мл, вода — до 100 мл;

раствор 2: акриламид — 30,0 г, БИС — 0,8 г, вода — до 100 мл;

раствор 3: аммоний надсерноокислый (персульфат аммония) — 0,14 г, вода — до 100 мл (раствор должен храниться не более 7 дней в холодильнике);

раствор 4, рН 6,9: 1 н соляная кислота — 48 мл, ТРИС — 5,98 г, 1 моль/л H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> — 25,6 мл (по оригинальной прописи вместо раствора ортофосфорной кислоты используют ТЕМЕД в объеме 0,46 мл), вода — до 100 мл;

раствор 5: акриламид — 10,0 г, БИС — 2,5 г, вода — до 100 мл;

раствор 6: рибофлавин — 0,004 г, вода — до 100 мл;

раствор 7: сахароза — 40,0 г, вода — до 100 мл.

Растворы могут сохраняться в течение нескольких недель (до четырех месяцев в темных склянках в холодильнике при +4 °С).

**Примечание.** При приготовлении растворов, содержащих БИС (растворы 2 и 5), вначале в небольшом количестве подогретой воды растворяют БИС, затем акриламид и объем смеси доводят водой до метки, после чего раствор фильтруют.

Схема приготовления мелкопористого разделяющего геля с концентрацией по акриламиду 5 г/100 мл, рН 8,9 (смесь 1 ш): 1 объем раствора 1, 2 объема раствора 2, 1 объем бидистиллированной воды, рН 8,9. К полученной смеси добавляют равный объем раствора 3. В конечном итоге схема приобретает следующий вид: 1 объем раствора 1, 2 объема раствора 2, 1 объем бидистиллированной воды, рН 8,9, 4 объема раствора 3.

Схема приготовления крупнопористого концентрирующего геля: 1 объем раствора 2, 2 объема раствора 5, 1 объем раствора 6, 4 объема раствора 7.

Схема приготовления основного раствора для электродного буфера: ТРИС — 6,0 г, глицин — 28,8 г, вода дистиллированная — до 1000 мл, рН 8,3. Перед употреблением разбавлять в 10 раз!

Схема приготовления раствора красителя: бромфенол синий — 0,001 г, вода дистиллированная — до 100 мл.

Схема приготовления красящего раствора-фиксатора: амидочерный 10 В — 1,0 г, раствор уксусной кислоты концентрации 10 г/100 мл — до 100 мл.

Консервирующим раствором-дифференциатором является раствор уксусной кислоты концентрации 7 г/100 мл.

**Оборудование.** Для проведения аналитического диск-электрофо-

ра в полиакриламидном геле отечественной промышленностью выпускаются приборы типа ПЭФА-1 и некоторые другие.

Из импортных приборов в нашей стране широко распространены аналогично устроенные аппараты венгерской фирмы «Реанал» (модель № 69). Одним из недостатков конструкции прибора является отсутствие системы охлаждения гелей. Несмотря на это, при умелом его использовании, как правило, достигается четкое разделение белков на фракции.

Ход выполнения основных этапов диск-электрофоретического исследования белков сыворотки крови. Хранимые в холодильнике реактивы перед исследованием вынимают и выдерживают некоторое время при комнатной температуре (для их согревания). Стандартные стеклянные трубочки с отшлифованными концами укрепляют в специальной подставке согласно инструкции, прилагаемой к прибору. Далее приготавливают раствор мелкопористого геля с pH 8,9. Основные растворы (1 объем смеси 1 ш и 1 объем раствора 3) тщательно смешивают в небольшой склянке. Чтобы предотвратить образование в процессе полимеризации геля воздушных пузырьков (в значительной мере препятствующих процессу разделения), желательно удалить из основных растворов воздух, для чего можно использовать подключенный к склянке водоструйный или другой отсос.

В стеклянные трубочки пипеткой вносят по 2 мл раствора мелкопористого геля (следя за тем, чтобы в него не попали пузырьки воздуха); на поверхность этого раствора насланвают 0,2—0,3 мл дистиллированной воды или разведенного буфера. Это один из наиболее важных этапов в приготовлении геля, обеспечивающий образование ровной (за счет выравнивания менисков) его поверхности и улучшающий полимеризацию (вследствие исключения доступа кислорода, который препятствует данному процессу). Воду (разбавленный буфер) насланвают весьма осторожно, с сохранением четкой границы между ней и полимеризующейся смесью. Удобно наносить воду на поверхность раствора специальной пипеткой с ниткой, протянутой через ее канал, или пипеткой с тонко оттянутым концом; для этих целей можно приспособить небольшой шприц с присоединенной к нему тонкой полиэтиленовой трубочкой. По мере полимеризации граница между водой и смесью смазывается, и лишь после завершения процесса она снова становится четко различимой. Чтобы поверхность геля была визуально гладкой, трубки во время полимеризации нельзя перемещать. Несоблюдение предосторожностей приводит к смешиванию насланываемого раствора с раствором геля, что создает неравномерную пористость и обуславливает плохую полимеризацию геля, в результате ухудшается разрешающая способность электрофоретического исследования. Полимеризация ускоряется при освещении трубок лампой дневного света. По истечении 30—40 мин процесс завершается, о чем можно судить по слабому нагреванию стеклянных трубочек, а также по образованию хорошо различимой границы между полиакриламидным гелем и водной фазой. Быстрым движением руки осторожно с трубки с геля наслоенную жидкость (ее можно удалить из трубки и с помощью фильтровальной бумаги).

При приготовлении раствора крупнопористого (верхнего) геля удалять воздух из раствора обязательно, однако готовящуюся смесь желательно предохранять от воздействия яркого света (из-за чувствительности к нему рибофлавина). Стеклообразные трубочки ополаскивают 0,1—0,2 мл раствора мономера (для полного удаления дру-

гих компонентов) и в каждую колонку пипеткой вносят 0,2 мл раствора мономера, используемого для приготовления крупнопористого концентрирующего геля; затем уже известным способом настилают 0,1—0,2 мл (би)дистиллированной воды. Нанесение ее на поверхность смеси играет ту же роль, что и в случае формирования мелкопористого геля.

Полимеризация геля осуществляется за счет фоточувствительного катализатора рибофлавина, поэтому штатив(ы) с гелями располагают около ультрафиолетовой лампы мощностью 250—500 Вт или другого источника яркого света (фотополимеризация произойдет и при дневном свете и даже при свете лампы накаливания, но за более длительный период времени). О начале процесса образования геля свидетельствует переход флюоресцирующего желто-зеленого цвета в опаловый, а конце — резкое отделение геля от наложенной жидкости.

По завершении полимеризации верхнего слоя (на что требуется около получаса) нанесенную жидкость сливают с крупнопористого геля, а гелевые трубочки ополаскивают раствором крупнопористого мономера, ранее приготовленного для анализа.

Сформированный (объемом 0,2 мл) диск, соприкасающийся с мелкопористым гелем, производит концентрирующий эффект.

Пробы биологической жидкости (100—200 мкг белка) смешивают с раствором крупнопористого мономера таким образом, чтобы 2/3 общего объема (0,2 мл) приходилось на крупнопористый мономер. Это обеспечивает его хорошую полимеризацию. До электрофоретического разделения белков сыворотки рекомендуется также к 0,05 мл ее добавлять 0,1 мл раствора 4 и 0,55 мл раствора 7. В трубку с помощью микропипетки с оттянутым концом вносят 0,05 мл этой смеси. Мы получали хорошее разделение белков и при непосредственном внесении в колонку (трубку) 0,01 мл анализируемой сыворотки. Поскольку эта (верхняя) часть геля в дальнейшем непосредственно соприкасается с электродным буфером, на верхний слой геля настилают электродный буфер, разбавленный в 10 раз. В случае, если пробу вносят вместе с крупнопористым мономером, полимеризацию его желательно проводить при ультрафиолетовом освещении. При применении же в качестве разбавителя биологической жидкости раствора мономера с сахарозой (раствор 7) полимеризации не требуется.

К смеси сыворотки желательно (особенно в процессе отработки методики) добавлять 1 каплю красителя бромфенолового синего для наблюдения за движением белка при электрофорезе (бромфеноловый синий перемещается впереди первой фракции — преальбумина).

Период времени, в течение которого происходит полимеризация крупнопористого геля, можно использовать для подготовки аппарата к осуществлению электрофореза. Верхнюю часть прибора стыкуют с нижним буферным резервуаром, который предварительно заполняют разбавленным в 10 раз буферным раствором. Ухудшающие электрический контакт воздушные пузырьки удаляют с концов трубочек, входящих в буферный раствор нижнего резервуара, многократным, но осторожным встряхиванием раствора или иным способом (например, шприцем с иглой, заполненным электродным буфером). Осторожно приливают в верхний резервуар десятикратно разбавленный буферный раствор. Вместо внесения красителя в колонку можно добавлять 1 мл его раствора ко всему объему буфера, заливаемого в верхний резервуар. Правда, этот способ менее предпочтителен, чем

первый, поскольку он нередко приводит к загрязнению буфера, содержащегося в нижней камере.

Высококачественного электрофоретического разделения белков можно достичь в условиях охлаждения камеры. Если в конструкции прибора не предусмотрены устройства (системы) для охлаждения, аппарат помещают в холодильник. Electroды камеры присоединяют в соответствующих полюсах источника постоянного напряжения. При подключении электрофоретической камеры к прибору следует исходить из того, что белки с изоэлектрической точкой, более низкой, чем  $pI$  буферной системы, будут продвигаться от катода к аноду, а при более высоком значении  $pI$ , чем то, которое соответствует изоэлектрической точке, — от анода к катоду.

Длительность проведения электрофореза во многом зависит от природы анализируемого образца и концентрации используемого геля. О месте расположения белковых фракций и периоде времени, необходимом для осуществления электрофоретического разделения, может дать определенную информацию метка красителя, молекулы которого перемещаются с фронтом подвижных ионов.

В течение первых 15 мин электрофорез проводят при силе тока, не превышающей 2 мА на каждую отдельную трубочку (для этого нужно установить необходимое напряжение). Затем силу тока следует увеличить до 5 мА на каждую трубочку. Ток пропускают до тех пор, пока окрашенное кольцо буфера не достигнет уровня, отстоящего на 5 мм от нижнего края столбика полиакриламидного геля.

После завершения электрофореза гелевые трубочки вынимают из верхнего резервуара. Гель из стеклянных трубочек можно легко удалить, перемещая стальную иглу в промежутке между гелем и трубкой под слоем дистиллированной воды. Отделение столбика происходит за счет вводимой под давлением из присоединенного к игле шприца воды, в результате чего гель обычно легко извлекают из трубочки. Затем его погружают на 20—30 мин в раствор-фиксатор.

После окрашивания гели промывают водой и помещают на несколько суток в раствор-дифференциатор. Путем многократной смены раствора удаляют краситель, не связанный с белками. Этот процесс значительно ускоряют добавлением в пробирки с отмываемыми столбиками порошка активированного угля, в некоторых случаях (при наличии соответствующего устройства) используют электрофоретическое обесцвечивание гелей. В результате не содержащие белков зоны геля становятся прозрачными. Теперь можно перейти к оценке качественной (по электрофоретической подвижности белков относительно подвижности трансферрина, альбумина или гораздо реже — красителя) и количественной оценки электрофореграмм. Последние допустимо хранить на протяжении 1—2 месяцев в пробирках, наполненных раствором-дифференциатором. При большем сроке выдерживания в нем гелей часть связанного с белками красителя переходит в уксусную кислоту. Поэтому, если возникает необходимость длительного хранения гелей, их следует высушить при комнатной температуре на пластмассовом листе или стеклянной пластинке. В течение нескольких дней гели усыхают до тоненьких стерженьков и в таком виде могут сохраняться без изменений несколько лет. При последующем помещении их в раствор уксусной кислоты (концентрация 7 г/100 мл) гелевые стерженьки вновь восстанавливают свой первоначальный объем.

Количественные методы оценки электрофореграмм в полиакрил-

амидном геле в основном заключаются в сканировании нативных, различно обработанных гелей и отпечатков. Из всех известных способов наибольший интерес представляет тот, который основывается на использовании принципа прямой денситометрии. Это обусловлено не только высокой разрешающей способностью метода, но и тем, что при сканировании диск-электрофореграмм не нужно выполнять таких трудоемких этапов определения, как выделение отдельных белковых фракций из столбика полиакриламидного геля (что далеко не всегда осуществимо), его разрушение, элюция красителя, фотометрия раствора. При прямой денситометрии остается документальная запись (денситограмма), которая и подвергается качественной и количественной обработке.

Использование при денситометрии луча лазера (генерируемого оптическим квантовым генератором ЛГ-52-3) давало в наших исследованиях результаты, наиболее близкие к получаемым при элюировании зон фракций гликопротеидов.

Наряду с прямым денситометрированием применяется и способ фотографирования гелей. Окрашенные гелевые столбики, находящиеся в 20—30-миллилитровых стеклянных пробирках с раствором уксусной кислоты (7 г/100 мл), помещают в вертикально-наклонное (до 10—15°) положение возле матового стекла негатоскопа (Н. Н. Старостин, 1976). Наклонное положение в сторону фиксации негатоскопа обеспечивает стабильное соприкосновение гелевых столбиков со стенкой пробирки. Рамка нужного размера, ограничивающая свободное поле матового стекла негатоскопа, может быть изготовлена из полос черной бумаги. Необходимые пояснения рекомендуется отпечатать на тонкой бумаге и приклеить их к стеклу с краю от пробирок с гелевыми столбиками. В качестве фотокамеры пригоден любой аппарат с зеркальной оптической системой. Снабжение его насадочными кольцами позволяет производить съемку с расстояния не более 50 см.

### *Клинико-диагностическое значение исследования протеинограмм*

Для диагностики заболеваний внутренних органов большое значение имеет комплексная оценка изменений всех выявляемых на носителе (обычно на бумаге, ацетатцеллюлозной пленке) белковых фракций. В связи с этим принято выделять определенный для ряда патологических состояний тип электрофореграмм (протеинограмм):

1) соответствующий острым воспалительным процессам. Характеризуется значительным уменьшением содержания альбуминов и большей выраженностью фракций  $\alpha_1$ - и  $\alpha_2$ -глобулинов; в поздние стадии заболевания обычно отмечается увеличение уровня  $\gamma$ -глобулинов. Этот тип протеинограмм свойствен начальным стадиям пневмоний, острым полиартритам, экссудативному туберкулезу легких, острым инфекционным заболеваниям, сепсису, обширному инфаркту миокарда;

2) характерный для хронического воспаления. Отличается умеренным уменьшением фракции альбуминов и выраженным увеличением уровня  $\alpha_2$ -,  $\gamma$ -глобулинов. Этот тип электрофореграмм соответствует поздней стадии пневмоний, хронического туберкулеза легких, хронического эндокардита, холецистита, цистита и пиелита;

3) отражающий нарушение функции почечного фильтра. Харак-

характеризуется значительным уменьшением содержания альбуминов, повышением концентрации  $\alpha_2$ - и  $\beta$ -глобулинов при умеренном снижении уровня  $\gamma$ -глобулинов. Этот тип протеинограмм свойствен гипонатриемии или липондиому нефрозам, амилоидному нефрозу, нефритам, нефросклерозу, токсикозам беременности, терминальным стадиям туберкулеза легких, кахексиям и ряду других заболеваний;

4) соответствующий злокачественным новообразованиям. Обнаруживается резкое снижение содержания альбуминов при значительном увеличении всех глобулиновых фракций. Наиболее высокого подъема достигает уровень  $\beta$ -глобулинов. Этот тип протеинограмм сопровождает метастатические новообразования с различной локализацией первичной опухоли;

5) характерный для  $\gamma$ -глобулиновых плазмцитом. Отличается значительным уменьшением содержания альбуминов,  $\alpha_2$ - и  $\beta$ -глобулинов при увеличении концентрации  $\gamma$ -глобулинов. Он типичен для  $\gamma$ -плазмцитом, макроглобулинемии и некоторых ретикулезозов;

6) свойственный  $\beta$ -глобулиновым плазмцитомам. Обнаруживается уменьшением уровня альбуминов и большинства глобулиновых фракций. Только лишь фракция  $\beta$ -глобулинов претерпевает резкое избирательное увеличение. Данный тип электрофореграмм присущ  $\beta_1$ -плазмцитомам,  $\beta_1$ -плазмноклеточной лейкемии и макроглобулинемии Вальденштрема;

7) характерный для гепатитов. Отражает умеренное уменьшение содержания альбумина, увеличение уровня  $\gamma$ -глобулинов и менее выраженное —  $\beta$ -глобулинов. Этот тип электрофореграмм встречается при состояниях с последствиями токсического повреждения печени, гепатитах, гемолитических процессах, лейкомиях, злокачественных новообразованиях кроветворного и лимфатического аппарата, некоторых формах полиартрита, дерматозах;

8) соответствующий циррозу печени. Отмечается значительное снижение содержания альбуминов при сильном увеличении  $\gamma$ -глобулиновой фракции, основание которой (на депсптограмме) расширяется. Указанный тип протеинограмм выявляется при циррозах печени, тяжелых формах индуративного туберкулеза легких, sepsis lenta, при некоторых формах хронического полиартрита и коллагенозов;

9) характерный для механической желтухи. Отличается комплексом изменений, состоящих в уменьшении уровня альбуминов и умеренном увеличении содержания  $\alpha_2$ -,  $\beta$ - и  $\gamma$ -глобулинов. Этот тип электрофореграмм присущ обтурационной желтухе, а также желтухам, вызванным развитием рака желчевыводящих путей и головки поджелудочной железы (создается механическое препятствие оттоку желчи).

Изучение белкового спектра методом диск-электрофореза позволяет выявить закономерную связь между качественными и количественными изменениями в распределении обнаруживаемых фракций и динамикой патологического процесса. Их выраженность зависит не только от природы заболевания, но и от особенностей его проявления.

Существуют и некоторые другие классификации протеинограмм. Так, Сенектр с соавт. (1974), изучая белковый спектр в клинике нервных болезней, разделил все электрофореграммы на 5 основных типов: нормальный, трансудативный, воспалительный, дегенеративный и  $\gamma$ -тип, соответствующий определенным группам неврологических заболеваний.

Л. В. Велик (1973), применив метод диск-электрофореза в полиакриламидном геле, исследовал белки сыворотки крови у больных хроническим лейкозом. У них выявлено снижение содержания белка в зонах альбумина, трансферрина и посттрансферринов, отмечено уменьшение уровня  $\beta$ -липопротеина, гаптоглобина и иммуноглобулинов. Для больных с резким нарушением функции печени оказалось весьма характерным снижение концентрации преальбуминов, альбуминов и увеличение содержания белков, относящихся к области иммуноглобулинов и  $\beta$ -липопротеинов. К тому же в остром периоде заболевания у них снижены электрофоретическая подвижность альбуминов и преальбуминов, зафиксирован ряд дополнительных белковых фракций (особенно в зоне трансферрина и альбумина), более того, у некоторых из них отмечено отсутствие фракции преальбуминов.

Т. Ф. Пирогова (1965), применив предложенную ею автоматизированную систему обработки денситограмм диск-электрофореграмм белков, гликопротеидов и серогликоидов, нашла критерии дифференциальной диагностики печеночных и подпеченочных желтух, а также тесты, улучшающие диагностику и прогнозирование вирусного, хронического гепатитов, цирроза печени и некоторых заболеваний нервной системы, связанных с развитием опухолей головного мозга, рассеянного склероза, клещевого менингоэнцефалита.

Важно иметь в виду, что ряд авторов выявил статистически достоверную зависимость между фенотипами гаптоглобина и предрасположенностью организма человека к некоторым заболеваниям. Нами уже отмечалось, что принято различать 3 фенотипа гаптоглобина (Hr 1-1, Hr 2-2 и Hr 2-1), наследование которых определяется парой аутосомных генов с неполной доминантой. Сыворотка Hr 1-1 встречается у 12—30 %, Hr 2-1 — у 42—48 %, Hr 2-2 — у 22—46 % доноров. Установлено, что вероятность заболевания у людей с фенотипами Hr 1-1 в 4 раза большая, чем у людей с фенотипом Hr 2-2. И. К. Филиппов, Г. А. Анисенков (1973) рассматривали фенотип Hr 1-1 как генетический маркер, указывающий на повышенный риск заболевания хроническим лейкозом. Определено, что среди больных циррозом печени гомозиготный тип Hr 1-1 наблюдается значительно чаще, чем среди здоровых людей. Предполагают наличие связи между фенотипами гаптоглобина и генетической предрасположенностью к заболеваниям печени. У больных с нарушением мозгового кровообращения в известной зависимости от фенотипа гаптоглобина находится степень увеличения содержания гаптоглобина в биологических жидкостях. Так, у больных с типом Hr 2-1 отмечается большее возрастание концентрации этого гликопротеида в плазме крови, чем у больных с типом Hr 2-2 и Hr 1-1. Считают, что хорошая сохранность и воспроизводимость высушенных гелей служит предпосылкой для создания сыворотки обследованных лиц, являющейся своего рода «сывороточным удостоверением личности».

Ввиду того что количественное содержание белка в отдельных электрофоретических фракциях не обнаруживает зависимости от принадлежности протеннограммы к тому или иному типу Hr, последний при исследовании белкового спектра в клинике часто не учитывается.



## Глава IV

### ПРОБЫ КОЛЛОИДОУСТОЙЧИВОСТИ

В клиничко-диагностических лабораториях все еще широко используют методы, которые простыми коллоидными реакциями косвенно обнаруживают изменения в составе белков сыворотки крови (диспротениемические тесты). Все они основываются на изменениях, наступающих в коллоидной устойчивости сыворотки, и поэтому получили известность под названием проб коллоидной устойчивости, или проб на лабильность белков сыворотки. Поскольку нарушение коллоидной устойчивости сыворотки под действием какого-либо реактива выражается сначала коагуляцией (склеиванием), а затем флокуляцией (осаждением), коллоидно-устойчивые пробы именуют нередко коагуляционными, или флокуляционными (коллоидно-осадочными).

Коллоидно-химическая сущность флокуляционных проб не вполне ясна. Известно, что флокуляция (коагуляция, осаждение) наступает обычно: 1) при уменьшении электрического заряда коллоидных частиц; 2) при уменьшении содержания гидратационной воды в коллоидных частицах и 3) при увеличении размеров коллоидных частиц.

Коагуляцию посредством уменьшения электрического заряда частиц при действии электролитов ( $\text{CaCl}_2$  и  $\text{CdSO}_4$ ) используют в пробе Вельтмана и других. Это один из наиболее часто применяемых способов флокуляции.

Флокуляцию коллоидных растворов вследствие уменьшения сольватационной оболочки вызывают действием ацетона, алкоголя, концентрированных растворов электролитов и других.

Коагуляция, являющаяся следствием увеличения размеров коллоидных частиц, также встречается весьма часто. Она наступает при денатурации от действия солей тяжелых металлов (ртути, свинца), некоторых органических кислот (трихлоруксусной, сульфосалициловой). Сильное нагревание также приводит к денатурации белков, связанной с их изменением не только как коллоидов, но и как химических структур. Важно отметить, что лабильность сывороточных белков во многом зависит от соотношения между альбуминами (гидрофильными, защитными коллоидами) и глобулинами. Установлено, что положительный результат коллоидно-химических проб чаще всего обусловлен количественными изменениями в глобулиновых фракциях ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ) или изменением соотношения альбумины — глобулины, а именно: он связан либо с увеличением содержания глобулинов, либо с уменьшением уровня альбуминов. При не отличающихся от нормы показателях концентрации глобулинов и коэффициента альбумины / глобулины известное значение имеет возрастание содержания более грубодисперсных подфракций ( $\gamma$ -глобулинов) в глобулиновой системе.

Флокуляционные пробы производят обыкновенно с сывороткой. Плазму используют редко, а в некоторых пробах (Вельтмана) она вовсе не может быть употреблена.

#### КОАГУЛЯЦИОННАЯ ЛЕНТА ВЕЛЬТМАНА

При постановке оригинальной пробы Вельтмана (1930) из основного раствора хлористого кальция ( $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) готовят 11 разведе-



ний в следующих концентрациях: в 1-й пробирке — 0,1; во 2-й — 0,09; в 3-й — 0,08; в 4-й — 0,07; в 5-й — 0,06; в 6-й — 0,05; в 7-й — 0,04; в промежуточной между 7-й и 8-й (7 1/2) — 0,035; в 8-й — 0,03; в 9-й — 0,02; в 10-й — 0,01 г/100 мл.

**Ход определения.** В каждую пробирку вносят 0,1 мл сыворотки и 5,0 мл раствора хлористого кальция соответствующей концентрации. Пробирки помещают в кипящую водяную баню на 15 мин, после чего отмечают коагуляцию.

В норме коагуляционная лента начинается с первой и кончается 6—7-й пробирками. Как видно, эта реакция требует большого количества сыворотки, реактивов и посуды, проба занимает продолжительное время (около 30 мин).

Тейфль при разработке своей модификации реакции Вельтмана исходил из того, что непродолжительное кипячение на открытом пламени дает такие же результаты, как и 15-минутное кипячение в водяной бане по Вельтману.

В методе Тейфля используется один рабочий раствор  $\text{CaCl}_2$  (0,5 г/100 мл), а количество сыворотки составляет 0,1 мл вместо 1,1 мл (по Вельтману).

Исходя из вышеизложенного проба Вельтмана в модификации Тейфля утверждена в качестве унифицированной.

### Проба Вельтмана в модификации Тейфля

**Принцип.** Реакция основана на том, что белки сыворотки крови в результате нагревания и действия раствора хлористого кальция определенной концентрации выпадают в виде хлопьев (происходит нарушение коллоидной устойчивости).

**Реактивы.** 1. Раствор хлористого кальция ( $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) — 0,5 г/100 мл. Готовят из ампулированного либо при его отсутствии полученного из соответствующих навесок раствора кристаллического ( $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) хлористого кальция (с концентрацией 10 г/100 мл) или раствора безводного ( $\text{CaCl}_2$ ) хлорида кальция (с концентрацией 5 г/100 мл) путем их последующего разведения дистиллированной водой в 20 раз.

В качестве основного может быть использован также раствор хлористого кальция с плотностью 1,040 кг/л (последнюю определяют ареометром). Концентрацию раствора можно установить рефрактометрически (по специальным таблицам) или титрованием азотнокислым серебром.

**Ход определения.** К 4,9 мл воды прибавляют 0,1 мл сыворотки, содержимое пробирки перемешивают путем ее опрокидывания (при этом пробирку можно закрывать большим пальцем) и затем приливают 0,1 мл раствора хлористого кальция (из пипетки на 1,0 мл или капельницы, если объем каждой капли соответствует 0,05 мл). Содержимое пробирки встряхивают и нагревают над пламенем спиртовки до однократного вскипания смеси. Затем пробирку охлаждают и смотрят через нее на свет. Если хлопья в пробирке не обнаруживаются, то в нее добавляют еще 0,1 мл  $\text{CaCl}_2$  и раствор вновь нагревают до кипения. Процедуру повторяют до выпадения хлопьевидного осадка.

**Примечание.** Сыворотка для исследования должна быть свежей (хранящейся не более 24 ч от момента взятия), без следов гемолиза.

## Клинико-диагностическое значение реакции Вельтмана

Реакция коагуляции с хлористым кальцием (по Вельтману) может изменяться в двух направлениях: в сторону укорочения коагуляционной ленты или ее удлинения (см. схему).

№ проб	1	2	3	4	5	6	7	7 1/2	8	9	10	
CaCl <sub>2</sub> в мл	1,0	0,9	0,8	0,7	0,6	0,5	0,4	0,35	0,3	0,2	0,1	
	Сужение (сдвиг влево)						Расширение (сдвиг вправо)					
	←—————						—————→					
	Экссудаты, некрозы, опухоли						Норма					Фиброзы, повреждение печени, гемолиз

Главные причины, которые ведут к удлинению полосы (коагуляция, наступающая при добавлении менее 0,4 мл CaCl<sub>2</sub> или происходящая более чем в 7 пробирках), — это фиброзные и пролиферативные процессы, паренхимные повреждения печени и гемолитические состояния. Сдвиг вправо отмечается при болезни Боткина, циррозах, острой желтой атрофии печени, малярии, после переливания крови, аутогемотерапии и при многих воспалительных заболеваниях (пневмониях, плевритах, туберкулезе легких). Считают, что удлинение коагуляционной полосы обусловлено повышением содержания  $\gamma$ -глобулинов, снижающих стабильность сыворотки.

Укорочение коагуляционной полосы (коагуляция, наступающая при добавлении более 0,5 мл CaCl<sub>2</sub> или происходящая в 5 и меньшем количестве пробирок) обнаруживается при острых воспалительных и экссудативных процессах, когда увеличивается количество  $\alpha$ - и  $\beta$ -глобулинов и за счет этого повышается стабильность сыворотки (экссудативная фаза ревматизма, активный процесс туберкулеза легких, нефрозы, макроглобулинемия Вальденштрема,  $\alpha_2$ -,  $\beta$ -плазмоцитомы, злокачественные опухоли, экссудативный перитонит, некрозы, большие потери жидкости, острые инфекционные заболевания). Крайнее укорочение коагуляционной ленты (отрицательная проба) наблюдается при остром ревматизме.

## СУЛЕМОВАЯ ПРОБА

Сулемовая проба (сулемово-осадочная реакция) относится к группе реакций Таката (1925). Последняя заключается в том, что при взаимодействии раствора сулемы и карбоната натрия с сывороткой крови появляются хлопья.

Постановка этой пробы требует значительного количества сыворотки, не менее 4 пробирок и занимает продолжительное время (сутки). Поэтому ее сейчас заменяют более простой пробой по Гринстедту, которая утверждена в качестве унифицированного метода.

## Сулемовая проба (по Гринстедту)

**Принцип.** Сулема в присутствии мелкодисперсных коллоидов (белков) образует коллоидальный раствор солей ртути. Нарушение дисперсности белковых фракций сыворотки крови вызывает осаждение грубодисперсных частиц.

**Реактивы.** 1. Раствор сулемы — 0,1 г/100 мл. Готовят из кристаллической сулемы, растворяя соль в горячей дистиллированной воде.

2. Раствор хлористого натрия — 0,85 г/100 мл.

**Ход определения.** К 0,5 мл пегемоллизированной сыворотки крови добавляют 1 мл физиологического раствора и титруют раствором сулемы из микробюретки или пипетки емкостью 2 мл. Вначале раствор приливают к сыворотке по каплям в быстрой последовательности, пока не произойдет первоначальное обратимое помутнение, а затем — медленно, по каплям, до появления стойкого помутнения — так, чтобы через вертикальный слой жидкости нельзя было прочесть газетный текст (остерегаться образования пузырьков воздуха!).

Результаты сулемовой реакции выражают количеством мл раствора сулемы, пошедшего на титрование.

У здоровых людей на титрование идет 1,6—2,2 мл сулемы. Если расходуется меньшее количество раствора, реакция расценивается как положительная.

### *Клинико-диагностическое значение сулемово-осадочной реакции*

Клинико-диагностическое значение пробы вытекает из ее коллоидно-химической сущности, обусловленной изменением отношения альбумины — глобулины (вероятно, за счет абсолютного или относительного увеличения  $\beta$ - и  $\gamma$ -глобулинов — наиболее грубодисперсных фракций). Можно допустить, что положительный результат теста вызывается появлением в крови «ненормальных» белков (так называемых таката-протеинов). Положительная проба Таката сопровождается рядом патологических состояний: заболевания печени (при болезни Боткина сулемовая проба составляет около 1,0, нормализуясь в процессе выздоровления больных), хронические нефриты, нефрозы, пневмонии, туберкулез легких, миелому, инфекционные заболевания и другие. Следует помнить, что положительная реакция без повышенной температуры больного чаще всего свидетельствует о поражении печени. Положительная проба с повышением температуры больного встречается в основном при хронических инфекционных заболеваниях и является выражением неспецифического раздражения ретикулоэндотелиальной системы.

## ТИМОЛОВАЯ ПРОБА

Тимоловая проба, предложенная в 1944 г. Маклаганом, основана на определении степени помутнения смеси при взаимодействии сыворотки с насыщенным раствором тимола в вероналовом буфере.

Химическая сущность тимоловой пробы окончательно не выяснена. Многие авторы полагают, что проба становится положительной

при уменьшении содержания альбуминов и увеличении уровня  $\beta$ -,  $\gamma$ -глобулинов и связанных с  $\beta$ -глобулинами липидов (липопротеидов) в сыворотке крови. Считают, что помутнение смеси обусловлено взаимодействием коллоидных частиц тимола и некоторых крупнодисперсных белков —  $\gamma$ -глобулинов и  $\beta$ -липопротеидов. По представлению Маклагана, эта реакция вызвана образованием глобулин-тимол-липидного комплекса, содержащего 40 % глобулинов, 32 % тимола, 18 % холестерина и 10 % фосфолипидов.

Все известные к настоящему времени пробы тимолового помутнения отличаются главным образом способом приготовления буферного раствора. Если в оригинальной методике Маклагана тимол растворяют в веронал-мединаловом буфере при его нагревании (что приводит к частичному окислению тимола), то в утвержденном в качестве унифицированного методе Хуэрго и Поппера тимол предварительно растворяют в этаноле и полученный раствор добавляют к барбитуратовому буферу, приготовленному по прописи Маклагана.

### Тимоловая проба (по Хуэрго и Попперу)

**Принцип.** При взаимодействии сыворотки с тимолово-вероналовым буфером появляется мутность вследствие образования глобулин-тимол-липидного комплекса.

**Реактивы.** 1. Спиртовой раствор тимола — 10 г/100 мл. 10 г очищенного тимола растворяют в 100 мл 96° этилового спирта в мерной колбе.

Для получения очищенного тимола 100 г его вносят в 100 мл 96° этилового спирта, смесь тщательно перемешивают и фильтруют. К фильтрату прибавляют 1 л холодной дистиллированной воды, содержимое склянки сильно встряхивают и оставляют стоять на 20 мин. Затем раствор фильтруют, кристаллы, оставшиеся на фильтре, промывают два раза холодной дистиллированной водой, сушат — вначале на фильтровальной бумаге, а потом, в течение 2—3 дней, в эксикаторе над безводным хлористым кальцием до приобретения ими постоянной массы.

2. Буферный раствор — 2,76 г веронала (точно!) и 2,06 г меди-нала (веронала натрия) растворяют в 1 л дистиллированной воды. Хранить в холодном месте, при появлении осадка раствор не годен к употреблению.

3. Тимолово-вероналовый буфер. В мерной колбе на 100 мл смешивают 80 мл буферного раствора и 1,0 мл спиртового раствора тимола концентрации 10 г/100 мл, смесь встряхивают и доливают буферным раствором до метки (рН 7,55).

4. Приготовление стандартной суспензии  $\text{BaSO}_4$ : а) 0,0962 г и раствор хлористого бария. Берут 1,175 г кристаллического  $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  и растворяют в 100 мл воды в мерной колбе;

б) 0,2 г и раствор  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ;

в) суспензия  $\text{BaSO}_4$ . 3 мл 0,0962 г и раствора  $\text{BaCl}_2$  вливают в мерную колбу на 100 мл и доводят до нужного объема 0,2 н  $\text{H}_2\text{SO}_4$  при +10 °С (размеры частиц преципитированного при этой температуре  $\text{BaSO}_4$  дают относительно стабильный результат).

**Ход определения.** К 6 мл тимолово-вероналового буфера прибавляют 0,1 мл негемолизированной сыворотки, содержимое пробирки перемешивают, оставляют стоять 30 мин и затем фотометрируют при 660 нм, учитывая показание в сравнении с таковым контрольной про-

бы. В качестве последней используют 6 мл буферного раствора. Реакцию проводят при температуре +25 °С. Расчет делают по калибровочной кривой. Для ее построения из стандартной суспензии BaSO<sub>4</sub> готовят ряд разведений, которые получают разбавлением стандартной смеси 0,2 и раствором H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Найденные значения экстинкций соответствуют единицам помутнения по Shank и Haagland (S—H).

Так, оптическую плотность смеси, приготовленной из 1,35 мл стандартной суспензии и 4,65 мл 0,2 н H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, принимают за 5 ед. S—H; для 2,70 мл суспензии и 3,30 мл кислоты степень помутнения составит 10 ед., для 5,40 мл суспензии и 0,60 мл кислоты — 20 ед. S—H.

Стандартные разведения смешивают, хорошо встряхивают и тотчас фотометрируют при длине волны 660 нм (630—690 нм — красный светофильтр), используя кюветы с шириной слоя 10 мм. Контрольной пробой является соответствующий объем дистиллированной воды. По полученным данным строят калибровочную кривую.

Норма — 0—4 ед. S—H.

**Примечание.** Важным условием получения точных данных является взятие крови натощак: алиментарная гиперлипемия существенно влияет на результаты исследования. Для того чтобы освободиться от искажений, Маклаган рекомендует ставить параллельно две пробы и в одну из них добавлять две капли концентрированного раствора HCl. При этом белки растворяются (на жиры кислота не действует). В процессе последующего фотометрирования проба с кислотой служит компенсирующей жидкостью.

При постановке данного теста сыворотка необязательно должна быть свежей. Она может стоять несколько дней. По мнению некоторых авторов, умеренный гемолиз не отражается на результатах исследования.

Тимоловая проба, проводимая с использованием диагностических наборов реактивов фирмы «Лахема» (ЧССР) (они предназначаются для выполнения 150 или 300 исследований), осуществляется методом, практически ничем не отличающимся от унифицированного способа Хуэрго и Поппера (см. описание инструкции, прилагаемой к набору реактивов).

Следует отметить, что для получения более точных результатов фотометрирование (нефелометрирование) опытных и стандартных проб нужно производить в кюветках с шириной слоя не 10, а 5 мм (иначе кюветы отечественных фотоэлектродиметров окажутся заполненными неполностью, что может повлечь за собой грубую техническую ошибку определения).

Можно было бы брать вдвое большие объемы сыворотки и рабочего буферного раствора (0,1 мл и 6,0 мл соответственно) с последующим нефелометрированием суспензии в кюветках с шириной слоя 10 мм. Но в этом случае вдвое сократится общее число определений, на которое рассчитан набор реактивов.

Отличие постановки тимоловой пробы по Хуэрго и Попперу (унифицированный метод) от пробы, проводимой диагностическим набором реактивов фирмы «Лахема» (ЧССР), состоит в том, что в первом методе используют вероналовый буфер, к которому доливают раствор тимола в спирте, а во втором — трис-буфер с добавлением малеиновой кислоты в качестве стабилизатора. К тому же результаты тимоловой пробы по Хуэрго и Попперу выражаются в единицах Маклагана, а с применением набора реактивов фирмы «Лахема» (ЧССР) — в единицах помутнения (S—H).

### *Клинико-диагностическое значение тимоловой пробы*

Подобно остальным флокуляционным тестам тимоловая проба является неспецифической реакцией. Вместе с тем она гораздо более специфична для функционального исследования печени, чем другие коллоидноосадочные пробы. Считают, что проба Маклагана положительна в 90—100 % случаев болезни Боткина (уже в преджелтушной ее стадии и при безжелтушной форме), токсического гепатита. Реакция положительна у больных с постгепатитным и постнекро-

тическим, особенно желтушным, циррозом (в отличие от таковой у больных другими формами циррозов), коллагеновыми заблеланиями, малярней и вирусными инфекциями. При механической желтухе она (в 75 % случаев) отрицательна. Последнее обстоятельство имеет дифференциально-диагностическое значение.

У больных механической желтухой проба становится положительной лишь в случае, если процесс осложняется паренхиматозным гепатитом.

Для дифференциации механической желтухи от паренхиматозной большую роль играет применение тимоловой пробы с пробой Бурштейна (на  $\beta$ - и пре- $\beta$ -липопротеиды).

При паренхиматозной желтухе обе пробы положительны, при механической желтухе тимоловая проба отрицательна, проба Бурштейна — резко положительна.

Важно отметить, что, по данным И. В. Степкиной (1973), у 30 % больных, перенесших инфекционный гепатит, показатели тимоловой пробы оказываются повышенными на протяжении 6 месяцев после выписки из стационара. Отсюда следует, что тимоловую пробу, дополненную тестом определения уробилина в моче, можно использовать и в периоде диспансерного наблюдения за больными, лечившимися в стационаре по поводу болезни Боткина.

## Глава V

### ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОСТАТОЧНОГО АЗОТА И ЕГО КОМПОНЕНТОВ

Под остаточным азотом понимают небелковый азот, то есть тот азот, который остается в центрифугате (фильтрате) сыворотки крови (или другой биологической жидкости) после осаждения белков действием трихлоруксусной, фосфорномолибденовой или фосфорновольфрамовой (вольфрамовой) кислот.

В остаточноазотную фракцию входят азот мочевины, аминокислот, креатинина, креатина, мочевой кислоты и других продуктов белкового обмена (табл. 9).

Мочевина является главным компонентом остаточноазотной фракции, на ее долю приходится более 1/2 всего остаточного азота. На втором месте — аминокислоты. Разность между остаточным азотом и азотом мочевины представляет так называемый резидуальный азот. Основная фракция резидуального азота — аминокислоты.

Методы определения содержания остаточного азота в сыворотке крови делятся на две основные группы: азотометрические и гипобромитные. Для установления количественного содержания азота всех исследуемых фракций безбелковый фильтрат (центрифугат) крови подвергают минерализации при нагревании (в присутствии катализатора) с концентрированной серной кислотой, благодаря чему весь остаточный азот переходит в форму азота сернокислого аммония. После перегонки этого азота в чашках Конвея, в замкнутом пространстве которых происходит разложение аммиачных солей крепкой щелочью и связывание освобожденного аммиака титрованным раствором серной кислоты, или другим способом количество остаточного азота определяют или путем титрования (с индикатором

Табл. 9. Содержание остаточного азота и его компонентов в сыворотке крови здорового человека

Показатель	Нормальные величины	% содержания
Остаточный азот	0,20—0,40 г/л	100
Мочевина	2,50—8,33 ммоль/л	50 (46—60)
Амниоазот (азот аминокислот)	0,020—0,050 г/л	до 25
Мочевая кислота	120—240 мкмоль/л (0,12—0,24 ммоль/л)	4
Креатин	102—408 мкмоль/л (0,102—0,408 ммоль/л)	5
Креатинин	44—88 мкмоль/л (0,044—0,088 ммоль/л)	2,5—7,5
Индикан	0,87—3,13 мкмоль/л	0,5
Аммиак (цельная кровь)	17—34 мкмоль/л	—
Остальные небелковые вещества (полипептиды, нуклеотиды и другие)	—	13
Ксантопротеиновая реакция	20 усл. ед.	—

Таширо) остатка непрореагировавшей с аммиаком серной кислоты (А. А. Покровский, 1969) либо колориметрическим методом с использованием одной из трех реакций: 1) с реактивом Несслера; 2) фепилгипохлоритом; 3) нингидрином.

При взаимодействии аммиака с реактивом Несслера образуются продукты желтого цвета. Данная реакция весьма чувствительна, однако недостатком метода являются сложность приготовления реактива, его нестойкость, влияние на ход реакции множества других факторов.

В основе фенолгипохлоритного метода лежит способность аммиака вступать в реакцию с гипохлоритом, что приводит к образованию хлорамина. При реагировании последнего с фенолом получается индофеноловое соединение синего цвета. Некоторые авторы считают, что этот способ определения аммиака не особенно точен; сложным и громоздким является приготовление самого гипохлорита.

Большой чувствительностью отличается нингидриновый метод. В целях упрощения азотометрических методов установления содержания остаточного азота ряд авторов предлагает опустить этап диффузии аммиака и осуществить прямое колориметрическое определение остаточного азота (метод Асея). Правда, исключение процесса перегонки способствует возрастанию ошибки метода до 10%. Несмотря на это, данное исследование концентрации остаточного азота благодаря своей простоте широко распространено в клинко-диагно-

стических лабораториях. Метод Аселя утвержден как унифицированный.

Гипобромитные методы определения остаточного азота основаны на свойстве гипобромита разрушаться при действии на азотистые соединения безбелкового филтраты. Остаток непрореагировавшего гипобромита выявляют йодометрически: путем титрования контрольной и опытной проб тиосульфатом (гипосульфитом) (метод Раппопорта и Эйхгорна) или путем прямого колориметрического определения выделившегося в опытной и контрольной пробах йода (Нательсон, 1961; Г. Н. Сербина с соавт., 1970).

В качестве унифицированного предлагается более доступный титриметрический вариант гипобромитного метода.

## ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОСТАТОЧНОГО АЗОТА КРОВИ ГИПОБРОМИТНЫМ МЕТОДОМ (МЕТОД РАППОПОРТА — ЭЙХГОРНА)

**Принцип.** Белки сыворотки крови осаждаются. На азотистые соединения центрифугата (филтраты) воздействуют щелочным раствором гипобромита, остаток которого устанавливают йодометрически. Разность в количестве гипосульфита, пошедшего на титрование контрольной и опытной проб, выражают в мл и умножают на коэффициент пересчета, это дает концентрацию азота в г/л.

**Реактивы.** 1. Осаждающий раствор. В мерную колбу емкостью 1000 мл вливают 44,8 мл раствора вольфрамвокислого натрия концентрации 10 г/100 мл, добавляют 2 г лимоннокислого натрия и 6,4 г сернокислого натрия. Все ингредиенты растворяют приблизительно в 800 мл воды (при комнатной температуре или при нагревании в струе горячей воды), прибавляют 44,8 мл 1 н раствора серной кислоты и 2 г сернокислого кадмия ( $CdSO_4$ ), после чего доводят объем дистиллированной водой до 1000 мл.

В осадитель можно и не включать сульфат кадмия, однако результаты при этом получают менее точные, поскольку кадмий осаждает серные соединения крови, способные связывать часть брома.

При наличии в лаборатории фосфорновольфрамовой кислоты осадитель может быть приготовлен по следующей прописи: 2,5 г фосфорновольфрамовой кислоты и 2,5 г безводного сернокислого натрия растворяют в небольшом объеме воды, добавляют 2,5 мл концентрированной  $H_2SO_4$  и доводят объем дистиллированной водой до 500 мл.

2. Дезаминирующий гипобромитный раствор. Он состоит из смеси реактивов А и В.

Реактив А представлен растворами (реактивами)  $A_1$ ,  $A_2$  и  $A_3$ .

Реактив  $A_1$ : 42,25 г борной кислоты и 12,8 г  $NaOH$  вносят в 250 мл воды, смесь тщательно встряхивают, кипятят в течение 30 мин и после охлаждения доводят объем дистиллированной водой до 500 мл.

Реактив  $A_2$ : насыщенный (5 г/100 мл) раствор фтористого натрия — 5 г фтористого натрия растворяют в 100 мл горячей воды и горячий раствор фильтруют через бумажный фильтр.

Реактив  $A_3$ : раствор  $NaOH$ , 2,7 г/100 мл.

Реактив А: 250 мл раствора  $A_1$  смешивают с 150 мл раствора  $A_2$  и с 50 мл раствора  $A_3$ , то есть в соотношении 5:3:1. Смесь хорошо сохраняется. Борная кислота связывает сахар в крови, редуцирую-



щие свойства которого мешали бы опыту. В присутствии ионов борной кислоты гипобромит не влияет даже на небольшие количества глюкозы.

Реактив В: в колбе емкостью 100,0 мл, содержащей 50,0 мл воды, растворяют 2,0 г бромистого калия (КВг), прибавляют 0,8 г (0,25 мл) чистого брома (его удобно брать шприцем), смесь взбалтывают до растворения и доводят объем дистиллированной водой до 100,0 мл.

Раствор сохраняется 7, максимум 10 дней. При его приготовлении соблюдают большую осторожность, учитывая ядовитость брома. Все работы с ним следует проводить под тягой, в перчатках, фартуке, защитных очках.

При отсутствии в лаборатории чистого брома для получения реактива В может быть использована смесь бромидов калия и бромидов натрия, дающая в подкисленном растворе выделение чистого брома за счет происходящей реакции окисления — восстановления.

3,2 г КВг и 0,28 г  $\text{NaBrO}_3$  растворяют в небольшом объеме воды в мерной колбе на 100 мл, затем приливают 10 мл 1 н  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , колбу ставят на 30 мин в темное место, после чего доливают водой до метки. Реактив стоек до 1 мес. при хранении в емкости из темного стекла с притертой пробкой, смазанной вазелином.

Дезаминирующий гипобромитный раствор 2 следует готовить непосредственно перед опытом, смешивая 9 частей реактива А и 1 часть реактива В.

3. 0,005 н раствор гипосульфита натрия ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ). 5 мл 0,1 н гипосульфита (тиосульфата) натрия доводят свежепрокипяченной и охлажденной без доступа углекислого газа воздуха дистиллированной водой до 100 мл (в мерной колбе). Исходный (0,1 н) раствор лучше всего готовить из фиксанала. При его отсутствии 2,4819 г кристаллической соли ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) растворяют в небольшом объеме дистиллированной воды, количественно полностью переносят в мерную колбу на 100 мл и доливают водой до метки.

4. Кристаллический КJ или раствор йодистого калия (10 г/100 мл). Хранят в темной посуде в холодильнике.

5. Раствор крахмала (0,25 г/100 мл), можно также пользоваться растворами концентрации 0,2 г/100 мл или 1 г/100 мл.

6. Раствор соляной кислоты (18 г/100 мл). Концентрированную  $\text{HCl}$  плотностью 1,19 кг/л разводят пополам дистиллированной водой.

**Ход определения.** В центрифужную пробирку вносят 1,0 мл дистиллированной воды, 0,1 мл сыворотки или крови (взятой из пальца) и 4,0 мл осадителя (реактив 1), смешивают и через 10—15 мин центрифугируют на протяжении 5—10 мин. За это время готовят рабочий раствор гипобромита.

В небольшой стаканчик или в колбочку отбирают 4,0 мл центрифугата, добавляют (лучше морковской пипеткой) 5,0 мл рабочего раствора гипобромита, содержимое взбалтывают и оставляют стоять на 1—2 мин. Затем вносят 0,2 мл раствора КJ или несколько кристалликов йодистого калия, 3 мл раствора  $\text{HCl}$ , смесь взбалтывают и титруют 0,005 н раствором гипосульфита натрия до слабо-желтого цвета. Наливают 2—3 капли раствора крахмала и дотитровывают смесь до обесцвечивания.

Одновременно с опытной ставят контрольную пробу, содержащую 4,0 мл осадителя, 5,0 мл гипобромита, 0,2 мл раствора КJ, 3 мл

раствора HCl. Контрольную пробу титруют также до обесцвечивания. Лучше проводить две контрольные пробы: при этом одну из них титруют в начале, другую — в конце исследования, а пользуются средним значением результатов. Для получения более точных данных рекомендуется ставить параллельные пробы.

Разность в количестве мл гипосульфита, пошедшего на титрование контрольных (К) и опытных (О) проб, умножают на коэффициент (0,3) и выражают ответ в г/л:

$$(K-O) \cdot 0,3 = \text{остаточный азот (г/л)}.$$

В случае применения для титрования 0,005 н раствора гипосульфита коэффициент пересчета равен 0,3, а на титрование контрольной пробы должно идти от 8,5 до 10,0 мл гипосульфита. Если на титрование контрольной пробы затрачивается меньшее количество гипосульфита, то либо он более крепок, либо в раствор 2 следует добавить несколько капель чистого брома.

Примечания: 1. Начиная с этапа отбора центрифугата, можно использовать половинные объемы растворов, умножая полученный результат на коэффициент 0,6.

2. Допускается производить титрование 0,01 н раствором гипосульфита. При этом полученные значения нужно умножать на коэффициент 0,6.

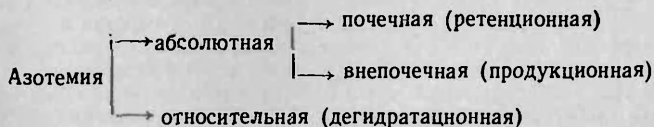
Норма — 0,20—0,40 г/л.

#### *Клинико-диагностическое значение исследования содержания остаточного азота в сыворотке крови*

Большинство авторов считает нормальным содержание остаточного азота в цельной крови или в сыворотке у взрослых 0,20—0,40 г/л, но и 0,5 г/л еще не является патологическим, поскольку некоторые физиологические факторы (прием богатой азотистыми веществами пищи, сухоедение, предродовое состояние и прочие) могут оказываться на повышении концентрации остаточного азота крови. Однако чаще всего повышение уровня остаточного азота крови — свидетельство нарушения нормальных взаимоотношений между образованием и выведением продуктов азотистого метаболизма из организма.

Возрастание концентрации остаточного азота свыше 0,40—0,50 г/л обозначается термином «азотемия». По своему характеру последняя может быть абсолютной (связанной с действительным накоплением в крови компонентов остаточного азота) и относительной (обусловленной, например, обезвоживанием, дегидратацией).

Абсолютная азотемия вызывается либо задержкой азотистых шлаков, либо усиленным их образованием.



Ретенционная азотемия наблюдается при нарушении выделительной способности почек. Поэтому определение остаточного азота приобрело большое значение при почечных заболеваниях (острых и

особенно хронических нефритах). Большинство авторов придерживается мнения, что повышение остаточного азота до 1 г/л и выше является очень плохим признаком. И все же следует помнить, что в острых случаях заболевания возрастание уровня остаточного азота может быть преходящим (тогда задержка шлаков носит не стойкий, а временный характер). Следовательно, для правильного толкования цифр остаточного азота в каждом отдельном случае нужно делать повторное исследование крови на остаточный азот. Азотемия у больных острыми нефритами, как правило, является следствием анурии. У больных хроническими нефритами стойкая азотемия указывает на развившуюся недостаточность почек. Степень повышения концентрации остаточного азота при этом коррелирует с тяжестью патологического процесса. Определение в крови остаточного азота может иметь значение для дифференциальной диагностики некоторых форм гипертонии: при почечной гипертонии остаточный азот повышен, при эссенциальной — в пределах нормы.

Продукционная азотемия, как правило, сопровождается процессом усиленного распада белков; умеренное увеличение остаточного азота отмечается у больных злокачественными новообразованиями. Это повышение идет параллельно возрастанию степени кахексии. Следует обращать внимание на то, что при рассматриваемом состоянии процентное отношение азота мочевины ко всему остаточному азоту уменьшено в противоположность азотемии почечного происхождения, при которой оно повышено. Возрастание концентрации остаточного азота бывает и при кахексии неракового происхождения, вызванной, например, туберкулезом, диабетом, тяжелыми циррозами печени.

У больных крупозной пневмонией уровень остаточного азота повышен с первых дней болезни и продолжает нарастать до последнего дня высокой температуры. Увеличение содержания остаточного азота преимущественно идет за счет полипептидной фракции и обусловлено тканевым и в меньшей степени — почечным факторами. Важно отметить, что первые признаки столбняка возникают на фоне непрерывного нарастания уровня остаточного азота в сыворотке крови.

Повышенное содержание остаточного азота отмечается также при острой желтой атрофии печени, недостаточности сердечной деятельности, прекоматозной стадии диабета, инфекционных заболеваниях, сопровождающихся лихорадкой (с прогрессирующим распадом тканей), например, при сыпном тифе, дифтерии, скарлатине, пневмониях; нередко при острой закупорке кишок, перитонитах, хирургическом шоке, гипертрофии предстательной железы, подагре, гипопункции надпочечников, а также при отравлении четыреххлористым углеродом, хлороформом, мышьяком, фосфором, щелочами.

Весьма интересна взаимосвязь между содержанием остаточного азота и хлоридов крови. Показано, что обеднение организма солью приводит к прогрессивной азотемии. Эта так называемая хлоропривная азотемия отмечается у больных нефритом, протекающим без отеков (в ответ на хлоропению для компенсации осмотического давления увеличивается концентрация остаточного азота; вполне понятно, что применение ахлоридной диеты в этих случаях противопоказано), в послеоперационном периоде (для борьбы с гипохлоремией и азотемией больным делают внутривенное вливание хлористого натрия).

Относительная азотемия наблюдается у больных с явлениями

содержания крови при профузных поносах, усиленном потоотделении и прочих состояниях. Понижение содержания остаточного азота в крови наблюдается при недостаточном питании и в некоторых случаях беременности.

Поскольку в норме более 50 % остаточного азота приходится на долю мочевины, прежде всего необходимо остановиться на характеристике существующих методов определения этой наиболее часто исследуемой фракции небелкового азота.

## МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ МОЧЕВИНЫ

Мочевина представляет собой диамид угольной кислоты, образующийся в печени при обезвреживании аммиака. Молекулярная масса ее 60 дальтон. Из них 28 дальтон приходится на долю двух атомов азота, входящих в состав молекулы мочевины. Следовательно, при необходимости сопоставления концентрации остаточного азота с содержанием азота мочевины концентрацию последней следует разделить на 2,14 (60:28). Только при получении таких соизмеримых величин возможно нахождение процента содержания азота мочевины от всего остаточного азота, что имеет очень большое значение для дифференциации поражений печени и почек.

Основные группы методов определения содержания мочевины подразделяют на: 1) газометрические или гипобромитные; 2) ксантгидроловые; 3) диацетилмонооксидные; 4) гипохлоритные; 5) уреазные; 6) прочие — с р-диметиламинобензальдегидом (реактив Эрлиха), пюитропропиофеноном, диметилгликоксимом. Известны также полуколичественные, ориентировочные методы установления концентрации мочевины с помощью реактивной бумаги. Объемно-гипобромитный метод А. П. Бородин и его модификации основаны на разложении мочевины гипобромитом патрия в щелочной среде —  $\text{CO}(\text{NH}_2)_2 + 3\text{NaBrO} = \text{N}_2 + \text{CO}_2 + 3\text{NaBr} + 2\text{H}_2\text{O}$ . Выделяющуюся углекислоту поглощает раствор, свободным остается только азот, объем которого измеряют. Метод неспецифичен, так как гипобромит реагирует не только с мочевиной, но и с другими компонентами остаточного азота, содержащими аминогруппы. На определение требуется большое количество крови и брома (весьма токсичного реактива), иногда не удается точно замерить объем выделившегося газа из-за прилипания пузырьков к стенкам аппарата. Сам же стеклянный прибор, в котором производят определение, часто выходит из строя вследствие хрупкости.

Известно много веществ, дающих с мочевиной окрашенные соединения. На этом принципе основан ряд колориметрических методов. Так, гетероциклический спирт ксантгидрол вступает в соединение с мочевиной, образуя осадок — диаксантилмочевину. В дальнейшем мочевины можно определять различными способами: гравиметрическим (высушиванием и взвешиванием), нефелометрическим, колориметрическим (осадок растворяют в серной кислоте, в результате чего возникает цветная реакция), титрометрическим.

Ксантгидроловые методы более точны, чем гипобромитные, однако в клинико-диагностических лабораториях их применяют редко из-за большой трудоемкости выполнения и дефицитности реактивов.

Наиболее распространены колориметрические методы, основанные на реакции Фирона — взаимодействии мочевины и диацетилмо-

нооксима с образованием окрашенных продуктов. Для повышения чувствительности и стабилизации цвета реактива предложен ряд модификаций метода с использованием разных веществ: триптофана и нитритов, фенилантраниловой кислоты, антипиррина, персульфата калия, тиосемнкарбазида и солей железа. Последняя модификация положена в основу определения мочевины при помощи диагностических наборов реактивов, выпускаемых фирмой «Лахема» (ЧССР).

Преимуществом метода с использованием реакции Фирона является его простота: на проведение анализа требуется 15—20 мин. Причем исследование можно проводить и в капиллярной крови.

Фенолгипохлоритный метод Б. А. Рашкована, состоящий в появлении характерной окраски при взаимодействии мочевины с гипохлоритом натрия и фенолом, не нашел широкого распространения в клинико-диагностических лабораториях из-за трудности приготовления фенолгипохлоритного реактива и ряда других причин (различного оттенка окраски опытных и контрольных проб, частого появления мути при добавлении HCl).

Наиболее точными и специфичными способами определения концентрации мочевины являются ферментативные уреазные методы.

В качестве препарата уреазы можно использовать тыквенные или арбузные семечки, соевую муку, однако лучше всего применять для этой цели кристаллический фермент, выпускаемый отечественной промышленностью. Этот реактив отличается сравнительно большой стойкостью.

Заслуживает внимания быстрое ориентировочное (полуколичественное) определение концентрации мочевины с помощью реактивной бумаги. В основу его положено действие уреазы на мочевины. В Советском Союзе завод «Реагент» освоил выпуск специальной индикаторной (реактивной) бумаги под названием «Уреатест». Аналогичные диагностические тесты производят и за рубежом.

Кондуктометрические методы и способы, состоящие в применении ион-селективных электродов, быстры, но требуют специального оборудования.

Из всего многообразия методов изучения уровня мочевины в биологических жидкостях в качестве унифицированных утверждены: 1) экспресс-метод — определение содержания мочевины с использованием реактивной бумаги «Уреатест»; 2) диацетилмонооксимный — простой, чувствительный, достаточно специфичный способ (им также определяют мочевины с помощью набора реактивов чешской фирмы «Лахема»), позволяет в течение короткого периода времени проводить исследование в капиллярной крови и других биологических жидкостях; 3) ферментативный (как наиболее специфичный) — с применением кристаллического препарата уреазы.

При невозможности по какой-либо причине наладить в лаборатории один из перечисленных унифицированных методов предлагается освоить простой уреазный способ установления концентрации мочевины с использованием фермента, содержащегося в семечках арбуза или тыквы. Будучи весьма специфичным и простым, он может быть поставлен в любой клинико-диагностической лаборатории. Определение основано на способности уреазы гидролизовать мочевины с образованием аммиака, по количеству которого и судят о концентрации исследуемого продукта в биологической жидкости. Для установления содержания аммиака чаще всего применяют реактивы Несслера и Бертлопта.

**Определение мочевины  
в сыворотке крови экспресс-методом  
с применением реактивной бумаги «Уреатест»**

Исследование проводят согласно прилагаемой к наборам индикаторной бумаги инструкции, из которой следует, что «Уреатест» предназначен для быстрого полуколичественного определения мочевины в сыворотке крови.

Содержащиеся в упаковке полоски хроматографической бумаги размером 120×10 мм пропитаны растворами фермента и индикатора. Зоны их нанесения разделены красной парафиновой полоской. При проведении анализа бумажку следует держать за свободный конец. В комплекте находятся 20 штук реактивных бумажек, калибровочный график и инструкция.

**Принцип.** Метод основан на способности уреазы расщеплять мочевину, приводящую к выделению аммиака, который окрашивает индикатор в голубой цвет. Высота в мм окрашенной зоны пропорциональна концентрации мочевины. Последнюю рассчитывают по калибровочному графику.

С помощью реактивной бумаги можно установить уровень мочевины в сыворотке крови в пределах от 20 до 250 мг/100 мл или соответственно от 3,33 до 41,62 ммоль/л.

**Ход определения.** Сыворотку крови разводят дистиллированной водой в отношении 1:1. На пропитанный ферментом конец бумажки в 3 мм от красной парафиновой полосы наносят специальной мерной пипеткой 0,03 мл приготовленной сыворотки крови. Бумажку быстро помещают в чистую сухую пробирку, герметически закрывают ее пробкой и оставляют на 20 мин при +37 °С или на 30 мин при +20 °С в термостате.

Затем измеряют высоту индикаторной зоны, окрашенной в голубой цвет. По приложенному графику находят концентрацию мочевины.

В случае использования неразбавленной сыворотки или цельной крови результат делят на 2.

**Примечание.** Комплект «Уреатест» следует хранить в сухом, темном, прохладном месте. Срок годности — 8 мес со дня выпуска.

**Определение мочевины в сыворотке крови и в моче  
по цветной реакции с диацетилмонооксимом**

**Принцип.** Мочевина образует с диацетилмонооксимом в присутствии тиосемикарбазида и солей железа в кислой среде окрашенные вещества, интенсивность окраски которых пропорциональна содержанию мочевины в сыворотке крови и в моче.

**Реактивы.** 1. Раствор трихлоруксусной кислоты — 10 г/100 мл.

2. Водный раствор диацетилмонооксима — 2,5 г/100 мл. Реактив-сток.

3. Водный раствор (0,25 г/100 мл) тиосемикарбазида или солянокислого тиосемикарбазида (0,32 г/100 мл). Оба реактива стабильны неограниченно долгое время, если хранить их в темной посуде при комнатной температуре.

4. Раствор хлорного железа. 5 г хлорного железа растворяют в

100 мл дистиллированной воды и подкисляют 1 мл концентрированной серной кислоты. Приготовленный таким образом основной раствор используют для получения рабочего раствора хлорного железа путем добавления к 1 мл первого дистиллированной воды до объема 100 мл и последующего приливания 8 мл концентрированной серной кислоты и 1 мл раствора ортофосфорной кислоты (85 г/100 мл). Раствор хранят в темной посуде и используют в течение 2 недель.

5. Цветной реактив. К 30 мл рабочего раствора хлорного железа добавляют 20 мл дистиллированной воды, 1 мл раствора диацетилмонооксида (реактив 2) и 0,25 мл раствора тиосемикарбазида (реактив 3). Цветной реагент готовят каждый раз непосредственно перед употреблением.

6. Стандартный раствор мочевины. 1,0 г мочевины растворяют в 100 мл дистиллированной воды. Из этого основного раствора готовят рабочий разведением основного в 10 раз.

Согласно приказу МЗ СССР об унификации лабораторных методов исследования (1972, № 290, с. 69—70), рекомендуется сразу готовить рабочий раствор мочевины, используя вместо воды раствор бензойной кислоты концентрации 0,2 г/100 мл (0,2 г кристаллической бензойной кислоты растворяют в 100 мл дистиллированной воды при интенсивном перемешивании и нагревании содержимого склянки на водяной бане). Стандарт на растворе бензойной кислоты более стабилен, чем водный.

При работе оба раствора должны давать небольшие колебания экстинкции. В противном случае их необходимо заменить.

1 мл стандартного раствора содержит 1 мг мочевины (1 г/л, или 16,65 ммоль/л).

Для определения концентрации мочевины в сыворотке крови. В центрифужную пробирку вносят 0,8 мл дистиллированной воды, 0,2 мл сыворотки и 1,0 мл раствора трихлоруксусной кислоты, содержащее ее смешивают. Через 15—20 мин смесь центрифугируют.

В чистую пробирку вносят 0,5 мл надосадочной жидкости и 5 мл цветного реактива (5). Пробирку выдерживают в кипящей водяной бане 20 мин, затем охлаждают в течение 2—3 мин под водопроводной водой. Измерение экстинкции пробы проводят на фотоэлектроколориметре при длине волны 500—560 нм (зеленый светофильтр) в кювете с шириной слоя 10 мм.

Учитывают оптическую плотность контрольной пробы, которую ставят так же, как опытную, но вместо надосадочной жидкости берут 0,5 мл дистиллированной воды.

Стандартную пробу проводят, как опытную, с той лишь разницей, что вместо сыворотки в ней используют 0,2 мл стандартного раствора мочевины.

Допустим и второй вариант постановки стандартной пробы, при котором в пробирку вносят 0,05 мл рабочего стандартного раствора, 0,25 мл раствора трихлоруксусной кислоты, 0,2 мл дистиллированной воды и сразу 5,0 мл цветного реактива. Этот способ, несмотря на большую простоту, отличается несколько меньшей точностью из-за трудности взятия пипеткой ровно 0,05 мл жидкости.

В обоих случаях расчет производят по формуле:

$$x = \frac{E_{\text{оп.}}}{E_{\text{ст.}}} \cdot 16,65,$$



где  $x$  — концентрация мочевины (ммоль/л);  $E_{оп.}$  — экстинкция опытной пробы;  $E_{ст.}$  — экстинкция стандартной пробы; 16,65 — концентрация мочевины (ммоль/л) в стандартном растворе.

**Ход определения содержания мочевины в моче.** Перед исследованием профильтрованную мочу (взятую из суточного ее количества) разводят физиологическим раствором в соотношении 1:25 или 1:50. Анализ проводят по способу, аналогичному описанному для сыворотки крови, с той разницей, что вместо сыворотки берут 0,2 мл разведенной мочи. Параллельно обрабатывают стандартную пробу так, как это описано для определения мочевины в сыворотке крови.

Расчет содержания мочевины в суточном объеме мочи производят по следующей формуле:

$$x_{\text{ммоль/сут}} = \frac{C_{ст.} \cdot E_{оп.} \cdot a \cdot K \cdot 16,65}{E_{ст.} \cdot b \cdot 1000},$$

где  $x$  — количество мочевины в суточной моче (ммоль);  $E_{оп.}$  — экстинкция опытной пробы;  $E_{ст.}$  — экстинкция стандартной пробы;  $C_{ст.}$  — количество мочевины в стандартной пробе (0,05 мг);  $a$  — суточное количество мочи (мл);  $b$  — количество мочи (мл), взятое для анализа;  $K$  — коэффициент разведения мочи; 1000 — коэффициент перевода величины экскреции мочевины из мг в г; 16,65 — коэффициент пересчета показателей экскреции мочевины из г/сут в ммоль/сут.

Формулу можно упростить благодаря использованию коэффициента, представляющего собой частное от деления 16,65 на 1000.

Норма содержания мочевины в сыворотке крови — 2,50—8,33 ммоль/л, в суточном объеме мочи — 333,0—582,8 ммоль.

**Примечания:** 1. Ввиду неустойчивости получаемой окраски измерение экстинкции следует проводить не позже чем через 15 мин после охлаждения проб.

2. Из-за неустойчивости окрашенного комплекса мочевины с диацетилмоноксимом и зависимости окраски от условий нагревания калибровочный график строить не рекомендуется.

3. При содержании мочевины в сыворотке крови выше 16,65 ммоль/л сыворотку разводят физиологическим раствором, а результаты умножают на коэффициент разведения.

4. При определении содержания мочевины в моче, начиная с величины экстинкции 0,13—0,15, следует увеличивать разведение мочи.

5. Пересчет показателей мочевины на содержание азота в мочеvine осуществляют путем умножения на фактор 0,466 (или делением на 2,14).

### Определение мочевины в сыворотке крови уреазным методом по реакции с фенолгипохлоритом

**Принцип.** Мочевина под действием уреазы разлагается на углекислый газ и аммиак, содержание которого устанавливают колориметрически по образованию окрашенных продуктов с гипохлоритом и фенолом.

**Реактивы.** 1. Раствор ЭДТА — динатриевой соли этилендиаминтетрауксусной кислоты (трилон Б, селектол, хелатон, комплексон III, нерсен). 1 г ЭДТА растворяют в 90 мл дистиллированной воды, доводят pH до 6,0, корректируя кислую реакцию среды 5 н раствором едкого натра, и приливают воду до объема 100 мл. Этот реактив используют для приготовления раствора уреазы.

2. Раствор уреазы с pH 6,0. 0,02 г ферментативного препарата



уреазы вносят в 50 мл раствора ЭДТА, проверяют и в случае необходимости устанавливают нужное значение рН.

Отечественная уреазы имеет активность около 870 ед. Sumper на 1 г белка. Для реакции пригодна уреазы с активностью 800—1000 ед. Sumper на 1 г белка. Препараты уреазы хранят в холодильнике в плотно закрытой упаковке. При соблюдении этих условий фермент стабилен в течение месяца.

3. Раствор фенола и нитропруссид натрия (цветной реактив). 0,25 г нитропруссид натрия (ч.д.а) растворяют в 500 мл дистиллированной воды, добавляют 50 мл или 54 г фенола (ч.д.а) и доливают дистиллированной водой до 2 л. Раствор стабилен в течение месяца при хранении его в холодильнике в посуде из темного стекла.

4. Основной раствор гипохлорита натрия ( $\text{NaOCl}$ ). 100 г хлорной извести ( $\text{CaOCl}_2$ ) размешивают в течение 15 мин со 170 мл дистиллированной воды, после чего прибавляют, непрерывно помешивая, раствор, состоящий из 170 мл дистиллированной воды и 70 г углекислого натрия ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ). Масса сначала густеет, затем разжижается, ее оставляют стоять до следующего дня. Надосадочную жидкость (гипохлорит натрия) сливают и фильтруют через промытый дистиллированной водой фильтр. Хранят в холодильнике в посуде из темного стекла. Срок годности раствора — 1—2 мес.

Для определения активности хлора 1 мл основного раствора гипохлорита натрия смешивают с 100 мл дистиллированной воды. К 50 мл этого раствора добавляют 5,0 мл свежеприготовленного раствора йодистого калия (реактив 8) и 10 мл раствора соляной кислоты (реактив 7). Титруют раствором тиосульфата натрия (реактив 5). Как только раствор приобретет слабо-желтую окраску, добавляют 10 капель 1 г/100 мл раствора крахмала и продолжают титрование до обесцвечивания.

Концентрацию активного хлора в г на 100 мл раствора гипохлорита натрия рассчитывают по формуле:

$$a \cdot 0,709,$$

где  $a$  — количество мл тиосульфата натрия, пошедших на титрование; 0,709 — коэффициент пересчета 1,0 мл раствора тиосульфата натрия в значения концентрации (г/100 мл) хлора.

Таким образом, по содержанию хлора судят о качестве приготовленного раствора гипохлорита натрия.

После установления концентрации активного хлора основной раствор гипохлорита разводят так, чтобы концентрация хлора в нем равнялась 0,5 г/100 мл. Этот раствор смешивают с равным объемом 5 н раствора едкого натра и используют для реакции. Активность хлора проверяют не реже 1 раза в две недели.

5. 0,1 н раствор тиосульфата натрия. 25 г кристаллического тиосульфата натрия ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) растворяют в 1 л дистиллированной воды.

6. 5 н раствор едкого натра.

7. 6 н раствор соляной кислоты.

8. Раствор йодистого калия — 5 г/100 мл.

9. Стандартный (калибровочный) раствор мочевины — 6,66 ммоль/л. 40 мг высушенной до постоянного веса мочевины растворяют в мерной колбе в 100 мл реактива 10. Стандартный раствор можно готовить и на дистиллированной воде, но от этого он будет

мнее стабилен. 1 мл его содержит 0,4 мг мочевины. Раствор хранят в холодильнике.

10. Раствор бензойной кислоты — 0,2 г/100 мл. 0,2 г кристаллической бензойной кислоты вносят в 100 мл дистиллированной воды, интенсивно перемешивают и нагревают смесь до полного растворения кристаллов.

**Ход определения.** Для приготовления опытной пробы 0,5 мл раствора уреазы вносят в пробирку с притертой пробкой, добавляют 0,02 мл сыворотки. Пробирку закрывают пробкой и смесь инкубируют 15 мин при +37 °С. После инкубации приливают 10 мл цветного реактива и 1 мл раствора гипохлорита натрия. Содержимое пробирки перемешивают и оставляют стоять 20 мин при +37 °С. Через 10 мин измеряют экстинкцию на ФЭКе в кювете с шириной слоя 10 мм, используя зеленый светофильтр с максимумом пропускания 500—560 нм. При этом учитывают значение оптической плотности контрольной пробы.

Контрольную пробу ставят так же, как опытную, но вместо сыворотки берут дистиллированную воду.

Стандартную пробу обрабатывают как опытную, но вместо сыворотки используют калибровочный раствор мочевины. Измерение экстинкции осуществляют при условиях, аналогичных таковым для опытной пробы. В расчет принимают значения оптической плотности опытной и стандартной проб за вычетом экстинкции контрольной пробы.

Расчет ведут по формуле:

$$\text{Концентрация мочевины (ммоль/л)} = \frac{E_1}{E_2} \cdot 6,66,$$

где  $E_1$  — экстинкция опытной пробы;  $E_2$  — экстинкция стандартной пробы; 6,66 — концентрация стандартного раствора мочевины (ммоль/л).

В норме содержание мочевины в сыворотке крови составляет 2,50—8,33 ммоль/л.

Для пересчета результатов на азот мочевины показатель ее концентрации в ммоль/л делят на 2,14.

**Примечания:** 1. Построение калибровочного графика не рекомендуется, так как интенсивность окраски проб зависит от условий опыта. Поэтому правильнее обрабатывать стандартные пробы одновременно с опытными и вести расчет результатов по формуле.

2. Серия проб не должна превышать 10.

3. Если сыворотка мутная или окрашенная, то проводят дополнительную контрольную пробу — в смесь добавляют сыворотку и все реактивы без инкубации. Показатель экстинкции этой контрольной пробы вычитают из значения оптической плотности опытной.

4. Окраска проб стабильна в течение нескольких часов.

### Определение мочевины крови уреазным методом по реакции с реактивом Несслера

**Принцип метода** основан на разложении мочевины крови или сыворотки ферментом уреазой с последующим измерением количества образующегося аммиака колориметрическим способом (с использованием реактива Несслера).

**Реактивы.** 1. Препарат уреазы: а) очищают 3—4 семечка арбуза, или зеленые зерна растирают в ступке, сначала в 1,0 мл, затем в

10,0 мл воды. Полученную эмульсию фильтруют. В семечках ферментативная активность сохраняется более 2 лет. Вместо арбузных семечек можно брать и тыквенные; б) сухая соевая мука — 10—12 мг на пробу.

2. Раствор кристаллического сульфата цинка — 7,5 г/100 мл.

3. Раствор едкого натра — 1,5 г/100 мл.

Проверка титров растворов 2 и 3: на титрование 10 мл раствора сульфата цинка в присутствии фенолфталеина (в качестве индикатора) должно пойти 10,8—11,2 мл раствора NaOH.

4. Раствор сегнетовой соли ( $KNaC_4H_4O_6$  — виннокислый K, Na) — 0,2 г/100 мл.

5. Реактив Несслера.

6. Стандартный раствор мочевины с содержанием 30 мг мочевины в 100 мл воды — 5 ммоль/л.

**Ход определения.** В две пробирки — опытную и стандартную — вносят по 1,5 мл дистиллированной воды. Затем в опытную добавляют 0,1 мл крови или сыворотки, а в стандартную — 0,1 мл стандартного раствора мочевины, после чего в каждую из пробирок приливают по 0,5 мл препарата уреазы или всыпают по 10—12 мг сухой соевой муки. Содержимое пробирок перемешивают, плотно закрывают корковыми пробками, выдерживают 20 мин в водяной бане (или в термостате) при  $+37^\circ C$ , охлаждают водой и добавляют в каждую пробирку по 0,2 мл раствора сульфата цинка ( $ZnSO_4$ ) и по 0,2 мл раствора едкого натра (NaOH). После тщательного перемешивания производят центрифугирование (до получения прозрачной надосадочной жидкости), из каждой пробы отбирают по 1,25 мл центрифугата, который переносят в две другие чистые пробирки. В них приливают по 2,25 мл раствора сегнетовой соли и по 0,5 мл реактива Несслера. Содержимое пробирок перемешивают и колориметрируют на ФЭКе с синим светофильтром в кювете с шириной слоя 5 мм, используя в качестве контрольного раствора воду (1) или специально подготовленную контрольную пробу (2).

Последнюю готовят путем добавления к 1,25 мл дистиллированной воды 2,25 мл раствора сегнетовой соли и 0,5 мл реактива Несслера.

Расчет ведут решением пропорций 1 и 2:

$(E_{оп.} - E_{к.}) - x$  ммоль/л,  $(E_{с.} - E_{к.}) - 5$  ммоль/л, тогда  $x = (E_{оп.} - E_{к.}) / (E_{с.} - E_{к.}) \cdot 5$  ммоль/л = а ммоль/л (1),

$E_{оп.} - x$  ммоль/л,  $E_{с.} - 5$  ммоль/л, тогда  $x = E_{оп.} / E_{с.} \cdot 5$  ммоль/л = а ммоль/л (2),

где  $E_{оп.}$ ,  $E_{к.}$  и  $E_{с.}$  — экстинкция опытной, контрольной и стандартной проб соответственно.

В случае расчета по формуле 2 используют значение оптической плотности опытной и стандартных проб за вычетом экстинкции контрольной пробы.

Норма содержания мочевины в сыворотке крови — 2,50—8,33 ммоль/л.

#### *Клинико-диагностическое значение исследования концентрации мочевины в сыворотке крови и моче*

При трактовке результатов анализа следует исходить из того, что диета с низким содержанием белка может уменьшить концентрацию мочевины в крови до 2,0 ммоль/л, и наоборот, при избыточном

питании азотистыми продуктами уровень мочевины обычно колеблется около верхней границы нормы. Диета, бедная ионами хлора, также нередко приводит к повышению концентрации мочевины. Поэтому большинство авторов считает колебание концентрации мочевины от 2,50 до 8,33 ммоль/л физиологически допустимым. Однако существует мнение, что возрастание уровня мочевины в крови выше 6,66 ммоль/л уже нужно рассматривать как признак патологии, поскольку едва ли какой-либо пищевой режим способен поднять содержание мочевины выше этого значения при отсутствии у больного выделительных расстройств.

Физиологическое состояние организма, связанное с беременностью, часто сопровождается уменьшением концентрации мочевины в крови до уровня ниже 3,33 ммоль/л.

В клинике определение концентрации мочевины приобрело наибольшее значение для диагностики заболеваний почек. Е. М. Тареев считает, что по количеству мочевины, задерживаемой в крови, можно быстрее распознать начальную степень почечной недостаточности, чем по величине суммарного остаточного азота, ибо мочевина составляет именно ту часть остаточного азота, которая в наибольшей степени задерживается в крови при ухудшении функции почек. К тому же определение мочевины технически проще осуществимо, чем остаточного азота.

При почечной патологии уровень мочевины нарастает гораздо быстрее, чем содержание всех остальных компонентов остаточного азота. Если в норме азот мочевины сыворотки составляет около 50 % всего остаточного азота, то при почечной недостаточности он может увеличиваться до 90 %. Поэтому для дифференциальной диагностики заболеваний почек от глубоких дистрофических поражений печени используют коэффициент *urea ratio*.

$$\text{Urea ratio} = \frac{\text{азот мочевины}}{\text{остаточный азот}} \cdot 100.$$

В норме этот показатель колеблется от 46 до 60 %, при хронических нефритах он возрастает до 90 % (и более), а при тяжелых формах гепатитов он значительно уменьшается.

У больных острыми нефритами уремия наступает быстро и, как правило, бывает следствием анурии. Задержка азотистых соединений в крови наблюдается обычно при гломерулонефритах и почти не обнаруживается при нефрозах.

Определение содержания мочевины (или остаточного азота) в крови позволяет дифференцировать уремические состояния от псевдоуремических. Так, если при клинической картине уремического припадка у гипертонического больного содержание остаточного азота или мочевины в крови нормально, становится понятным, что это не уремия. У больных с почечной гипертензией уровень мочевины в крови повышен. При эссенциальной гипертензии эта азотистая фракция в крови не выходит за пределы нормы.

Знание концентрации мочевины позволяет составить представление и о прогнозе заболевания.

Повышение уровня мочевины в сыворотке крови наблюдается не только у больных с почечной недостаточностью, но и у больных с другими патологическими состояниями — рефлексорной анурией, камнями и злокачественными новообразованиями в мочевыводящих пу-

тях, предстательной железе, отравлением сулемой, болезнью Аддисона, усиленным распадом белков (последнее отмечается у больных с острой желтой атрофией печени, тяжелыми инфекционными заболеваниями — брюшным тифом, холерой), непроходимостью кишечника, перитонитом, шоком, ожогами, обеднением организма ионами хлора (хлорпрививная азотемия, уремия), а также с дизентерией, обезвоживанием (в последнем случае уремия носит не абсолютный, а относительный характер).

Поскольку мочевины образуется главным образом в печени (в небольших количествах она может синтезироваться и в других тканях), вполне понятно, что при ее заболеваниях в первую очередь страдает мочевинообразовательная функция. Поэтому при паренхиматозной желтухе, острой дистрофии печени, декомпенсированном циррозе уровень мочевины в крови уменьшается, хотя концентрация остаточного азота при этом может не изменяться или даже несколько увеличиваться (за счет возрастания содержания азота аминокислот и аммиака). Особенно показательно в этом отношении изменение коэффициента *urea ratio*, который резко снижается (в противоположность значительному повышению при недостаточности почек).

Повышенное содержание мочевины в моче отмечается у больных со злокачественной анемией, лихорадкой, в результате гиперпротеновой диеты, после приема салицилатов, хинина, при отравлении фосфором; пониженное — у больных с уремией, нефритом, ацидозом, паренхиматозной желтухой, острой дистрофией печени, прогрессирующим циррозом.

#### Методы определения креатинина и креатина в крови и моче

Существующие методы исследования содержания креатинина (креатина) в крови и моче делятся на:

I. Колориметрические: 1) с пикриновой кислотой. Методы этой группы основаны на реакции Яффе и различаются между собой по способу осаждения белков плазмы или сыворотки. Оно может быть осуществлено: а) вольфрамом натрия — Фолин, Ву (1919); б) пикриновой кислотой — Поппер с соавт. (1937); в) трихлоруксусной кислотой — Б. Е. Берхин (1954); 2) с 3,5-динитробензойной кислотой; 3) с ортонитробензальдегидом и альфа-нафтолом.

II. Ферментативные: 1) определение креатинина при помощи почвенных бактерий, разлагающих креатинин; 2) определение с ферментом креатинфосфокиназой.

Наиболее точными и специфичными являются ферментативные методы исследования содержания креатинина. Однако все они сложны, их внедрение в клиническую практику требует большого количества дорогостоящих реактивов и специальной аппаратуры.

Из колориметрических методов самые специфичные с использованием ортонитробензальдегида. Принцип их состоит в превращении креатинина в метилгуанидин, который определяют реакцией для гуанидиновых производных. Однако для проведения этого вида исследования необходимы пока еще дефицитные реактивы. К тому же упомянутая реакция протекает длительно, а основанные на ней методы отличаются трудоемкостью.

Очень большое распространение получила реакция Яффе, откры-

тая автором в 1886 г. Суть ее сводится к тому, что при добавлении в креатинину пикриновой кислоты в щелочной среде появляется оранжево-красное окрашивание, обусловленное образованием таутомера пикрата креатинина.

К сожалению, методы, основанные на реакции Яффе, недостаточно специфичны, поскольку ими выявляются и содержащиеся в сыворотке крови «псевдокреатининовые» хромогены. Среди них наибольшее значение имеют глюкоза, ацетон, ацетоуксусная и пировиноградная кислоты. Эти продукты могут обуславливать кажущееся повышение уровня сывороточного креатинина, поэтому установление указанным методом концентрации креатинина в крови больных сахарным диабетом оказывается весьма неточным.

Замечено, что при нагревании с белком пикриновая кислота восстанавливается в пикраминную (красного цвета). Различные другие восстановители, в том числе и глюкоза, также способны превращать пикриновую кислоту в пикраминную.

Содержание неспецифических хромогенов в сыворотке крови более высокое, чем в моче, что может сказаться на расчете клиренса креатинина. В связи с этим большое значение приобрел вопрос о специфичности методов определения креатинина в биологических жидкостях. Как выяснилось, она во многом зависит от природы осадителя белков сыворотки крови.

В методе Поппера осаждение белков производят пикриновой кислотой, что, по мнению ряда авторов, позволяет получить более точные результаты, чем при осаждении белков вольфраматом натрия или трихлоруксусной кислотой. Видимо, пикриновая кислота удаляет и часть креатининоподобных хромогенов, дающих цветную реакцию Яффе. Клиренс креатинина, установленный методом Поппера, более правильно отражает истинную величину клубочковой фильтрации. Найденная этим способом величина клубочковой фильтрации практически ничем не отличается от значений клиренса инулина (А. К. Мерзон, 1970).

Таким образом, в качестве унифицированного метода для установления концентрации креатинина в крови и моче предложен метод Поппера с соавт., основанный на реакции Яффе. Фирмой «Лахема» (ЧССР) освоено выпуск наборов реактивов для определения содержания креатинина в сыворотке крови и моче («Креатинин») и построения калибровочных графиков по стандартным растворам («Креатинин-эталон»).

#### Определение креатинина в сыворотке крови и в моче по цветной реакции Яффе (метод Поппера с соавт.)

**Принцип.** В результате реакции креатинина и пикриновой кислоты в щелочной среде образуется окрашенное соединение, интенсивность окраски которого пропорциональна концентрации креатинина.

**Реактивы.** 1. Насыщенный раствор пикриновой кислоты. 2 г пикриновой кислоты растворяют в 100 мл горячей (+70—80 °С) дистиллированной воды (смесь нагревают в водяной бане). Раствор оставляют на сутки при комнатной температуре (для осаждения избытка пикриновой кислоты), после чего его фильтруют. Пикриновая кислота, имеющаяся в продаже, содержит 15—20 % воды, однако сушить

ее не следует — это взрывоопасно! К тому же пикриновая кислота представляет собой сильный яд. Обращаться с ней нужно осторожно.

2. Основной стандартный раствор креатинина — 8,80 ммоль/л. 100 мг креатинина растворяют в 100 мл 0,1 н раствора соляной кислоты. Хранят в холодильнике в посуде с притертой пробкой.

Для определения креатинина сыворотки крови рабочий стандартный раствор получают разведением основного раствора дистиллированной водой в 100 раз (0,088 ммоль/л). 1 мл рабочего раствора креатинина содержит 0,01 мг креатинина. Этот раствор нестойк.

3. Раствор едкого натра — 10 г/100 мл.

4. 0,1 н раствор соляной кислоты.

Ход определения концентрации креатинина в сыворотке крови. 2,0 мл сыворотки смешивают в пробирке с 6,0 мл прозрачного насыщенного раствора пикриновой кислоты. Через 5 мин пробирку помещают на 15—20 с в кипящую водяную баню, затем содержимое пробирки центрифугируют (или фильтруют).

К 4,0 мл центрифугата добавляют 0,2 мл раствора NaOH и все тщательно смешивают. Иногда после подщелачивания раствор мутнеет из-за выпадения фосфатов. В этом случае раствор следует еще раз отцентрифугировать, затем его доводят до объема 10 мл дистиллированной водой.

Через 10 мин пробы колориметрируют при зеленом светофильтре (длина волны — 530 нм; 500—560 нм) в кювете с шириной слоя 20 мм, результаты колориметрирования сравнивают с аналогичными данными контрольных проб. Интенсивность окраски не изменяется в течение часа.

Контрольные пробы готовят следующим образом. К 3,0 мл насыщенного раствора пикриновой кислоты добавляют 0,2 мл раствора NaOH и доводят объем дистиллированной водой до 10 мл.

Стандартную пробу обрабатывают точно так же, как и опытную, с той лишь разницей, что вместо сыворотки берут 2,0 мл рабочего стандартного раствора. Содержимое пробирки не центрифугируют.

Постановку стандартной пробы можно упростить, если исключить этап отбора половинного объема исходного раствора и сразу к 1,0 мл рабочего стандартного раствора креатинина добавить 3,0 мл пикриновой кислоты, 0,2 мл раствора NaOH и 5,8 мл дистиллированной воды.

Рассчитывают концентрацию креатинина по формуле:

$$x \text{ ммоль/л} = \frac{E_{\text{оп.}}}{E_{\text{ст.}}} \cdot 0,088 \text{ ммоль/л.}$$

$$x \text{ мкмоль/л} = \frac{E_{\text{оп.}}}{E_{\text{ст.}}} \cdot 88 \text{ мкмоль/л,}$$

где  $x$  — содержание креатинина в сыворотке крови;  $E_{\text{оп.}}$  — экстинкция опытных проб;  $E_{\text{ст.}}$  — экстинкция стандартных проб (за вычетом значений оптической плотности контрольных проб); 0,088 ммоль/л (88 мкмоль/л) — концентрация креатинина в стандартной пробе.

Концентрацию креатинина в сыворотке крови можно рассчитать по калибровочной кривой (табл. 10). Найденное этим способом содержание креатинина в пробе соответствует таковому в 1 мл сы-



воротки крови (см. ход определения креатинина в сыворотке). Поэтому в табл. 10 приводятся значения пересчета данных в размерности ммоль/л сыворотки крови.

Табл. 10. Данные к построению калибровочной кривой для определения креатинина

№ пробы	Рабочий стандартный раствор креатинина (мл)	Содержание креатинина в пробе (мг)	Раствор пикриновой кислоты (мл)	Раствор NaOH (мл)	Дистиллированная вода	Концентрация креатинина в сыворотке крови (ммоль/л, мкмоль/л)
1	0,4	0,004	3,0	0,2	до объема 10 мл	0,035 (35)
2	0,8	0,008	3,0	0,2	»	0,070 (70)
3	1,6	0,016	3,0	0,2	»	0,140 (140)
4	2,4	0,024	3,0	0,2	»	0,210 (210)
5	3,2	0,032	3,0	0,2	»	0,290 (290)
6	4,0	0,040	3,0	0,2	»	0,360 (360)

Экстинкцию измеряют в условиях, приведенных нами для замера оптической плотности опытных проб. Показания ФЭКа откладывают на оси ординат, концентрацию креатинина — на оси абсцисс. Прямолинейная зависимость сохраняется при концентрации креатинина от 0,026 до 0,440 ммоль/л (26 до 440 мкмоль/л).

Ход определения содержания креатинина в моче. В мерной колбе или в цилиндре объемом 100 мл смешивают 0,5 мл мочи (из суточного количества) с 3,0 мл раствора пикриновой кислоты. Смесь тщательно встряхивают и добавляют к ней 0,2 мл раствора едкого натра. Выдерживают при комнатной температуре в течение 10 мин, доводя дистиллированной водой до объема 100 мл. Экстинкцию измеряют на ФЭКе в кювете с толщиной слоя 10 мм при зеленом светофильтре (длина волны — 530 нм; 500—560 нм), результаты сравнивают с данными контрольных проб.

Контрольные пробы готовят следующим образом. К 3,0 мл раствора пикриновой кислоты добавляют 0,2 мл раствора NaOH, объем смеси доводят дистиллированной водой до 100 мл.

Для получения стандартной пробы к 0,5 мл основного (8,80 ммоль/л) стандартного раствора, содержащего 0,5 мг креатинина, приливают 3,0 мл раствора пикриновой кислоты и 0,2 мл раствора едкого натра. Далее пробы обрабатывают так же, как опытные.

Рассчитывают концентрацию и суточную экскрецию креатинина по соответствующим формулам (1 и 2):

$$x \text{ ммоль/л} = E_{\text{оп.}} / E_{\text{ст.}} \cdot 8,80 \text{ ммоль/л (1),}$$

где  $x$  — концентрация креатинина в моче;  $E_{\text{оп.}}$  — экстинкция опытной пробы;  $E_{\text{ст.}}$  — экстинкция стандартной пробы; 8,80 ммоль/л — концентрация основного стандартного раствора креатинина.



Эту формулу (1) используют при расчете клиренса креатинина:

$$x = (C_{ст.} \cdot E_{оп.} \cdot D) / E_{ст.} \cdot a \quad (2),$$

где  $x$  — количество креатинина в суточной моче (мг);  $C_{ст.}$  — количество креатинина в стандартной пробе (0,5 мг);  $E_{оп.}$  — экстинкция опытной пробы;  $E_{ст.}$  — экстинкция стандартной пробы;  $D$  — суточное количество мочи (мл);  $a$  — количество мочи, взятое для анализа (0,5 мл).

После подставления в формулу значений  $C_{ст.}$  (=0,5 мг) и  $a$  (=0,5 мл) получается:

$$x = (0,5 \cdot E_{оп.} \cdot D) / (E_{ст.} \cdot 0,5) = E_{оп.} / E_{ст.} \cdot D.$$

Для выражения значений суточной экскреции креатинина в г пользуются формулой:

$$x \text{ г/сут} = (E_{оп.} \cdot D) / (E_{ст.} \cdot 1000),$$

где 1000 — коэффициент перевода мг в г.

Поскольку в 1 г креатинина (молекулярная масса 113 дальтон) содержится 8,8 ммоль (1 ммоль = 113 мг) его, то для расчета экскреции креатинина в ммоль/сут формулу преобразуют следующим образом:

$$x_{\text{ммоль/сут}} = \frac{E_{оп.} \cdot D \cdot 8,8}{E_{ст.} \cdot 1000}.$$

Содержание креатинина в суточной моче составляет в норме 0,5—2,0 г, или 4,4—17,6 ммоль/сут, в сыворотке крови: у женщин — от 0,044 до 0,097 ммоль/л (44—97 мкмоль/л), у мужчин — от 0,044 до 0,115 ммоль/л (44—115 мкмоль/л).

**Примечания:** 1. Если концентрация креатинина в сыворотке крови выше 0,360 ммоль/л, то сыворотку разводят физиологическим раствором и полученный по формуле (калибровочному графику) результат умножают на показатель соответствующего разведения.

2. Экстинкцию измеряют не позже чем через 20 мин после прибавления к содержимому пробирок раствора едкого натра.

3. В качестве консервантов для мочи применяют тимол и толуол, которые не влияют на определение креатинина.

4. Белок не мешает исследованию содержания креатинина в моче при концентрации до 1,5 г/100 мл. При большем содержании белка его необходимо предварительно удалить.

5. Если величина экстинкции опытных проб превышает 0,22—0,25, то мочу следует разводить с последующим учетом показателя разбавления.

Чевари, Мештян, Ебст предложили специфичный способ установления концентрации креатинина в сыворотке крови и моче без предварительного осаждения содержащихся в них белков. Известно, что при различных заболеваниях почек высокое содержание белка и глюкозы в моче значительно снижает специфичность реакции Яффе. Для повышения специфичности реакции Яффе указанные авторы при определении содержания креатинина у больных с патологией почек использовали наблюдение Слота, согласно которому цвет креатинин-пикратного комплекса в кислой среде исчезает. Содержание креатинина находят, учитывая разность между величиной экстинкции окрашенного в щелочной среде комплекса и значением оптической плотности пробы после подкисления.

Мешающее влияние белков можно свести к минимуму с помощью На-додецилсульфата и смеси глюкоза — борная кислота.

Как уже указывалось, в нашу страну поставляются наборы реактивов (фирмы «Ляхема», ЧССР), предназначенные для определения креатинина в сыворотке крови и моче. Содержимого каждого набора достаточно для выполнения 100 исследований. Метод не отличается высокой специфичностью, поскольку осаждение креатинина достигается действием трихлоруксусной, а не пикриновой кислоты. Достоинством этого метода является возможность использования специально приготовленного эталонного раствора креатинина. Фирма «Ляхема» поставляет также набор реактивов «Креатинин-эталон». Набор применяют для приготовления стандартных растворов креатинина и построения калибровочных кривых при исследовании концентрации креатинина в биологических жидкостях любым другим, в том числе приведенным нами, методом. При этом нужно обратить внимание на необходимость требуемого заполнения окрашенным раствором кювет фотоэлектроколориметра. Конечный объем окрашенного раствора (2 мл) обычно недостаточен для заполнения большинства фотоэлектроколориметрических кювет с толщиной слоя 10 мм. В этих случаях в зависимости от регистрируемых значений оптической плотности нужно: 1) применить кюветы с меньшей толщиной слоя; 2) увеличить конечный объем раствора до 4—5 мл; 3) пропорционально увеличить (например в 2 раза) объем анализируемой биологической жидкости и всех используемых в процессе выполнения методики реактивов.

#### Определение креатина в крови и моче

Изучение содержания креатина в крови и моче основывается на его свойстве превращаться гидролитическим путем в креатинин. Зная исходный уровень креатинина в пробе и то его количество, которое определяют в аналогичной пробе после превращения в ней креатина в креатинин, по простоте концентрации последнего судят о содержании креатина. При проведении расчетов сначала находят разность между показателями концентрации креатинина, отражающими содержание комплекса креатин—креатинин, и параллельно исследуемого свободного креатинина, а затем разность умножают на 1,16 (1,159) — коэффициент перевода значений содержания креатинина в таковые креатина. Он представляет собой отношение молекулярных масс креатина (131 дальтон) и креатинина (113 дальтон), то есть  $131/113 = 1,16$ . Ответ дают в цифрах, показывающих концентрацию креатина. В норме в сыворотке крови обнаруживается 1—4 мг/100 мл креатина. В моче взрослых людей он отсутствует.

Для перевода креатина в креатинин реакцию осуществляют при высокой температуре в присутствии соляной кислоты. Так, при определении креатина в моче к 0,5 мл ее добавляют равный объем 0,5 н НСl. Пробирку закрывают пробкой и выдерживают 1—2 ч в сушильном шкафу при температуре +60 °С. После извлечения пробирки из шкафа ее содержимое нейтрализуют добавлением нескольких капель 5 г/100 мл раствора NaOH, используя в качестве индикатора рН красную лакмусовую бумажку. Содержимое пробирки сливают в мерную колбу, в которой производят определение креатинина методом, основанным на реакции Яффе.

Превращение креатина в его ангидрид возможно и при подкислении небольшого объема мочи концентрированной НСl и прогревании пробы в кипящей водяной бане в течение 3 мин. Креатин сыворотки

переходит также в креатинин при выдерживании подкисленной (2 н HCl) пробы в сушильном шкафу, нагретом до +130 °С на протяжении 20 мин.

Следовательно, применяемые иногда на практике методы исследования содержания креатина отличаются от способов установления концентрации креатинина лишь тем, что включают в себя предварительный этап гидролитического превращения креатина в креатинин. Однако при этом требуется параллельное определение креатинина.

*Клинико-диагностическое значение исследования концентрации креатинина и креатина в сыворотке крови и моче*

Креатининемия является ценным диагностическим признаком уремии, но, по мнению большинства авторов, не может служить показателем для ранней диагностики заболеваний почек, поскольку нарушение выделения креатинина почками наблюдается лишь при далеко зашедших патологических процессах в них.

Однако некоторые исследователи полагают, что содержание креатинина у больных с острыми нефритами и нефрозами, а также у больных с начинающейся недостаточностью почек в результате нефросклероза может быть повышено у них в крови прежде, чем зафиксировано возрастание уровня остаточного азота, поэтому увеличение концентрации креатинина можно считать ранним показателем почечной недостаточности. Устойчивое повышение креатинина в крови аналогично возрастанию уровня мочевины указывает на нарушение работы почечного фильтра.

Для диагностики поражения почек гораздо большее значение имеет расчет клиренса креатинина (мочевины). Рассчитывают его исходя из знания концентрации этих компонентов остаточного азота в крови и в моче.

Повышенный уровень креатинина в сыворотке крови отмечается не только при почечной недостаточности и прогрессирующих диффузных заболеваниях почек, но также при закупорке мочевых путей, кишечной непроходимости (илеусе), тяжелом диабете, декомпенсации сердца, острой желтой атрофии печени, механической желтухе, гипопункции надпочечников, хлоропривной азотемии, голодании и беременности. Азотемия при простатите не вызывает возрастания уровня креатинина. Понижение уровня наблюдается у больных анемией после назначения АКТГ.

Содержание креатинина в моче зависит от питания. Помимо эндогенного креатинина в моче содержится креатинин экзогенный, поступающий из мясной пищи. Увеличение содержания креатинина в моче отмечается при усиленной мышечной работе, лихорадочных состояниях (происходит повышенный распад белков протоплазмы), пневмонии, выраженной недостаточности функции печени. Понижение его уровня — при мышечной атрофии, голодании, дегенерации почек, амилоидозе почек, лейкемии.

Повышенные величины содержания креатина в сыворотке обнаруживаются у больных с мышечной дистрофией, непроходимостью кишечника (илеусом), декомпенсацией сердца, нефритом, ревматоидным артритом, гипертонией.

Креатин в моче здорового взрослого человека, как правило, отсутствует, появление его в моче называется креатинурией. Возник-

повение ее не всегда связано с какой-либо патологией. Так, у маленьких детей и подростков моча всегда содержит креатин. В определенных количествах он обнаруживается в моче при безуглеводной диете, заживлении обширных переломов, значительных оперативных вмешательствах, после родов (при инволюции матки).

Повышенные величины содержания креатина в моче выявляются также при некоторых заболеваниях, связанных с нарушениями в обмене креатина (при авитаминозе Е, диабете, голодании). Креатинурия обычно наблюдается при усиленном распаде тканей. Так, у больных мышечной дистрофией креатинина в моче содержится значительно меньше, чем в норме, и наряду с этим у них резко повышается концентрация креатина. Усиленная экскреция креатина отмечается у кастратов, евнухов, у больных с паренхиматозными гепатитами и некоторыми другими патологическими состояниями.

Параллельное определение у одного и того же больного концентрации креатинина (или мочевины) в крови и моче значительно расширяет возможности исследования функционального состояния почек, поскольку позволяет получать падежную информацию об интенсивности основных функций нефрона — фильтрации, реабсорбции, секреции, а также почечного кровообращения.

Эти методы основаны на сравнении содержания определенных веществ в крови и моче, поэтому и были названы геморенальными пробами.

### ГЕМОРЕНАЛЬНЫЕ ПРОБЫ

Для характеристики очистительной способности почек пользуются условным показателем, который называется коэффициентом очищения (клиренс — по определению американских авторов). Например, имеется вещество, концентрация которого в моче равна  $U$ , а в плазме —  $P$ . Пусть диурез в 1 мин выражается через  $V$ . Тогда с мочой за 1 мин выделится  $UV$  данного вещества. Если эту величину разделить на концентрацию вещества в плазме, получится объем плазмы ( $C$ ), который содержал  $UV$  вещества:

$$C = \frac{UV}{P}.$$

Величина  $C$  и есть коэффициент очищения (клиренс), показывающий, какой объем плазмы полностью очищается от данного вещества за 1 мин. Разумеется, эта величина носит условный характер, так как в большинстве случаев очищению (но не полному) подвергается больше плазмы. Если искать реальный смысл, то коэффициент очищения — это тот объем плазмы, который содержит выделяемое почками за 1 мин количество вещества. Но это не снижает ценности коэффициента очищения как показателя очистительной способности почек по отношению к данному веществу.

Величина  $\frac{U}{P}$  свидетельствует о том, во сколько раз концентрируется данное вещество в почках, и называется концентрационным индексом ( $K$ ). Поэтому приведенную выше формулу можно выразить по-другому:

$$C = K \cdot U.$$

## Клубочковая фильтрация и канальцевая реабсорбция

Рассмотренное понятие о коэффициенте очищения позволяет дать количественную оценку основным процессам, происходящим в нефроне, и прежде всего начальному процессу — клубочковой фильтрации.

Допустим, что вещество  $a$ , находящееся в плазме в концентрации  $P_a$ , фильтруется вместе с плазмой в клубочках, совершенно не реабсорбируясь и не секретирясь в канальцах. В результате реабсорбции воды моча сгущается и концентрация данного вещества в ней оказывается равной  $U_a$ . Тогда в моче, выделенной в единицу времени, должно содержаться столько вещества, сколько его за такое же время профильтровалось с первичной мочой, то есть:

$$U_a Y = P_a F,$$

где  $Y$  — диурез (мл) в 1 мин;  $F$  — фильтрация (мл) в 1 мин. Отсюда:

$$F = U_a / P_a \cdot Y.$$

При сравнении этой формулы с приведенной выше формулой очищения видно, что их правые части равны. Следовательно, фильтрация равна коэффициенту очищения вещества.

По разности между объемами профильтровавшейся в 1 мин жидкости и выделенной за это время мочи легко вычислить объем реабсорбированной воды; его обычно выражают в процентах к фильтрации (%).

$$R = (F - Y) / F \cdot 100.$$

Рассматриваемую формулу можно преобразовать, поставив вместо  $F$  произведение  $KY$ , где  $K$  — концентрационный индекс данного вещества:

$$R\% = (KY - Y) / KY \cdot 100 = Y(K - 1) / KY \cdot 100 = (K - 1) / K \cdot 100$$

Следовательно, для вычисления показателя реабсорбции достаточно исходить из знания величины концентрационного индекса, что значительно упрощает расчет. Этим способом можно находить процент реабсорбции исходя лишь из величины концентрации определяемого вещества в крови и моче. Поэтому, если исследователя интересует только реабсорбция, становится ненужным точный сбор мочи, необходимый для расчета показателей клубочковой фильтрации.

Изучению веществ, которые выделяются почками исключительно путем фильтрации и удовлетворяют некоторым дополнительным требованиям (не распадаются и не синтезируются в почках, не оказывают побочного действия), посвящена обширная литература.

Впервые для определения величины фильтрации Реберг предложил исследовать концентрацию эндогенного креатинина в крови и моче, в связи с чем основанный на этом принципе способ расчета клубочковой фильтрации нередко называют пробой Реберга.

Е. М. Таресв и Н. А. Ратнер (1936) показали, что эндогенный креатинин не секретирется канальцами, поэтому величины фильтрации, полученные в таких условиях, оказываются идентичными вычисленным по нулину (веществу, ставшему классическим при определении фильтрации).

Учитывая относительное постоянство концентрации эндогенного креатинина в крови, ряд авторов ограничивается лишь нахождением величины его суточной фильтрации, затем по концентрации креатини-

на в суточной порции мочи определяет концентрационный индекс и умножает его на величину суточного диуреза в л. Этот простой способ во многих случаях, например при длительном контроле за функцией почек, является весьма рациональным.

### Проба Реберга

**Проведение пробы.** Обследуемый натощак выпивает 400—500 мл воды или слабого чая и мочится (эту порцию мочи выливают). Время мочеиспускания точно отмечают. Ровно через 1 ч собирают мочу (полностью). В середине этого часа пунктируют локтевую вену обследуемого и получают 5—8 мл крови. По объему собранной мочи устанавливают минутный диурез. В крови и моче определяют концентрацию креатинина. Фильтрацию и реабсорбцию рассчитывают по формулам:

Клубочковая фильтрация (мл/мин) =  $C_m / C_k \cdot$  минутный диурез, где  $C_m$  и  $C_k$  — концентрация креатинина в моче и крови, выраженная в новой или старой (мг %) размерности.

Реабсорбция (%) = [(клубочковая фильтрация — минутный диурез) / клубочковая фильтрация] · 100, или

$$R \% = (K - 1) / K \cdot 100,$$

где  $K$  — концентрационный индекс.

Клубочковая фильтрация в норме составляет 80—120 мл/мин, реабсорбция — 97—99 %.

### Определение коэффициента очищения от мочевины

Коэффициент очищения от мочевины несколько ниже величины фильтрации, так как в отличие от рассмотренных выше веществ, применяемых для определения фильтрации, мочевина частично реабсорбируется (вернее, подвергается обратной диффузии) в канальцах. В связи с этим коэффициент очищения от мочевины практически не зависит от величины диуреза только в том случае, если последний достаточно высок (не менее 2 мл в 1 мин для человека). Тогда он может являться мерой фильтрации, составляя около 2/3 ее величины. Установленный при этих условиях клиренс известен под названием максимальный. В остальных случаях чем ниже диурез, тем меньше получаемая величина, так как при замедленном токе мочи по канальцам мочевины активной диффундирует в перитубулярную жидкость, где ее концентрация ниже. Поэтому в клинике при среднем и умеренно низком диурезе пользуются видоизмененной формулой, в которой вместо показателя минутного диуреза дается его квадратный корень. Величина очищения становится условной и называется стандартной.

Проведение пробы такое же, как и при определении коэффициента очищения от креатинина (см. пробу Реберга).

При диурезе, превышающем 2,0 мл, рассчитывают максимальный клиренс мочевины по формуле:

$$C_{\text{макс.}} = \frac{U_{\text{мочев.}}}{P_{\text{мочев.}}} \cdot V.$$

При минутном диурезе, не превышающем 2 мл, определяют стандартный клиренс мочевины по формуле:

$$C_{\text{станд.}} = \frac{U_{\text{мочев.}}}{P_{\text{мочев.}}} \cdot \sqrt{V},$$

где  $C_{\text{макс.}}$  — максимальный;  $C_{\text{станд.}}$  — стандартный клиренс мочевины;  $U$  — концентрация мочевины в моче;  $P$  — концентрация мочевины в плазме (сыворотке) крови;  $V$  — диурез (мл/мин);  $\sqrt{V}$  — квадратный корень из величины минутного диуреза.

В норме максимальный клиренс мочевины составляет 64—99 мл/мин, в среднем — 75 мл/мин, стандартный клиренс мочевины — 40—63 мл/мин, в среднем — 54 мл/мин.

Указанные средние величины принимают за 100 %. Степень отклонения от них является показателем функции почек. У здоровых людей показатели клиренса мочевины не бывают ниже 75 %.

Установлено, что мочеви́на, проходя по канальцам, реабсорбируется в количестве не менее 25—40 %. В связи с этим коэффициент очищения может служить показателем фильтрации только в известной степени, при условиях, исключающих усиление канальцевой реабсорбции мочевины (олигурическая фаза острого нефрита, нефротический синдром, острая почечная недостаточность, сердечная и сосудистая недостаточность).

## АМИННЫЙ АЗОТ

Свободный аминный азот (аминоазот) представляет собой азот свободных аминокислот, содержащихся в сыворотке (плазме) крови (в отличие от общего аминного азота, включающего также азот сложных полипептидов и белков).

Для определения концентрации аминоазота применяют ряд методов: а) формоловое титрование по Сёрпсену, основанное на титровании карбоксильных групп аминокислот щелочью после предварительного блокирования аминогрупп формальдегидом;

б) газометрическое определение — по выделению свободного азота при действии азотистой кислотой на первичные группы аминокислот. Исследование проводится обычно в аппарате Цуверкалова, имеет ряд преимуществ перед методом формолового титрования;

в) метод, основанный на способности аминокислот реагировать со взвесью фосфата меди с образованием медных комплексов, количественно разлагающихся диэтилдитиокарбаматом натрия, в результате реакции раствор приобретает желтую окраску;

г) установление содержания аминоазота по реакции аминокислот с нипгидрином (самый распространенный метод);

д) определение концентрации аминоазота по количеству образующегося при дезаминировании свободных аминокислот аммиака.

О повышенном содержании аминокислот в крови можно судить и по уровню резидуального азота (фракции остаточного азота без азота мочевины). Как известно, возрастание уровня резидуального азота связано главным образом с увеличением содержания аминокислот в крови.

**Определение свободного аминного азота  
в сыворотке крови (по методу Г. А. Узбекова  
в модификации З. С. Чулковой)**

**Принцип.** Содержание аминоказота определяют колориметрически по интенсивности окрашивания комплекса, образующегося за счет взаимодействия аминокрупп с нингидриновым реактивом.

**Реактивы.** 1. 0,04 н раствор уксусной кислоты — 0,23 мл ледяной  $\text{CH}_3\text{COOH}$  на 100 мл воды.

2. Водный раствор нингидрина — 1 г/100 мл.

Ход определения складывается из нескольких этапов: 1. Осаждение белков. Центрифужную пробирку с внесенными в нее 0,5 мл сыворотки и 0,5 мл раствора  $\text{CH}_3\text{COOH}$  прикрывают пробкой и помещают в холодную водяную баню, воду в которой доводят до кипения. Пробы прогревают в течение 5 мин (время отмечают с момента закипания воды). Затем пробирки охлаждают и приступают к фильтрованию смеси.

2. Фильтрация. К содержимому пробирок добавляют по 1 мл дистиллированной воды и после перемешивания растворов тонкой стеклянной палочкой производят их фильтрацию через гладкий бумажный фильтр. Пробирку и осадок на фильтре промывают еще 2 раза, каждый раз используя для этого по 1 мл воды, после чего основной фильтрат и обе порции промывных вод объединяют в одну пробирку с меткой, соответствующей 10 мл.

3. Цветная реакция с нингидрином. К полученному фильтрату добавляют 0,5 мл раствора нингидрина, содержимое пробы перемешивают и на 20 мин помещают пробирку в кипящую водяную баню. По истечении срока прогревания пробирку охлаждают в токе водопроводной воды, оставляют стоять 5 мин при комнатной температуре и доводят дистиллированной водой до 10 мл (по метке на пробирке).

Параллельно ставят контрольную пробу на реактивы. Для этого к 3 мл дистиллированной воды добавляют 0,5 мл раствора  $\text{CH}_3\text{COOH}$ , 0,5 мл раствора нингидрина и после перемешивания раствор 20 мин прогревают на кипящей водяной бане, затем охлаждают и доводят водой до 10 мл.

**Примечание.** Установлено, что в качестве контрольной пробы можно использовать одну дистиллированную воду.

4. Колориметрия. Оптическую плотность измеряют на ФЭКе при зеленом светофильтре (длина волны — 536 нм) в кювете с толщиной слоя 5 мм, результаты сравнивают с аналогичными данными контрольной пробы или воды.

5. Расчет производят по формуле путем сравнения показаний экстинкций опытной и стандартной проб.

$$E_{\text{оп.}} - C_{\text{оп.}}$$

$$E_{\text{ст.}} - C_{\text{ст.}}$$

$$C_{\text{оп.}} = (E_{\text{оп.}} \cdot C_{\text{ст.}}) / E_{\text{ст.}}$$

где  $E_{\text{оп.}}$  и  $E_{\text{ст.}}$  — значение концентрации опытной и стандартной проб;  
 $C_{\text{ст.}}$  — содержание мкг N в 0,5 мл стандартного раствора аланина,



получаемого внесением 12,86 мг аланина в 100 мл воды (готовят перед применением). Стандартный раствор в концентрации 12,86 мг/100 мл содержит 0,128 мг аланина в 1 мл, или 0,064 мг (64 мкг) в 0,5 мл. Если исходить из того, что молекулярная масса аланина составляет 90 дальтон, а в 1 молекуле аминокислоты находится 1 атом N (14 дальтон), то исходя из отношения молекулярной и атомной масс  $90/14=6,4$  можно определить, что 64 мкг аланина будут содержать 10 мкг N.

0,5 мл приготовленного стандартного раствора аланина обрабатывают точно так же, как 0,5 мл сыворотки крови (см. ход определения).

Для перевода результатов в г/л найденное количество мкг азота умножают на 2000 (для пересчета мкг азота на 1 л биологической жидкости) и делят на  $10^6$  (для перевода мкг в г), то есть умножают на 0,002 или делят на 500 (в случае, если для опыта берут 0,5 мл исследуемой сыворотки). Конечная формула, используемая для расчета, приобретает следующий вид:

$$x \text{ г/л} = C_{\text{оп.}} \cdot 0,002, \text{ или } x \text{ г/л} = C_{\text{оп.}}/500,$$

где  $x$  — содержание аминокислот азота в сыворотке крови (г/л);  $C_{\text{оп.}}$  — содержание аминокислот азота (мкг) в стандартной пробе.

В норме концентрация аминокислот азота в сыворотке крови составляет 0,020—0,050 г/л.

Предложен также нетрудоемкий точный метод, основанный на определении аминокислот азота способом перегонки образующегося при дезаминировании аминокислот аммиака с последующим проведением цветной реакции и фотометрией.

#### Определение азота свободных аминокислот сыворотки крови по содержанию перегнанного аммиака

Ход определения. Дезаминирование осуществляют во флаконах объемом 20 мл. К пробе добавляют 0,4 мл 2 н раствора уксуснокислого натрия, 0,5 мл раствора нингидрина (3 г/100 мл) и 0,05 мл раствора аскорбиновой кислоты (0,5 г/100 мл). Смесь в течение 10 мин нагревают на кипящей водяной бане. Затем приливают 1 мл 2 н соляной кислоты и еще раз помещают смесь в водяную баню на 10 мин, после чего добавляют 0,1 мл раствора перекиси водорода (30 г/100 мл) и содержимое пробы вновь нагревают на водяной бане в течение 5 мин. Во флакон с пробой вносят 0,7 мл 10 н NaOH и быстро закрывают его резиновой пробкой, в которую вставлена стеклянная палочка с каплей 1 н серной кислоты на конце (акцептор аммиака). Флакон вращают на ротаторе (конструкции Бигина с соавт., 1967) на протяжении 60 мин (диаметр диска ротатора — 300 мм, скорость его вращения — 30 об/мин).

Далее стеклянную палочку, на конце которой собран выделившийся аммиак, помещают в раствор, состоящий из 4 мл воды и 0,5 мл реактива Несслера. Окрашенный раствор фотометрируют при 475 мн на ФЭКе в кювете с толщиной слоя 10 мм.

Калибровочные растворы аминокислот, содержащие 8, 20 и 30 мкг аминокислот азота в 1 мл, готовят на 0,3 н хлорной кислоте.

## Клинико-диагностическое значение исследования концентрации свободного аминокислота сыворотки крови

По данным А. А. Покровского, возрастание уровня аминокислот происходит у человека после приема белков с пищей, возвращение аминокислот к исходному уровню протекает в течение 4 ч. Экскреция аминокислот с мочой повышается во время беременности вследствие снижения почечного порога. У новорожденных обычно отмечается аминоацидурия, которая постепенно исчезает. При избыточном потреблении мяса у людей увеличивается экскреция гистидина и метилгистидина, при недостаточном питании — бета-аминоизомасляной кислоты.

Увеличение содержания аминокислот в крови наблюдается у больных с печеночной комой, эпидемическим гепатитом и острой желтой атрофией печени, отравлением фосфором, фенилгидразином, четыреххлористым углеродом, хлороформом, квашинкором, желтой лихорадкой, эклампсией, истощающими поносами, тяжелыми ожогами, шоком, сахарным диабетом с кетозом, после кровотечений. Легкое повышение содержания аминокислот в крови может быть при острых инфекциях, гипертиреозидизме, сердечной недостаточности с застойными явлениями, в некоторых случаях анемии, после введения АКГГ, кортизона, при миелонидной лейкемии. У больных с фенолкетонурией возрастает содержание фенилаланина.

Уменьшение содержания аминокислот в крови отмечается у больных с нефрозами, после введения глюкозы, инсулина, гормона роста, андрогенов.

### МОЧЕВАЯ КИСЛОТА

Мочевая кислота — главный продукт обмена пуриновых оснований, входящих в состав сложных белков — нуклеопротеидов; она является 2,6,8-триоксипурином.

Качественной реакцией на мочевую кислоту служит мурексидная проба, основанная на образовании мурексида — аммонийной соли пурпуровой кислоты красного цвета.

Количественное определение содержания мочевой кислоты в крови и моче связано со значительными трудностями. Этим и объясняется то обстоятельство, что к настоящему времени исследованием содержания мочевой кислоты в биологических жидкостях и тканях занимаются не все клинико-диагностические лаборатории.

Существующие методы определения концентрации мочевой кислоты можно разделить на несколько групп: I. Химические (колориметрические), основанные на: 1) способности мочевой кислоты восстанавливать фосфорновольфрамовую, мышьякомolibденовую кислоты, железосинеродистый калий и некоторые другие вещества; 2) прямом фотометрическом определении концентрации мочевой кислоты по реакции с реактивом Фолина, Дениса; 3) исследовании содержания мочевой кислоты по фенолгипохлоритной реакции.

II. Энзиматические (уриказные) методы.

III. Методы, базирующиеся на абсорбции мочевой кислоты при 293 нм (прямая спектрофотометрия — Marimont, London, 1964).

Методы первой группы, предложенные в 1912 г. Folin и Denis, не-

специфичны, поскольку кроме мочевой кислоты восстанавливающими свойствами обладают аскорбиновая кислота, тирозин, триптофан, инстин, цистеин. Широкое использование цианиддифосфатовольфрамового способа сдерживается токсичностью цианистого калия, который нередко вводят с целью увеличения интенсивности окраски раствора, предупреждения ее выцветания, а также предотвращения выпадения солей мочевой кислоты в осадок. Кроме того, для стабилизации образующегося при взаимодействии мочевой кислоты с железосодержащим калием комплекса «берлинская лазурь», необходимы импортные реактивы — гуммигати, гуммиарабик.

С 1930 г. стали применяться методы определения концентрации мочевой кислоты, базирующиеся на прямой реакции между нею и реактивом Фолина. Недостатком этих методов является их низкая специфичность.

Прямое спектрофотометрическое исследование мочевой кислоты в сыворотке крови основано на поглощении мочевой кислотой ультрафиолетовых лучей в зоне 282—295 нм. Максимум поглощения зависит от pH среды.

Наиболее специфичные и точные — ферментные методы определения содержания мочевой кислоты. Мочевая кислота расщепляется уриказой до аллантоина,  $\text{CO}_2$  и  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Результаты реакции можно учитывать: 1) измерением потребления кислорода, на что требуется специальная измерительная аппаратура;

2) регистрацией абсорбции мочевой кислоты при 293 нм (в этой области спектра аллантоин оптически прозрачен);

3) определением образовавшейся перекиси водорода. Перекись водорода под влиянием каталазы превращает метанол в формальдегид, который в дальнейшем обнаруживается специальной реакцией. Данный принцип положен в основу фотометрического исследования мочевой кислоты наборами реактивов фирмы «Boehringer» (ФРГ);

4) введением в систему еще одного фермента — альдегиддегидрогеназы, что значительно ускоряет и упрощает осуществление реакции.

Триведи с соавт. (1978) предложили для определения концентрации мочевой кислоты новый энзиматический метод. Он состоит в ферментативном превращении мочевой кислоты в аллантоин и перекись водорода, которая в присутствии каталазы вступает в реакцию с этанолом. Образующийся при этом ацетальдегид восстанавливается НАД· $\text{H}_2$ , что сопровождается уменьшением светопоглощения при 340 нм. Количество окисленного НАД пропорционально содержанию мочевой кислоты в анализируемой пробе. Рассматриваемый энзимный метод отличается высокой специфичностью и простотой исполнения, к тому же он не требует особых кювет и выполняется в течение короткого промежутка времени.

Все ферментные методы связаны с необходимостью применения кристаллических ферментов, в частности уриказы; это ограничивает их распространение в клинических лабораториях.

На ферментативном принципе основан метод исследования мочевой кислоты потенциометрическим электродом с иммобилизованной уриказой.

В последние годы разработано энзиматическое спектрофлуориметрическое определение содержания мочевой кислоты, в частности, связанное с использованием р-гидроксибензилуксусной кислоты в качестве флюорофора.

Описан calorиметрический ферментный метод; он состоит в из-

количества теплоты, образованной в процессе прохождения химической реакции с участием ферментов уриказы и каталазы.

Содержание мочевой кислоты исследуют также методом жидкостной хроматографии. Для повышения специфичности метода применяют ионообменную хроматографию с дальнейшим определением содержания мочевой кислоты фосфорновольфрамовыми, уриказными, спектрофотометрическими способами. Ввиду доступности наибольшее распространение получили фосфорновольфрамовые методы. Низкая их специфичность повышается использованием уриказы, цианидов (растворы цианидов весьма токсичны и к тому же нестабильны), инкубацией сыворотки с карбонатами, хранением сыворотки в холодильнике не более 3 дней и другими способами.

Ряд авторов проводили параллельное определение мочевой кислоты фосфорновольфрамовыми и уриказными методами. Так, Генри (1974) показал высокую степень корреляции между фосфорновольфрамовыми и уриказными методами.

Фосфорновольфрамовый карбонатный метод имеет примерно одинаковую чувствительность с фосфорновольфрамовым цианидным способом, однако уриказные методы — более чувствительны.

Таким образом, из разнообразных групп методов наиболее чувствительные и специфичные уриказные, которые и предложены в качестве референтных. Однако исходя из технико-экономических критериев для практической работы в клинико-диагностических лабораториях в качестве унифицированного рекомендуется фосфорновольфрамовый карбонатный метод по Генри, Собелю и Киму (1957). В дальнейшем в клинико-диагностических лабораториях для исследования мочевой кислоты будет осуществлен переход на уриказные методы.

#### Определение мочевой кислоты в сыворотке крови унифицированным фосфорновольфрамовым методом

**Принцип.** Мочевая кислота восстанавливает фосфорновольфрамовый реактив с образованием комплекса голубого цвета. Интенсивность его окраски пропорциональна содержанию в пробе мочевой кислоты.

**Реактивы.** 1. 0,7 н серная кислота. 10,0 мл концентрированной серной кислоты вносят в мерную колбу на 500,0 мл, содержащую небольшое количество дистиллированной воды. После тщательного перемешивания объем доводят дистиллированной водой до метки.

2. Раствор вольфрамвокислого натрия. 50,0 г вольфрамвокислого натрия ( $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) помещают в мерную колбу на 500,0 мл с небольшим объемом дистиллированной воды, после чего приливают ее до метки.

3. Раствор углекислого натрия. 51,5 г углекислого натрия ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) растворяют в мерной на 500 мл колбе в 300—400 мл дистиллированной воды и доводят объем дистиллированной водой до метки.

4. Фосфорновольфрамовый реактив. В круглодонную колбу (объем — 1500 мл) вносят 40,0 г  $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  и 300,0 мл дистиллированной воды. Добавляют в смесь 32,0 мл ортофосфорной кислоты (85 г/100 мл) и несколько стеклянных бусинок. Вставляют в колбу обратный холодильник и осторожно кипятят ее содержимое в тече-

ше 2 ч на песчаной или глицериновой бане. Охлаждают раствор при комнатной температуре и доводят его объем дистиллированной водой до 1 л. Затем в колбе растворяют 32,0 г сернокислого лития ( $\text{Li}_2\text{SO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ). Реактив хранят в темной бутылки в холодильнике. Раствор стабилен длительное время.

5. Основной стандартный (калибровочный) раствор — 100 мг/100 мл. В мерной колбе на 100,0 мл растворяют 0,6 г углекислого лития ( $\text{Li}_2\text{CO}_3$ ) в 50,0 мл дистиллированной воды при нагревании смеси до 60 °С. Добавляют 100 мг мочевого кислоты и содержимое колбы тщательно перемешивают до полного растворения внесенных компонентов. Затем вливают в нее 2,0 мл формалина и 0,15 мл ледяной уксусной кислоты. Содержимое колбы перемешивают и доводят объем дистиллированной водой до метки. Реактив хранят в темной посуде в холодильнике в течение 2 лет. 1 мл раствора содержит 1,0 мг мочевого кислоты.

6. Рабочий стандартный раствор. 1,0 мл основного калибровочного раствора доводят до 200 мл дистиллированной водой. 1 мл раствора содержит 0,005 мг мочевого кислоты. Рабочий стандартный раствор при хранении в холодильнике годен в течение двух недель.

Ход определения. В пробирку вносят 8,0 мл воды, 1,0 мл сыворотки, 0,5 мл раствора серной кислоты и содержимое пробирки перемешивают, затем добавляют 0,5 мл раствора вольфрамовокислого натрия и после тщательного перемешивания через 5—10 мин смесь фильтруют посредством бумажного фильтра. 3,0 мл полученного фильтрата используют для анализа.

В две другие пробирки отмеривают 3,0 мл дистиллированной воды (холостая проба) и 3,0 мл рабочего стандартного раствора.

В каждую пробирку вливают 1,5 мл раствора углекислого натрия, содержимое пробирки перемешивают и вносят в нее 1,0 мл фосфорновольфрамового реактива. Раствор взбалтывают вновь переворачиванием пробирки. Через 30 мин измеряют его оптическую плотность в кювете с шириной слоя 10 мм при длине волны 590—700 нм (красный светофильтр ФЭКа). Показатели экстинкции опытной и стандартной проб сопоставляют с оптической плотностью холостой (контрольной) пробы. Расчет ведут по формулам:

$$\text{Мочевая кислота (мг/100 мл)} = \frac{E_{\text{оп.}} \cdot C_{\text{ст.}} \cdot 10}{E_{\text{ст.}}} = \frac{E_{\text{оп.}} \cdot 5}{E_{\text{ст.}}}$$

$$\text{Мочевая кислота (ммоль/л)} = \frac{E_{\text{оп.}} \cdot C_{\text{ст.}} \cdot 10}{E_{\text{ст.}}} \cdot 0,059 = \frac{E_{\text{оп.}} \cdot 5}{E_{\text{ст.}}} \cdot 0,059,$$

где  $E_{\text{оп.}}$  — экстинкция опытной пробы;  $E_{\text{ст.}}$  — экстинкция стандартной пробы (за вычетом оптической плотности контрольной пробы);  $C_{\text{ст.}}$  — концентрация стандартного раствора 0,5 г/100 мл; 0,059 — коэффициент пересчета в единицы СИ; 10 — коэффициент пересчета на сыворотку: в опытную пробу берут 10,3 мл сыворотки, то есть в 10 раз меньше, чем в стандартную.

Установленная данным методом концентрация мочевого кислоты в сыворотке крови практически здоровых людей в возрасте от 20 до 49 лет колеблется в пределах 0,236—0,500 ммоль/л (4,0—8,5 мг/100 мл) у мужчин и 0,165—0,442 ммоль/л (2,8—7,5 мг/100 мл) у женщин.

## Определение мочевой кислоты по методу Мюллера — Зейферта

На кафедре клинической лабораторной диагностики БелГИУВа успешное испытание прошел метод определения мочевой кислоты по Мюллеру — Зейферту.

**Принцип метода** основан на колориметрировании окрашенных продуктов, образующихся при восстановлении фосфорновольфрамового реактива мочевой кислотой.

**Реактивы.** 1. Реактив Фоллина. 100 г х.ч. вольфрамата натрия растворяют в 750 мл дистиллированной воды в колбе Эрленмейера и при постоянном помешивании раствора добавляют в него 80 мл ортофосфорной кислоты ( $H_3PO_4$ ), 85 г/100 мл. Затем содержимое колбы с установленным в нее обратным холодильником кипятят в течение 4—6 ч, раствор при этом из желтоватого становится бесцветным. Если смесь не обесцвечивается (что бывает редко), в колбу приливают небольшое количество брома (1—2 капли). Для удаления его избытка раствор следует прокипятить 10—15 мин. Из колбы Эрленмейера смесь переливают в мерную колбу и доводят дистиллированной водой до метки 1 л. Реактив стоек.

2. Трихлоруксусная кислота — 20 г/100 мл.

3. Стандартный раствор мочевой кислоты. На аналитических весах отвешивают 100 мг мочевой кислоты, и всю меру помещают в колбу на 500 мл. Затем в нее добавляют 25 мл раствора углекислого лития ( $Li_2CO_3$ , 0,5 г/100 мл), 25 мл дистиллированной воды и после растворения мочевой кислоты доводят содержимое колбы дистиллированной водой до метки, предварительно прибавив в раствор для стойкости 12,5 мл формалина. Хранить в холодильнике в течение месяца.

Из основного (20 мг/100 мл) стандартного раствора готовят рабочий раствор (2 мг/100 мл), разводя основной в 10 раз. Рабочий раствор нестойкий и может сохраняться лишь в течение 2—3 дней. 1 мл его содержит 0,02 мг мочевой кислоты.

4. Насыщенный раствор углекислого натрия ( $Na_2CO_3$ ).

**Ход определения.** В центрифужную пробирку вносят 1,5 мл сыворотки, 1,5 мл дистиллированной воды и 1,5 мл трихлоруксусной кислоты. Содержимое пробы тщательно перемешивают и через 30 мин центрифугируют. Дальнейший порядок работы показан в табл. 11.

Табл. 11. Данные к методике исследования мочевой кислоты

Реактивы	Опыт	Стандарт
Центрифугат, соответствующий 0,5 мл сыворотки	1,5 мл	—
Стандартный рабочий раствор	—	0,5 мл
Трихлоруксусная кислота	—	0,5 мл
Дистиллированная вода	—	0,5 мл
Насыщенный раствор соды ( $Na_2CO_3$ )	0,7 мл	0,7 мл
Реактив Фоллина	1 капля	1 капля

Через 10 мин обе пробы колориметрируют на ФЭКе при зеленом светофилтре в кювете с шириной слоя 5 мм, используя для сравнения дистиллированную воду.

Расчет производят по формуле:

$$C_x = (C_{ст.} \cdot E_{оп.}) / E_{ст.},$$

где  $C_x$  — это концентрация мочевой кислоты в сыворотке (мг/100 мл);  $C_{ст.}$  — концентрация мочевой кислоты в стандартной пробе;  $E_{оп.}$  — оптическая плотность опытной пробы;  $E_{ст.}$  — оптическая плотность стандартной пробы.

Для преобразования старой размерности единиц в новую полученный результат ( $C_x$ ) умножают на коэффициент 0,0590:  $C_x \cdot 0,0590 = a$  ммоль/л.

Примечания: 1. Расчет можно производить и по калибровочной кривой. Для ее построения готовят стандартный раствор мочевой кислоты: к 500 мг мочевой кислоты, внесенной в мерную колбу на 500 мл, добавляют 75 мл 0,4 г/100 мл раствора углекислого лития, 20 мл формалина и около 250 мл воды. Смесь тщательно перемешивают, приливают к ней 6,25 мл 2 н  $H_2SO_4$  и объем доводят до метки дистиллированной водой. Полученный стандартный раствор мочевой кислоты имеет концентрацию 100 мг/100 мл. При хранении в холодильнике он стоек в течение нескольких недель.

Для построения калибровочной кривой из основного стандартного раствора готовят серию разведений с концентрацией 0,5; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0; 6,0 мг/100 мл мочевой кислоты. С целью перевода значений из размерности мг/100 мл в размерность ммоль/л полученные показатели умножают на 0,0590.

2. Перед анализом больной 3 дня не должен принимать пищу, содержащую пуриновые основания и жиры.

Норма содержания мочевой кислоты в сыворотке крови — 0,12—0,24 ммоль/л (0,02—0,04 г/л, 2—4 мг/100 мл).

Киев приводит более высокие показатели нормы содержания мочевой кислоты в сыворотке крови — 0,04—0,06 г/л. По его мнению, у мужчин верхней границей нормы является 0,06—0,07 г/л, у женщин — 0,05—0,06 г/л.

У больных с достоверно диагностированной подагрой почти всегда значения мочевой кислоты превышают 0,075—0,08 г/л, а при образовании у них подагрических узелков содержание ее редко бывает ниже 0,08—0,09 г/л (эти цифры отмечаются у не леченных медикаментозными средствами больных).

При наличии в лаборатории спектрофотометра типа СФ-4, СФ-4А, СФ-16, СФ-26 и других рекомендуется проводить исследование мочевой кислоты по Мармонту и Лондону. В широкую пробирку (2,5 × 9 см) вносят 0,3 мл сыворотки, пробирку помещают на 2 мин в кипящую водяную баню. После охлаждения в нее добавляют 3 мл воды и ступок экстрагируют при +37 °С в течение часа. Весь объем жидкости вводят в кювету спектрофотометра, с помощью которого выделяют длину волны 289 нм.

Концентрацию мочевой кислоты рассчитывают по калибровочной кривой, строящейся по общеизвестным принципам. Однако через все этапы метода вместо 0,3 мл сыворотки проводят стандартные пробы мочевой кислоты с концентрацией 0,5; 1,0; 3,0; 4,0; 5,0; 6,0 мг/100 мл (приготовление стандартного раствора аналогично таковому для предыдущего метода). Ответ дают в ммоль/л.

Примечания: 1. Несмотря на то, что пуриновая нагрузка не способствует быстрому увеличению содержания мочевой кислоты в крови, все же за 1—3 дня до определения этого показателя обследуемым рекомендуется принимать бедную пуринами пищу.



2. Сыворотку нужно использовать для анализа не позднее чем через 6 ч с момента взятия крови.

3. Нельзя применять гемолизировавшую сыворотку, так как в случае гемолиза получаются неверные значения уровня мочевой кислоты.

4. Перед определением мочевой кислоты больным запрещается принимать влияющие на исследование медикаментозные средства, такие как: а) производные пурина — кофеин, теобромин, теofilлин; б) производные фенола — крезат, салицилаты и другие; в) витамин С, антидиабетические сульфаниламидные препараты и производные тиазола.

При определении содержания мочевой кислоты ферментным методом прием обследуемыми производных фенола и витамина С не отражается на полученных результатах.

### *Клинико-диагностическое значение исследования концентрации мочевой кислоты*

Определение концентрации мочевой кислоты имеет особое значение для диагностики начальных стадий поражения почек и подагры.

Считается, что у больных с поражением клубочков почки (острый и хронический нефрит, первично и вторично сморщенная почка) в первую очередь страдает выделение мочевой кислоты и индикана, вследствие чего у них наблюдается гиперурикемия; очаговые нефриты и нефрозы не вызывают нарушений выделения мочевой кислоты.

Гиперурикемия может быть и непочечного происхождения. Уже указывалось, что резкое увеличение концентрации мочевой кислоты отмечается у больных с подагрой (первичной гиперурикемией) — заболеванием, связанным с нарушением обмена нуклеопротеидов. При этом заболевании наблюдается отложение солей мочевой кислоты в суставах и в различных тканях тела. Уменьшение экскреции мочевой кислоты способствует большему ее накоплению в плазме крови.

Много мочевой кислоты обнаруживается в крови и моче при патологических состояниях, протекающих с усиленным распадом нуклеопротеидов. Причинами такой вторичной гиперурикемии могут быть некоторые гематологические заболевания: миелоидная метаплазия, гемоглобинопатия (талассемия), полицитемия, эритремия, пернициозная анемия, гемолитическая желтуха, злокачественная анемия в стадии ремиссии; злокачественные заболевания: лейкозы, множественная миелома, лимфома, лейкомия после облучения рентгеновскими лучами, лейкопения; сердечно-сосудистые заболевания: артериальная гипертония, инфаркт миокарда, сердечная недостаточность; печеночная недостаточность, диабет, голодание.

Вторичная гиперурикемия встречается у больных эндокринными и обменными заболеваниями: гипо- и гиперпаратиреоидизмом, микседемой, ожирением, диабетическим кетоацидозом, голоданием, алкоголизмом, III типом гиперлипипропротеидемии; у больных с почечными заболеваниями: уремией, предэклампсией, а также у больных с некоторыми другими патологическими состояниями: саркоидозом, псориазом, хондрокальцинозом, усиленным потреблением жирной пищи, аллергией, гипертрофией предстательной железы, илеусом, артритом, лицидозом, пневмонией в стадии резорбции, отравлением свинцом и угарным газом.

Интересно, что у 22—27 % нелеченых больных артериальной гипертонией, не сопровождающейся поражением почек, обнаруживается гиперурикемия, а при вовлечении в процесс почек гиперурикемию удастся выявить у 47—67 % больных. У больных с реноваскулярной гипертонией содержание мочевой кислоты в крови часто увеличено, при



этом в 2—12 % случаев к основному заболеванию присоединяется подагра.

Гиперурикемия при голодании обусловливается, с одной стороны, высокой продукцией мочевой кислоты, с другой — снижением клиренса уратов, что предопределяется кетозом и повышением содержания бета-оксипутирата.

Высока частота обнаружения (30—50 %) гиперурикемии у больных псориазом и саркоидозом, у которых, как предполагают, имеется повышенный обмен нуклеотидов и нуклеиновых кислот.

Гиперурикемию вызывают и многие лекарственные средства, например мочегонные препараты (по данным исследований, проведенных в США, примерно у 75 % больных, принимавших мочегонные препараты, выявлена гиперурикемия), пиразикамид, салицилаты и другие. Поэтому Е. М. Тареев считает увеличение содержания мочевой кислоты в крови неспецифическим почечным показателем, совпадающим с фактом заболевания почек лишь в 30 % случаев.

Понижение величины содержания кислоты в сыворотке крови наблюдается у больных с анемией, после приема ими пиперазина, атофана, салицилатов и АКТГ.

## ИНДИКАН

Индикан представляет собой калиевую или натриевую соль индоксилсерной кислоты, образующейся в печени при обезвреживании индола.

Подобно другим ядовитым веществам, индол появляется в кишечнике при гниении белков. Так, из ароматической аминокислоты тирозина синтезируется фенол и крезол, из триптофана — индол и скатол. Всасываясь в кровь, они попадают в печень, где обезвреживаются путем соединения с серной и глюкуроновой кислотами. При этом из индола образуются индоксилсерная и индоксилглюкуроновая кислоты, а из скатола — соответственно скатоксилсерная и скатоксилглюкуроновая кислоты.

### Определение индикана в сыворотке крови и моче

**Принцип.** Метод определения индикана основан на гидролизе его соляной кислотой с последующим окислением хлорным железом индоксила и тимола в индиголиггон — соединение розово-фиолетового цвета.

**Реактивы.** 1. Трихлоруксусная кислота — 20 г/100 мл.

2. Хлороформ.

3. Раствор тимола в 96° этиловом спирте — 5 г/100 мл.

4. Реактив Жоллеса (Jolles). 0,5 г хлорного железа растворяют в 100 мл концентрированной HCl с удельным весом 1,19 (используют свежеприготовленный раствор).

**Ход определения индикана в сыворотке крови.** К 1,5 мл сыворотки прибавляют 1,5 мл раствора трихлоруксусной кислоты, и через 10 мин смесь центрифугируют. Полученную надосадочную жидкость осторожно сливают в градуированную пробирку, добавляют 7 капель раствора тимола и реактив Жоллеса в количестве, равном объему центрифугата. Смесь выдерживают при комнатной температуре в течение 20 мин, после чего приливают в нее 2 мл хлороформа для из-

влечения тимолиндиголигнона. Содержимое пробирки тщательно перемешивают (избегая образования эмульсии в результате слишком сильного взбалтывания) и оставляют стоять на 2 ч (лучше на сутки). Если содержание индикана не увеличено, то заметить окраску нижнего, хлороформного, слоя почти невозможно. Установлено, что при очень слабом фиолетовом окрашивании хлороформа содержание индикана приблизительно равно 0,022 мг/100 мл. При более сильном окрашивании (от нежного розово-фиолетового до ясного красно-фиолетового) органическую фазу разбавляют хлороформом до тех пор, пока раствор не станет бесцветным. С этой целью слой хлороформа переносят обычной пипеткой в мерный цилиндр (на 25 мл), в который и прибавляют чистый хлороформ до исчезновения окраски смеси. Содержание индикана в пробирке со следами краски соответствует величине, получаемой умножением 0,022 на цифру разведения (частное от деления конечного объема хлороформа на начальный его объем).

Пусть для обесцвечивания понадобилось 9 мл хлороформа, а так как первоначальный его объем был 2 мл, то разведение составит  $9:2=4,5$ . Содержание индикана в этом случае равно 0,099 мг/100 мл (3,96 мкмоль/л).

В норме содержание индикана в крови колеблется в пределах от 0,022 до 0,08 мг/100 мл (0,87—3,13 мкмоль/л).

Для перехода от размерности мкг/100 мл к размерности мкмоль/л пользуются коэффициентом пересчета 0,04, который находят исходя из следующих рассуждений:

Молекулярная масса индикана (калиевой соли индоксилсерной кислоты) составляет 251 (округленно 250) дальтон. Отсюда если 250 мкг индикана эквивалентны 1 мкмоль, то 220 мкг/л (соответствует концентрации 22 мкг/100 мл, или 0,022 мг/100 мл) — 0,87 мкмоль/л. Коэффициент пересчета находят делением 1 (мкмоль)/250 (мкг) и умножением результата на 10 (для перехода от 100 мл к 1 л биологической жидкости), то есть  $1/25=0,04$ .

Ход определения индикана в моче. 20 мл мочи смешивают с 10 мл раствора уксуснокислого свинца (10 г/100 мл) и после встряхивания смесь фильтруют. К 10 мл фильтрата добавляют 1 мл тимолового раствора и 10 мл реактива Жоллеса. Через 15 мин в склянку приливают несколько капель хлороформа, смесь взбалтывают и производят оценку результата исследования.

В норме отмечается розово-фиолетовое окрашивание хлороформа, интенсивность которого при выраженной индиканурии повышается до красно-фиолетового цвета.

#### *Клинико-диагностическое значение изучения содержания индикана в сыворотке крови и моче*

Исследование индикана оказывается весьма полезным у больных с начальными стадиями развития почечной недостаточности, когда уровень остаточного азота еще может быть и не увеличенным. Считают, что индиканемия является более чувствительной реакцией с целью установления недостаточности почек, чем азотемия, так как в определенной стадии болезни почки перестают пропускать более крупные молекулы индикана и последний накапливается в крови; молекулы же мочевины, напротив, в этой стадии болезни легко проходят через почки и в крови могут не задерживаться. Вот почему исследование индикана в крови имеет самостоятельное диагностическое

значение и должно производиться параллельно с определенным остаточного азота при подозрении на недостаточность функции почек у больных.

Индиканемия наблюдается в большинстве случаев гломеруло-нефрита. При очаговом гломерулонефрите реакция на индикан в сыворотке, как правило, отрицательна; отсутствие индиканемии и азотемии свидетельствует о неповрежденной функции почечной ткани, несмотря на наличие очагового гломерулонефрита. У больных с острыми нефритами индиканемия не имеет прогностического значения; у больных с хроническими нефритами, наоборот, она прогностически неблагоприятна.

Действительно, содержание индикана возрастает чаще всего при хронических нефропатиях. При острых нефропатиях, сопровождающихся недостаточностью почек, количество индикана в крови повышается мало. В случаях рассматриваемых заболеваний с явлениями сморщивания почки содержание индикана возрастает раньше увеличения количества остаточного азота или мочевины. Это обстоятельство повышает диагностическую ценность определения индикана. Замечено, что большое количество индикана при низком содержании остаточного азота или мочевины указывает на гораздо большую недостаточность почек, чем высокий уровень мочевины или остаточного азота при небольшом количестве индикана. В хронической стадии нефрита, когда содержание остаточного азота еще не увеличено и концентрационная функция почки пока сохранена, количество индикана может уже слегка возрастать. В значительной степени выражена индиканемия при явлениях абсолютной недостаточности почек, ведущих к развитию азотемии (уремии). Как правило, реакция на индикан резко положительна в предуремической и уремической стадиях нефрита.

Следует, однако, помнить, что увеличение концентрации индикана в сыворотке крови может наблюдаться при запоре, завороте кишок, ущемленной грыже и различных других видах кишечной непроходимости, когда создаются условия для активизации гнилостных процессов в кишечнике, а также при усиленном разложении белков в организме (опухоли, эмпиемы, бронхоэктазии, абсцессы и прочие заболевания).

## Глава VI

### МЕТОДЫ ИЗУЧЕНИЯ АКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТОВ

Основным биологическим материалом для исследования активности ферментов в клинике является сыворотка крови. В связи с этим следует отметить, что из-за выделения в процессе свертывания крови и ретракции сгустка содержащихся в тромбоцитах биологически активных веществ, могущих влиять на ферменты плазмы крови, в большинстве случаев активность энзимов в сыворотке превышает таковую плазмы крови. Более того, при лизисе эритроцитов в сгустке находящиеся в форменных элементах ферменты переходят в сыворотку крови. Именно этим объясняется, в частности, большая активность лактатдегидрогеназы у практически здоровых людей в сыворотке, чем в плазме крови.

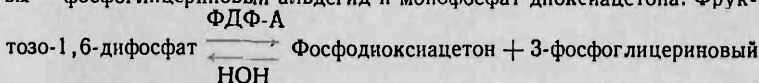
При унификации ферментативных методов исследования необ-

ходимо соблюдать два условия: 1) выбирать оптимальные способы определения активности энзимов (они должны проводиться на соответствующем научном уровне и удовлетворять требованиям экономии) и 2) выражать результаты исследования только в ммоль (редко в мкмоль, г) разрушенного субстрата (или образовавшегося в результате его расщепления продукта) в пересчете на 1 л биологической жидкости (сыворотки, плазмы крови, мочи, спинномозговой жидкости) за время инкубации смеси в течение 1 ч при +37 °С. В некоторых случаях показатели активности ферментов дают в условных и некоторых других единицах.

## МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АКТИВНОСТИ АЛЬДОЛАЗ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ

Альдолазы — ферменты, принимающие участие в гликолитическом расщеплении глюкозы, относятся к классу С — С-лиаз (КФ 4.1).

Фруктозо-1,6-дифосфатальдолоза (ФДФ-А) катализирует обратимую реакцию расщепления фруктозо-1,6-дифосфата на две фосфотриозы — фосфоглицериновый альдегид и монофосфат дioxнацетона: Фрук-

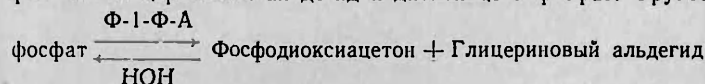


альдегид

Оптимум действия энзима находится в пределах рН 7—9.

Фермент обнаруживается во всех органах и тканях человека и животных. Наибольшая активность его определяется в скелетной мускулатуре, сердечной мышце и печени. Активность фруктозодифосфатальдолозы в эритроцитах в 100 раз выше, чем в сыворотке крови, в связи с чем даже следы гемолиза могут значительно исказить результаты анализа.

Фруктозо-1-фосфатальдолоза (кетозо-1-фосфатальдегидлиаза; КФ 4.1.2.7.) катализирует реакцию расщепления фруктозо-1-монофосфата на глицериновый альдегид и дioxнацетонфосфат: Фруктозо-1-



Фермент специфичен для печени. Незначительная его активность обнаружена также в почках и мозговой ткани.

Альдолаза крови относительно термостабильна. Кровь может быть оставлена при комнатной температуре для свертывания и центрифугирования на несколько часов. Активность фермента не изменяется, если хранить сыворотку при температуре 0—4 °С в течение 3—4 дней.

Существует несколько методов определения активности альдолазы, в основу которых положены различные принципы.

Метод, связанный с исследованием активности альдолазы за счет установления содержания щелочлабильного фосфора триозофосфатов, является трудоемким, так как требует проведения серии контрольных определений неорганического и щелочлабильного фосфора в пробах.

Спектрофотометрический метод, предложенный Варбургом и

Христианом, основан на оптическом тесте Варбурга. По степени превращения НАД·Н в НАД в присутствии лактатдегидрогеназы находят концентрацию фосфодиацетона и тем самым — активность альдозазы. Метод сложен, требует внесения в инкубационную смесь ферментов и коферментов.

Колориметрические методы изучения активности альдозазы просты и доступны, так как наша промышленность выпускает специальные наборы реактивов для определения активности фруктозо-1,6-дифосфатальдозазы по цветной реакции продуктов ферментативной реакции с 2,4-динитрофенилгидразином.

В некоторых случаях используют методы зонального (на агаровом геле) электрофореза изоэнзимов альдозазы (в сыворотке крови обнаруживается до трех фракций альдозазы, соотношение между которыми резко меняется при заболеваниях печени, инфаркте миокарда и ряде других патологических состояний).

**Определение активности  
фруктозо-1,6-дифосфатальдозазы  
в сыворотке крови (метод В. И. Товарницкого,  
Е. Н. Волуйской в модификации В. А. Ананьева  
и В. В. Обуховой)**

Этот колориметрический метод достаточно точен, сравнительно прост и требует для своего выполнения очень небольшого количества сыворотки (0,1 мл). Гемолиз, иногда даже небольшой, может существенно завесить результаты исследования (из-за значительного содержания ФДФ-А в эритроцитах), с чем приходится считаться при взятии у больного крови из пальца.

**Принцип.** Фруктозо-1,6-дифосфатальдозаза катализирует реакцию расщепления субстрата (фруктозо-1,6-дифосфата), продукты распада которого (триозофосфаты) образуют с 2,4-динитрофенилгидразином гидразон, имеющий в щелочной среде фиолетовое окрашивание. По интенсивности окраски, определяемой колориметрически, судят об активности фермента.

**Реактивы.** 1. Фруктозодифосфат (ФДФ), переведенный из бариевой соли в натриевую. Для ее приготовления 270 мг бариевой соли фруктозодифосфата растворяют в 3,5 мл 1 н раствора HCl (8,5 мл концентрированной HCl доводят водой до 100 мл). К этому раствору приливают 1,0 мл раствора безводного сульфата натрия (14 г/100 мл). Выпавший осадок сернистого бария удаляют центрифугированием. Надосадочную жидкость проверяют на полноту осаждения ионов бария добавлением к центрифугату 1 капли раствора сернистого натрия. Помутнение раствора свидетельствует о недостаточном осаждении ионов бария. Прозрачную жидкость сливают в мерную 25-мллитровую колбу, подщелачивают 3 г/100 мл раствором NaOH до pH 7,4—7,6, пользуясь индикатором бромтимоловым синим. При этом значении pH в смеси появляется синее (не зеленоватое!) окрашивание. После установления pH объем раствора доводят дистиллированной водой до метки. Приблизительно получается 0,02 моль/л раствора натриевой соли фруктозодифосфата. Этот раствор при добавлении к нему нескольких капель толуола сохраняется в холодильнике от двух недель до одного месяца. Его разливают

во флаконы от пенициллина и хранят в замороженном состоянии. Перед употреблением флаконы следует оттаивать.

2. Раствор 2,4-динитрофенилгидразина — 0,1 г/100 мл. Растворяют 0,1 г реактива в 100 мл 2 н HCl. Для приготовления последней 17 мл концентрированной HCl (плотность 1,19 кг/л) доводят дистиллированной водой до 100 мл (растворение идет медленно, при подогревании смеси в водяной бане; раствор фильтруют и хранят в темной склянке в холодильнике при +4 °C).

3. Раствор NaOH — 3 г/100 мл.

4. 0,56 моль/л раствора гидразинсульфата. В мерной колбе на 100 мл в небольшом количестве воды растворяют 7,3 г соли и при постоянном взбалтывании смеси подщелачивают ее до pH 7,4 раствором NaOH (70—80 мл), после чего объем раствора гидразинсульфата доводят дистиллированной водой до метки. Некоторые авторы рекомендуют для подщелачивания раствор NaOH в концентрации 33 г/100 мл (гидразинсульфат может быть кислый, основной, нейтральный). Предпочтительнее пользоваться основным гидразинсульфатом).

5. 0,002 моль/л раствора моноiodоксусной кислоты. Растворяют 0,04 г кислоты в 80—90 мл дистиллированной воды, смесь доводят раствором NaOH до pH 7,4 (см. п. 8) и добавляют дистиллированной воды до 100 мл. Хранят в темной склянке в холодильнике при +4 °C.

6. Раствор трихлоруксусной кислоты — 10 г/100 мл.

7. Раствор гидрокарбоната натрия (двууглекислой соды,  $\text{NaHCO}_3$ ) — 0,5 г/100 мл.

8. Раствор бромтимолового синего (индикатор) — 0,04 г/100 мл. 0,01 г индикатора вносят в 3,2 мл раствора NaOH (0,02 г/100 мл) и доводят смесь водой до объема 25 мл (или 0,1 г бромтимолового синего растворяют в 32 мл раствора едкого натра (0,2 г/100 мл) и доливают смесь дистиллированной водой до 250 мл). Этим раствором индикатора пользуются при подщелачивании растворов 1, 4 и 5 до pH 7,4—7,6. После каждого прибавления в раствор щелочи на предметное стекло наносят по капле такого раствора и индикатора. Доливают реактив щелочи (3) в раствор до тех пор, пока капля на предметном стекле не окрасится в синий цвет.

**Примечание.** Растворы 2,4-динитрофенилгидразина, гидразинсульфата, моноiodоксусной кислоты хранят непременно в темном прохладном месте. Если pH их оказывается большим 7,4, то гидразинсульфат подкисляют раствором  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , ФДФ — раствором 2 н HCl, моноiodоксусную кислоту — раствором уксусной.

**Ход определения.** Готовят смеси из следующих компонентов (табл. 12).

Для удобства их приготовления рекомендуют сначала произвести в большом количестве первую смесь, исходя, например, из соотношения цифр, заключенных в скобки (табл. 12).

А. В. Сучков, Н. В. Привалова, П. Б. Еникеева предлагают растворы двууглекислой соды, гидразина и моноiodоксусной кислоты брать в следующем соотношении: 100 мл раствора  $\text{NaHCO}_3$ , 25 мл раствора гидразина, 25 мл раствора моноiodоксусной кислоты. К смеси добавляют 25 мл дистиллированной воды. Содержать в холодильнике при +4 °C.

Табл. 12. Компоненты смесей для опытной и контрольной проб (мл)

№ по списку	Основной компонент	Первая смесь (для контрольной пробы)	Вторая смесь (для опытной пробы)
7	Гидрокарбонат натрия	1,00 (4,0)	1,00
4	Гидразинсульфат	0,25 (1,0)	0,25
5	Монодоксиусная кислота	0,25 (1,0)	0,25
1	Фруктозодифосфат	—	0,25
	Дистиллированная вода	0,25 (1,0)	0,25

Непосредственно перед исследованием активности рассматриваемого фермента приготавливают вторую смесь, состоящую из 0,25 мл раствора ФДФ и 1,75 мл первой смеси.

Ввиду того что реакция протекает очень непродолжительное время, можно обходиться и без монодоксиусной кислоты, ее следует заменить соответствующим объемом дистиллированной воды или раствором гидрокарбоната натрия.

Для постановки опытной пробы в центрифужную пробирку вносят 0,1 мл сыворотки и добавляют 0,2 мл второй смеси. Контрольную пробу проводят путем приливания к 0,1 мл сыворотки 0,175 мл первой смеси (без раствора ФДФ). Все опытные и контрольные пробирки помещают в термостат при  $+37^{\circ}\text{C}$  на 1 ч. После инкубации в контрольные пробирки вносят по 0,025 мл раствора ФДФ. Дальнейший ход реакции для опытной и контрольной проб протекает одинаково. Белки осаждают добавлением в смесь 0,3 мл раствора трихлоруксусной кислоты. Пробирки центрифугируют до получения прозрачной надосадочной жидкости (этот этап может быть исключен) и после доливания в них по 0,6 мл раствора NaOH оставляют на 10 мин при комнатной температуре. Затем в пробы добавляют по 0,6 мл раствора 2,4-динитрофенилгидразина, их помещают на 10 мин в термостат или водяную баню при  $+37^{\circ}\text{C}$  (пробирки можно оставлять и при комнатной температуре), доливают 4,2 мл раствора NaOH и сразу же колориметрируют на ФЭКе при зеленом светофильтре (530—540 нм) в кюветках с шириной слоя 5 мм. Из цифр, отражающих данные колориметрирования опытных проб, вычитают аналогичные величины контрольных проб и выражают активность альдолазы в усл. ед., представляющих величину экстинкции, умноженную на 100.

По результатам микрометода В. А. Апаньева и В. В. Обуховой, в норме активность фруктозо-1,6-дифосфатальдолазы в сыворотке крови не превышает 3—8 ед.

*Клинико-диагностическое значение исследования активности фруктозо-1,6-дифосфатальдолазы в сыворотке крови*

ФДФ-А — фермент, обнаруживающий высокую активность в скелетной мускулатуре, миокарде, печени, мозге, легких, эритроцитах.



При глубоких дистрофических процессах в мышечной системе значительно увеличивается содержание данного фермента в сыворотке крови. При остром приступе миоглобинурии активность фермента может возрасти в 100 раз по сравнению с показателями нормы, постепенно спадая по мере стихания процесса. Значительное увеличение активности ФДФ-А наблюдается у больных с прогрессирующей мышечной дистрофией, дерматомиозитом, миозитом, в то время как сходные по клинической картине первично-мышечные и другие заболевания (первично-мышечная атрофия, миастения, полиомиелит, бульбарные параличи) не сопровождаются гиперферментемией.

При мелкоочаговом инфаркте миокарда гиперальдолаземия отмечается у 25—40 % больных. Она наступает через 5—6 ч от начала болезни, достигая максимальной величины на 2—3-и сутки. Нормализация теста происходит на 4—5-й день.

При крупноочаговом инфаркте миокарда повышение активности альдолазы встречается у 50—72 % больных. Начало подъема активности и максимальная величина ее происходят в те же сроки, что и при мелкоочаговом инфаркте, но степень гиперальдолаземии при рассматриваемом заболевании выше и нормализация показателя наблюдается позднее (7—8-й день).

Затяжной характер возрастания активности ФДФ-А может быть следствием повторных инфарктов.

У больных с острой очаговой дистрофией миокарда активность этого фермента повышается лишь в единичных случаях в течение первых двух суток заболевания. Стенокардия же не сопровождается изменением активности альдолазы.

У больных с острым гепатитом (болезнью Боткина) в 90 % случаев обнаруживается 5—20-кратное возрастание активности фруктозодиффосфатальдолазы. Важно отметить, что она увеличивается задолго (от 3 дней до 2 недель) до проявления клинических симптомов заболевания, достигая максимума в первые 5 дней желтушного периода. Затем происходит ее постепенное снижение, более быстрое при легком течении, чем при среднетяжелом и тяжелом. У детей нормализация ферментативных показателей отмечается быстрее, чем у взрослых. Длительная гиперферментемия свидетельствует о затяжном течении заболевания. Следует помнить, что активность фермента увеличивается не только при желтушной, но и при безжелтушной форме заболевания. Поэтому становится понятным большое значение определения сывороточной альдолазы не только для ранней диагностики гепатита и распознавания безжелтушных форм, но и для предупреждения переливания больным крови доноров, страдающих латентным гепатитом. У больных с хроническим гепатитом и циррозом печени активность ФДФ-А обычно не отклоняется от нормы. Ее увеличение всегда является показателем обострения процесса. Нормальные или незначительные повышения величины ферментной активности отмечаются у больных с механической желтухой и воспалительными заболеваниями желчевыводящих путей.

Поражение же печени гепатотропными ядами (например СС1<sub>4</sub>) приводит к резкому возрастанию активности фруктозодиффосфатальдолазы в сыворотке крови. Повышение активности альдолазы связано с некоторыми опухолевыми заболеваниями и миелолейкозом.

Менее значительно увеличивается активность ФДФ-А в сыворотке крови при остром панкреатите, гемолитической анемии, инфаркте легкого, тяжелой пневмонии, экземе, нейродермите и ревмокардите.



**Установление активности фруктозо-1-фосфатаальдозазы  
(метод Шапиро в модификации Д. М. Брагинского)**

Принцип метода не отличается от такового при определении фруктозо-1,6-дифосфатаальдозазы. Разница сводится лишь к тому, что в качестве субстрата вместо фруктозодифосфата используют фруктозомонофосфат (ФМФ).

Реактивы те же, что и при исследовании активности фруктозо-1,6-дифосфатаальдозазы (кроме фруктозодифосфата). Субстратом является 0,1 моль/л раствора натриевой соли фруктозо-1-фосфорной кислоты. Готовят его следующим образом. 494 мг бариевой соли фруктозо-1-фосфорной кислоты помещают в центрифужную пробирку и (при размещивании стеклянной палочкой) растворяют в 5—7 мл дистиллированной воды. Для осаждения ионов бария к смеси приливают по каплям 1,1—1,2 мл раствора сульфата натрия (12 г/100 мл), размешивая стеклянной палочкой образовавшееся хлопья. Реактив тщательно центрифугируют (10—15 мин при 1500—2500 об/мин), и, не сливая жидкости с осадка, проверяют полноту осаждения ионов бария прибавлением к надосадочной жидкости нескольких капель

**Табл. 13. Исследование активности фруктозоди-  
и фруктозомонофосфатаальдозазы в сыворотке крови**

Определение активности 1,6-дифосфатаальдозазы в сыворотке крови	Определение активности 1-монофосфатаальдозазы в сыворотке крови
1. Берут 0,1 мл сыворотки крови (негемолизированной)	1. Берут 0,1 мл сыворотки крови
2. Добавляют 0,2 мл смеси реактивов и субстрата (ФДФ)	2. Добавляют 0,2 мл смеси реактивов и субстрата (ФМФ)
3. Инкубируют в термостате в течение 1 ч при +37 °С	3. Инкубируют в термостате в течение 2 ч при +37 °С
4. Добавляют 0,3 мл раствора трихлоруксусной кислоты	4. Добавляют 0,3 мл раствора трихлоруксусной кислоты
5. Центрифугируют в течение 10 мин при 1500 об/мин	5. Центрифугируют в течение 10 мин при 1500 об/мин
6. Добавляют 0,6 мл раствора едкого натра	6. Добавляют 0,6 мл раствора едкого натра
7. Оставляют на 10 мин при комнатной температуре	7. Оставляют на 10 мин при комнатной температуре
8. Добавляют 0,6 мл раствора 2,4-динитрофенилгидразина	8. Добавляют 0,6 мл раствора 2,4-динитрофенилгидразина
9. Нагревают в водяной бане при +38 °С в течение 10 мин	9. Нагревают в водяной бане при +38 °С в течение 10 мин
10. Добавляют 4,2 мл раствора едкого натра	10. Добавляют 4,2 мл раствора едкого натра
11. Колориметрируют на ФЭКе при зеленом светофильтре	11. Колориметрируют на ФЭКе при зеленом светофильтре

раствора сульфата натрия (при появлении мути центрифугирование повторить!). Всего для полного осаждения ионов бария обычно требуется 1,3—1,5 мл раствора сульфата натрия. Свободную от ионов бария надосадочную жидкость сливают в мерную посуду и доводят общий объем дистиллированной водой до 12,5 мл. Полученный 0,1 моль/л раствора натриевой соли фруктозо-1-фосфорной кислоты годен при хранении в холодильнике не более 2—3 недель. Его разливают в чистые сухие пенциллиновые флакончики и содержат в замороженном состоянии.

При работе с венгерским препаратом его растворяют в кислой среде, создаваемой добавлением нескольких капель раствора соляной кислоты (10—20 г/100 мл) в содержимое пробирки; необходимо постоянно помешивать это содержимое стеклянной палочкой. Далее по описанному способу осаждают ионы бария серноокислым натрием. Свободную от ионов бария надосадочную жидкость подщелачивают раствором едкого натра (3 г/100 мл) до pH 7,4 (под контролем индикатора бромтимолового синего) и доводят общий объем дистиллированной водой до 12,5 мл.

Ход определения тот же, что и при исследовании активности фруктозодинфосфатаальдозазы. По время инкубации ферментсубстратной смеси составляет не 1, а 2 ч.

Ход анализа при определении активности обоих ферментов дается в табл. 13.

Контрольную пробу проводят следующим образом. К 0,1 мл испытуемой сыворотки добавляют 0,175 мл смеси реактивов без раствора фруктозомонофосфата. Пробу инкубируют в течение 2 ч, после чего в нее доливают 0,025 мл раствора ФМФ.

Активность фруктозо-1-фосфатаальдозазы (Ф-1-Ф-А) в сыворотке крови здоровых людей указанным методом, как правило, не обнаруживается. Лишь в отдельных случаях отмечаются показатели до 1 ед. Поэтому за норму приняты показатели 0—1 ед.

*Клинико-диагностическое значение исследования активности фруктозо-1-фосфатаальдозазы в сыворотке крови*

Активность Ф-1-Ф-А с большим постоянством повышается уже в ранние сроки болезни Боткина. Поскольку гемолиз существенно не влияет на результат исследования (благодаря чему допускается возможность взятия крови из пальца), применение этой пробы с целью обследования контактных лиц в очаге инфекции имеет большое преимущество перед фруктозо-1,6-дифосфатаальдозазной (ФДФ-А) пробой. При болезни Боткина активность Ф-1-Ф-А в начале заболевания достигает 7—20—10 ед. и более. С увеличением сроков заболевания нормализация повышенных показателей Ф-1-Ф-А наступает позднее, чем показателей ФДФ-А. При рецидивах и обострениях болезни Боткина активность фермента вновь возрастает, а при затяжном течении обычно долгое время не приходит к норме.

Для больных с токсическим гепатитом и обострениями хронического гепатита характерны высокие показатели Ф-1-Ф-А. У больных с циррозом печени заметное повышение активности фермента отмечается редко. При механических желтухах на почве новообразований или заболеваний желчевыводящих путей показатели Ф-1-Ф-А остаются

ся нормальными или незначительно возрастают, как правило, не более чем до 2—5 ед. Изменение их связано с вторичным вовлечением печени в патологический процесс.

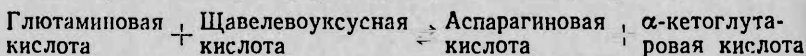
Гемолитические анемии и функциональные гипербилирубинемии не сопровождаются повышением активности фермента.

Таким образом, проба является довольно специфическим индикатором поражения паренхимы печени. Заболеваниям, не вызванным поражением печени, свойственны нормальные показатели активности Ф-1-Ф-А.

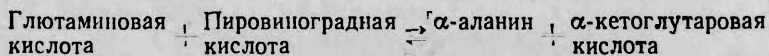
## ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ АМИНОТРАНСФЕРАЗ (ТРАНСАМИНАЗ)

При участии аминотрансфераз (КФ 2.6.1) в организме человека осуществляются процессы переаминирования (обратимого переноса аминокрупп аминокислот на кетокислоты). Наибольшее значение имеет исследование активности аспаратаминотрансферазы (L-аспарат: 2-оксоглутарат-аминотрансферазы; КФ 2.6.1.1) и алаанинаминотрансферазы (L-аланин: 2-оксоглутарат-аминотрансферазы; КФ 2.6.1.2). Эти ферменты обладают большой каталитической активностью и широко распространены в различных органах и тканях — печени, мышце сердца, скелетной мускулатуре, почках и других.

Аспаратаминотрансфераза (АсТ) катализирует реакцию:



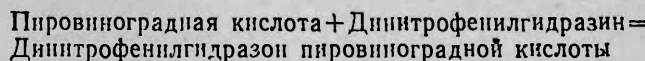
Алаанинаминотрансфераза (АлТ) катализирует реакцию:



Существующие методы определения активности указанных аминотрансфераз в сыворотке крови можно разделить на две основные группы: колориметрические и спектрофотометрические.

В основе спектрофотометрических методов лежит использование оптического теста Варбурга. Эти методы являются наиболее специфичными и точными для исследования активности аминотрансфераз в сыворотке крови. Однако применение труднодоступных и дорогостоящих реактивов, а также необходимость измерения результатов на спектрофотометре не дают возможности широкого использования этих методов в клинических лабораториях.

Группа колориметрических методов основана на образовании окрашенного диитрофенилгидразона пировиноградной кислоты, освобождающейся в результате реакции переаминирования. Интенсивность окраски пропорциональна активности фермента.



Диитрофенилгидразоновые методы впервые предложили в 1950 г. Таугази, Уайт, Умбрайт. У нас в стране они получили известность в модификации Т. С. Пасхиной.

В последние годы появился облегченный и упрощенный метод Райтмана и Френкеля, основанный на том же принципе, что и способ в модификации Т. С. Пасхиной, но имеющий перед ним ряд п

муществ. Они состоят в исключении из хода определения активности ферментов: 1) перевода щавелевоуксусной кислоты в пировиноградную с применением анилина, 2) экстракции 2,4-ДФ-гидразона пирувата толуолом. Метод Райтмана и Френкеля нашел широкое применение за рубежом. Будучи технически простым, он вместе с тем выявляет изменения активности фермента при различных заболеваниях и дает воспроизводимые результаты.

Азотметоды основаны на образовании цветного соединения между щавелевоуксусной кислотой и 6-бензамидо-4-метокситолуидиндиазониевым хлоридом. Колориметрические методы этой группы просты и при наличии соответствующих все еще дефицитных реактивов могут быть использованы для быстрого ориентировочного определения активности аспаратаминотрансферазы.

**Колориметрический динитрофенилгидразиновый метод исследования активности аминотрансфераз в сыворотке крови (по Райтману, Френкелю, 1957)**

**Принцип.** В результате переаминирования, происходящего под действием АСТ и АЛТ, образуются щавелевоуксусная и пировиноградная кислоты. Щавелевоуксусная кислота способна в процессе ферментативной реакции превращаться в пировиноградную кислоту. При добавлении кислого 2,4-динитрофенилгидразина энзиматический процесс останавливается и получается гидразон пировиноградной кислоты. Последний в щелочной среде дает окрашивание, интенсивность которого пропорциональна количеству образовавшейся пировиноградной кислоты.

**Реактивы.** 1. 0,1 моль/л фосфатного буфера, рН 7,4. Для приготовления буферного раствора смешивают 840 мл 0,1 моль/л раствора двузамещенного фосфата натрия  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (17,4 г кристаллической соли растворяют в 1 л дистиллированной воды; двузамещенный фосфорнокислый натрий, содержащий две молекулы воды, получают путем выветривания на воздухе в течение двух суток кристаллической соли, содержащей обычно 12 молекул воды; соль предварительно растирают в ступке в порошок) и 160 мл 0,1 моль/л раствора безводного однозамещенного фосфата калия  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (13,6 г  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  растворяют в 1 л дистиллированной воды).

Буферный раствор с индикатором бромтимоловым синим (реактив 2) должен давать голубую окраску. В качестве консерванта к нему можно добавить 5—10 мл хлороформа.

2. Раствор бромтимолового синего — 0,04 г/100 мл. 100 мг индикатора растворяют в ступке с 3,2 мл 0,05 н раствора едкого натра. Затем смесь смывают водой в мерную колбу емкостью 250 мл и доводят водой до метки.

3. Субстратный раствор для определения аспаратаминотрансферазы. 29,2 мг  $\alpha$ -кетоглутаровой и 2,66 г DL-аспарагиновой кислот (при использовании вместо DL-аспарагиновой кислоты L-аспарагиновой, а вместо DL-аланина — L-аланина меру субстрата следует уменьшить вдвое) отвешивают на аналитических весах и вносят в 1 л раствор NaOH. Едкий натр приливают осторожно, небольшими порциями до полного исчезновения осадка и до получения смеси с рН 7,4 (для определения рН используют универсальную индикаторную бумагу или применяют рН-метр). Раствор переливают в мерную кол-

бу емкостью 100 мл, ополаскивают посуду 0,1 ммоль/л фосфатным буфером (рН 7,4) и доводят им объем колбы до метки. Буферный раствор тщательно перемешивают, прибавляют 1 каплю хлороформа, разливают во флакончики из-под пенициллина и сохраняют в холодильнике в замороженном состоянии. Перед употреблением замороженный раствор следует полностью оттаять.

4. Субстратный раствор для определения активности алаанинаминотрансферазы. 29,2 мг  $\alpha$ -кетоглутаровой кислоты и 1,78 г DL-аланина (0,89 г L-аланина) отвешивают на аналитических весах. Дальше все выполняется по указаниям для первого субстратного раствора (реактив 3).

5. Раствор 2,4-динитрофенилгидразина. 19,8 мг 2,4-динитрофенилгидразина растворяют в небольшом количестве 1 н раствора соляной кислоты при нагревании смеси на водяной бане. После того как раствор остынет, доводят его объем соляной кислотой до 100 мл. На следующий день реактив фильтруют. Раствор хранят в посуде из темного стекла в холодильнике. Годен в течение года.

6. 0,4 н NaOH, свободный от карбонатов. Реактив можно приготовить из сильно концентрированного раствора NaOH (50 г/100 мл), разбавляя его свежекипяченой водой, свободной от карбонатов, до получения смеси с плотностью 1,016 кг/л при +20 °С или 1,018 кг/л при +15 °С. Однако предпочтительнее готовить реактив из фиксана-ла. Сосуды с реактивом и дистиллированной водой закрывают пробками с поглотительными трубками, наполненными натронной известью или гидроокисью бария.

7. Стандартный раствор пировинограднокислого натрия  $\text{C}_2\text{H}_3\text{COCOONa}$ . 11 мг точно взвешенного кристаллического пирувата натрия (белого цвета) растворяют в небольшом количестве дистиллированной воды, переносят в мерную колбу емкостью 100 мл и доводят объем дистиллированной водой до метки; 1,0 мл раствора содержит 110 мкг пирувата натрия, что соответствует 88 мкг пировиноградной кислоты. Раствор используют для построения калибровочного графика.

Ход определения активности аспаратаминотрансферазы (АсТ). Опытную пробу готовят следующим образом. В пробирку вносят 0,5 мл субстратного раствора и прогревают смесь при +37 °С в течение 5 мин (в практике лабораторной работы предварительный этап прогревания пробы нередко не выполняют). Затем добавляют 0,1 мл испытуемой сыворотки и пробирку помещают в термостат при +37 °С на 60 мин. После извлечения ее из термостата в содержимое пробирки доливают 0,5 мл динитрофенилгидразинового раствора, и пробы выдерживают в течение 20 мин при комнатной температуре для развития реакции. Затем добавляют 5 мл 0,4 н NaOH и после тщательного перемешивания раствора оставляют его при комнатной температуре на 10 мин для развития окраски. Оптическую плотность проб измеряют на ФЭКе с зеленым фильтром (530, 500—560 нм) в кювете с шириной слоя 10 мм. Результаты сравнивают с аналогичными данными контрольных проб.

Контрольная проба на реактивы содержит все ингредиенты опытной пробы за исключением сыворотки крови. Вместо нее берут 0,1 мл дистиллированной воды. Контрольную пробу инкубируют в тех же условиях, что и опытную.

Райтман, Френкель (1957) предлагают проводить контрольные пробы для каждой сыворотки. Контрольные пробы ставят так же, как

опытные, но раствор 2,4-динитрофенилгидразина добавляют до их инкубации. Осуществление контрольной пробы для каждой сыворотки дает возможность получать более точные результаты.

Ход определения активности аланинаминотрансферазы (АлТ). В пробирку вносят 0,5 мл субстратного раствора для исследования АлТ, затем добавляют 0,1 мл испытуемой сыворотки и помещают смесь на 30 мин в термостат для инкубации при +37 °С.

Дальнейший ход анализа осуществляют так же, как и при определении АсТ.

Аминотрансферазную активность сыворотки рассчитывают по калибровочной кривой. В пробирки наливают ингредиенты, указанные в табл. 14, перемешивают их, добавляют по 0,5 мл 2,4-динитрофенилгидразина и через 20 мин приливают по 5 мл 0,4 н раствора NaOH. Затем измеряют оптическую плотность проб на фотоэлектроколориметре с зеленым светофильтром (530 нм) в кюветах с шириной слоя 10 мм, сравнивают с аналогичными данными контрольной пробы, в которую вместо раствора пировиноградной кислоты добавляют дистиллированную воду.

Табл. 14. Данные к построению калибровочного графика для определения активности аминотрансфераз

№ пробирок	Стандартный раствор пирувата натрия (мл)	Содержание пировиноградной кислоты		Дистиллированная вода (мл)	Колич. ммоль пировиноградной кислоты на 1 л сыворотки за 1 ч инкубации, выражающее активность	
		(мкг)	(ммоль)		АсТ	АлТ
1	0,05	4,4	0,05	0,55	0,5	1,0
2	0,10	8,8	0,10	0,50	1,0	2,0
3	0,15	13,2	0,15	0,45	1,5	3,0
4	0,20	17,7	0,20	0,40	2,0	4,0
5	0,25	22,0	0,25	0,35	2,5	5,0
6	0,30	26,4	0,30	0,30	3,0	6,0

При построении калибровочного графика на оси ординат откладывают найденную величину оптической плотности, на оси абсцисс — соответствующее ей содержание пировиноградной кислоты (ммоль).

Начиная с величины экстинкции 0,30, график, как правило, отклоняется от прямой. Для соблюдения прямой пропорции между концентрацией вещества и оптической плотностью при показателях экстинкции выше 0,30 эти сыворотки (с большой ферментативной активностью) разводят какой-либо инактивированной сывороткой. Полученные цифры умножают на величину разведения.

В сыворотке крови практически здоровых людей активность аспартатаминотрансферазы (АсТ) составляет 0,1—0,45 ммоль пировиноградной кислоты на 1 л сыворотки за 1 ч инкубации при +37 °С (0,1—0,45 ммоль/(ч·л); активность алаанинаминотрансферазы (АлТ) — 0,1—0,68 ммоль/(ч·л).

Перевод принятых ранее единиц ферментативной активности (норма для АсТ — 8—40 ед., для АлТ — 5—30 ед.) в ммоль пирови-



поградной кислоты на 1 л сыворотки за 1 ч инкубации при +37 °С производят по формулам:

$D/88$  — для аспаратаминотрансферазы,

$D \cdot 2/88$  — для аланинаминотрансферазы,

где  $D$  — показатели активности ферментов, выраженные в старой размерности (единицах ферментативной активности); 88 — коэффициент пересчета, численно равный молекулярной массе пировиноградной кислоты.

Примечания: 1. Сыворотка не должна быть гемоллизирована. При хранении ее в холодильнике активность фермента не претерпевает существенных изменений в течение одной недели. Однако лучше всего применять сыворотку в первые двое суток.

2. Бактериальное загрязнение субстрата приводит к понижению показателей реакции. Субстрат с помутнением нельзя использовать для анализа.

3. Содержание большого количества карбоната в реактиве б занижает результаты. Раствор щелочи следует хранить в плотно закупоренной стеклянной посуде.

4. Раствор едкого натра добавляют в пробирку равномерно. Неравномерное доливание раствора едкого натра может стать причиной различной интенсивности окраски при одинаковом содержании кетокислоты в образце.

5. Посуда должна быть тщательно вымыта. Остатки мыльного порошка на стенках пробирки, в которую была собрана кровь или где хранится сыворотка, снижают показатели определения активности ферментов.

6. Райтман и Френкель (1957) рекомендуют строить калибровочную кривую по изменению оптической плотности, связанной с увеличением концентрации пирувата и соответственно снижением концентрации  $\alpha$ -кетоглутарата (измеряется оптическая плотность их динитрофенилгидразонов). Л. Н. Делекторская и ряд других исследователей предлагают наиболее распространенный и упрощенный метод построения калибровочного графика — по пировинограднокислому натрию.

7. Согласно исследованиям Н. И. Панченко, Н. К. Масленниковой, Э. С. Коган (1974), следует избегать разведения сывороток более чем в 10 раз. В противном случае сказывается «эффект разведения»: непропорциональное повышение активности фермента. Так, при разбавлении сыворотки больших острым гепатитом 1:200 активность возрастает (в расчете на неразведенную сыворотку) для АсТ в 28, для АлТ — в 55 раз.

8. При определении активности АлТ рекомендуется инкубировать сыворотку в течение 1 ч, а не 30 мин, поскольку в последнем случае полученный результат следует умножать на 2. Это обстоятельство тоже может привести к более высоким показателям активности АлТ, так как для данного энзима зависимость между временем инкубации и активностью не прямо пропорциональна.

В настоящее время для исследований активности аминотрансфераз в нашу страну поставляют из ЧССР выпускаемые фирмой «Лакхем» соответствующие наборы реактивов, рассчитанные на определение активности одного (АсТ, АлТ) или двух ферментов.

По разработкам лаборатории готовых стандартных форм ВНИИ прикладной биохимии с 1976 г. в нашей стране осуществляется выпуск наборов химических реактивов для исследования активности аспарат- и аланинаминотрансфераз в сыворотке крови. В основу анализа положен метод Райтмана и Френкеля. Количество реактивов рассчитано для проведения 200 определений.

### *Клинико-диагностическое значение определения активности аминотрансфераз в сыворотке крови*

Исследование активности аминотрансфераз в сыворотке крови имеет исключительно важное значение для диагностики и дифференциальной диагностики болезней печени. При болезни Боткина актив-

ность аминотрансфераз повышается с большим постоянством в очень ранние сроки — еще до появления желтухи. Резкое увеличение активности фермента наблюдается и у больных с безжелтушной формой. В связи с этим проба находит широкое применение при обследовании лиц, бывших в очаге инфекции. При болезни Боткина вначале коэффициент АсТ/АлТ становится значительно меньшим. Большой чувствительностью отличается аланинаминотрансферазная проба, которая в первые 10—15 дней болезни (5—10 дней от начала желтухи) практически во всех случаях бывает повышенной. С увеличением сроков заболевания активность аминотрансфераз постепенно снижается, как правило, быстрее при легком его течении, чем при средне-тяжелом и тяжелом. У детей отмечается более ранняя нормализация данного показателя. У больных с затяжным течением наблюдается длительная гиперферментемия; у больных с рецидивами и обострениями активность аминотрансфераз вновь возрастает. Проба в определенной степени служит критерием полноты выздоровления, однако при дистрофии печени активность аминотрансфераз может быстро снижаться, несмотря на ухудшение течения болезни.

При токсическом гепатите и обострении хронического гепатита часто бывают большие цифры ферментативной активности.

Цирроз печени даже в активной фазе не сопровождается столь значительной гиперферментемией.

У больных с механической желтухой на почве новообразований или заболеваниями желчевыводящих путей активность аминотрансфераз чаще всего нормальна или незначительно повышена. Возрастание показателей обычно свидетельствует о вторичном вовлечении печени в патологический процесс (холецистогепатит, холангиогепатит, обширные метастазы опухоли в печень). Для больных с гемолитическими анемиями и функциональными гипербилирубинемиями характерны нормальные показатели.

Не менее важное значение имеет определение активности трансаминаз и для диагностики заболеваний сердца. При инфарктах миокарда в 95 % всех случаев содержание АсТ повышено. Возрастание активности наступает через 4—6 ч. Оно четко выражено спустя 24—36 ч и лишь на 3—7-й день снижается до нормального уровня. Повышение активности АсТ и лактатдегидрогеназы наблюдается при таких инфарктах миокарда, которые не диагностируются электрокардиографически.

Возрастание активности фермента у больных с инфарктом легкого бывает в тех случаях, когда заболевание сопровождается перегрузкой правой половины сердца и застоем крови в печени.

Крупноочаговые поражения миокарда дают среднее повышение АсТ — 1,54 ммоль/(ч·л) (при максимальном возрастании до 4,28 ммоль/(ч·л)), АлТ — 1,90 ммоль/(ч·л) (при максимальном отклонении до 3,80 ммоль/(ч·л)).

При мелкоочаговых поражениях, по данным С. Р. Белоуса и Ф. Л. Салимона, среднее арифметическое для АсТ составляет 0,70 ммоль/(ч·л), для АлТ — 1,27 ммоль/(ч·л) при норме соответственно 0,50 ммоль/(ч·л) и 0,80 ммоль/(ч·л). Авторы отметили, что умеренное повышение активности аминотрансфераз наблюдалось у обследованных ими больных с пароксизмальной тахикардией, гипертоническими кризами.



## ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ ФОСФАТАЗ

Фосфатазы, или гидролазы фосфомоно- и фосфодиэфиров — ферменты, отщепляющие остаток фосфорной кислоты от ее органических эфирных соединений. Их можно разделить на фосфомоноэстеразы (КФ 3.1.3) и фосфодиэстеразы (КФ 3.1.4). Первые гидролизуют простые эфиры фосфорной кислоты. В зависимости от рН, при котором проявляется их наибольшая ферментативная активность, различают кислую и щелочную фосфатазу.

Термином «щелочная фосфатаза» (фосфомоноэстераза I, фосфогидролаза моноэфиров ортофосфата; КФ 3.1.3.1) обозначают целый ряд ферментов с оптимумом активности при рН от 8,6 до 10,1. Сильным активатором ее являются ионы магния.

Щелочная фосфатаза содержится практически во всех тканях человеческого организма. Особенно много ее обнаруживается в костной ткани, паренхиме печени, почек, предстательной, молочной железах и клетках слизистой оболочки кишечника. Печень удаляет фермент с желчью. Содержание щелочной фосфатазы у детей в 1,5—3,0 раза выше, чем у взрослых.

Болгарские исследователи при электрофорезе в агаровом геле выделили пять изоферментов щелочной фосфатазы (ЩФ), специфичные для печени (печеночная, ЩФ<sub>1</sub>), костной ткани (костная, ЩФ<sub>2</sub>), толкии кишок (кишечная, ЩФ<sub>3</sub>), плаценты (плацентарная, ЩФ<sub>4</sub>, появляющаяся во второй половине беременности), желчных путей (холестатическая, ЩФ<sub>5</sub>). Различают еще почечную фосфатазу, а также изофермент ЩФ «Реган». Этот изофермент обнаруживается у 1/6 всех онкологических больных и 1/3 тех больных, у которых отмечается повышение активности щелочной фосфатазы.

Кислая фосфатаза (фосфогидролаза моноэфиров ортофосфата; КФ 3.1.3.2) представляет собой смесь трех основных разновидностей изоферментов, обозначаемых римскими цифрами II, III, IV.

Фосфомоноэстераза II (оптимальное действие при рН 4,6) в противоположность остальным кислым фосфатазам сильно ингибируется тартратом (на этом и основывается определение простатического изоэнзима фермента); ионы магния на нее не влияют. Фосфомоноэстераза II содержится главным образом в предстательной железе. Активность кислой фосфатазы (КФ) в сыворотке крови человека невелика. Кислая фосфатаза III (рН 3,4—4,4) находится в печени и других паренхиматозных органах, кислая фосфатаза IV (рН 5,2—6,2) — в эритроцитах. Изоэнзим КФ обнаруживается также в тромбоцитах.

Еще большее количество форм изоферментов кислой фосфатазы выявлено с использованием методов электрофореза. Так, благодаря их применению найдены 7 клеточно-специфичных изоферментов белой крови, 7 фракций изоферментов КФ в печени, 5 фракций изоферментов в простате, 7 фракций изоферментов в эпидидимисе, одна фракция в коже. Методом энзим-электрофореза в полиакриламидном геле обнаружено 7 фракций изоферментов у здоровых взрослых людей и 6 фракций изоферментов у здоровых детей (Н. А. Андреев, Д. П. Андерсоне, 1978).

Щелочная фосфатаза сыворотки крови стабильна, поэтому сыворотка может храниться при комнатной температуре (лучше в холодильнике) в течение нескольких дней.

Кислая фосфатаза при комнатной температуре быстро теряет свою активность. В связи с этим кровь рекомендуют центрифугиро-

вать тотчас после ее взятия. К тому же в ходе определения кислой фосфатазы в сыворотке крови нужно остерегаться гемолиза. Ее следует хранить в замороженном состоянии.

Методы исследования фосфатаз в сыворотке крови различаются по используемому субстрату и состоят в определении отщепившегося в результате ферментативного гидролиза неорганического фосфора или органического остатка (табл. 15).

Табл. 15. Методы определения активности фосфатаз в сыворотке крови

Используемый субстрат	Авторы методов	Год публикации методики
Натриевый $\beta$ -глицерофосфат	Боданский	1933
	Кей	1930
	Шинновара с сотр.	1942
Динатриевый фенолфосфат	Кинг и Армстронг	1934
	Кинд и Кинг	1954
Динатриевый р-нитрофенилфосфат	Бессей, Лоури, Брок	1946
	Г. К. Шлыгин, С. Я. Михлин	1955
	А. А. Покровский с сотр.	1964
$\beta$ -нафтилфосфат	Селигмен с сотр.	1951
Фенолфталеиндифосфат	Хеггинс, Толален	1945
Фенолфталеинмонофосфат	Бабсон с сотр.	1966
Гимолфталеинмонофосфат	Колеман и Строже	1966

Методы исследования щелочной и кислой фосфатаз рознятся только по рН применяемого буферного раствора.

Наибольшее распространение в клинических лабораториях для определения активности фосфатаз в сыворотке крови имеют методы: 1) Боданского, 2) Кинга и Армстронга. В последние годы за рубежом и в лабораториях Советского Союза все чаще стал применяться паранитрофенилфосфатный метод исследования активности фосфатаз в сыворотке крови.

Метод Боданского основан на ферментативном гидролизе  $\beta$ -глицерофосфата с освобождением неорганического фосфора, устанавливаемого колориметрически.

Метод Кинга и Армстронга базируется на ферментативном гидролизе фенолфосфата. Выделенный в результате реакции фенол определяют колориметрически с реактивом Фолина.

Метод Бессей, Лоури, Брока основан на ферментативном гидролизе р-нитрофенилфосфата. Освобожденный р-нитрофенол в щелочной среде имеет желтое окрашивание. р-Нитрофенилфосфат, используемый в качестве субстрата в методе Бессей с сотр., обладает большей

субстратной специфичностью к щелочной фосфатазе, чем другие субстраты. Щелочная фосфатаза расщепляет его в 1,15 раза быстрее, чем динатриевый фенолфосфат, в 3 раза быстрее, чем  $\beta$ -глицерофосфат, и в 30 раз быстрее, чем фенолфталсиндифосфат.

В ряде лабораторий сравнивались методы определения активности фосфагаз в сыворотке крови. Многие авторы отмечали высокую чувствительность и точность способа Бессея с сотр. По точности и чувствительности он не уступает методам Боданского и Кинга — Армстронга.

p-Нитрофенилфосфатному способу кроме преимуществ, касающихся специфичности применяемого субстрата, свойственны по сравнению с другими методами меньшая затрата времени и небольшое количество реактивов, поскольку исследование активности фермента этим методом базируется не на специальной реакции, а на измерении интенсивности окраски p-нитрофенола, образующегося в результате ферментативного гидролиза.

Динатриевый p-нитрофенилфосфат производится отечественной промышленностью. Высокая чувствительность и относительная простота метода послужили основанием для утверждения его в качестве унифицированного при определении активности щелочной фосфатазы в сыворотке крови.

Вторым унифицированным методом исследования активности фосфатаз является способ Боданского.

#### Определение активности щелочной фосфатазы в сыворотке крови по гидролизу p-нитрофенилфосфата (метод Бессея, Лоури, Брока)

**Принцип.** Субстрат p-нитрофенилфосфат натрия гидролизуется ферментом сыворотки крови с образованием p-нитрофенола, дающего в щелочной среде желтое окрашивание. Интенсивность окраски пропорциональна активности фермента.

**Реактивы.** 1. Раствор p-нитрофенилфосфата натрия (субстрата) в 0,001 н растворе соляной кислоты — 0,4 г/100 мл, pH 6,5—8,0. Так как в продаже чаще имеется бариевая соль p-нитрофенилфосфата, то перевод ее в натриевую осуществляется следующим образом. К мере p-нитрофенилфосфата бария, соответствующей получению 0,9 г/100 мл раствора и помещенной в фарфоровую ступку, добавляют небольшими порциями 0,001 н раствор соляной кислоты при постоянном растирании соли в течение 10 мин. Доливанием насыщенного раствора сернистого 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 его взбалтывают с равным объемом водонасыщенного бутанола (для удаления p-нитрофенола). После разделения слоев жидкости в указанной воронке (вверху бутанол, внизу постепенно обесцвечивающийся субстратный раствор) бутанол выливают, а субстратный раствор подвергают описанной процедуре еще 2—3 раза, пока он не станет совершенно бесцветным. Потом производят экстракцию смеси водонасыщенным эфиром.

Реактив не должен содержать свободный p-нитрофенол, отсутствие которого в субстратном растворе проверяют следующей пробой: к 1 мл субстратного раствора прибавляют 10 мл 0,02 н NaOH и колориметрируют на ФЭКе с фиолетовым светофильтром при длине

полны 415 нм; экстинкция должна быть меньше 0,08. Если экстинкция больше этой величины, необходимо удалить из раствора свободный р-нитрофенол.

С этой целью реактив экстрагируют 2 или 3 раза равными объемами бутилового спирта и один раз — эфиром. Затем удаляют следы эфира выдерживанием смеси на воздухе. Бутиловый спирт и эфир должны иметь нейтральную реакцию. Если реактив не выдерживает указанного теста, то экстрагирование повторяют. Хранят раствор в холодильнике в замороженном состоянии несколько недель.

р-Нитрофенилфосфат «Эстман» содержит около 50 % инертного материала. Поэтому нужно использовать двойное количество этого препарата. Можно перекристаллизовать препарат, растворяя его в горячем 87° спирте.

Хранят раствор в холодильнике в течение 2—3 недель.

2. Буферный раствор. 0,05 моль/л глицинового буфера с добавлением катализатора  $MgCl_2$  (95 мг/л), 375 мг глицина и 10 мг  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$  смешивают с 42 мл 0,1 н раствора NaOH и доводят объем дистиллированной водой до 100 мл.

Вместо глицинового буфера можно использовать 0,05 моль/л вероналового буфера (рН 10,5), в который вносят хлористый магний (95 мг/л). Реактив хранят в холодильнике.

3. Субстратно-буферный раствор для исследования активности щелочной фосфатазы готовят смешиванием равных частей растворов 1 и 2 (рН данного реактива должен быть 10,5). При необходимости рН доводят раствором HCl или NaOH. Смешивание 2 мл субстратно-буферного с 10 мл 0,02 н раствора NaOH не должно давать экстинкцию более 0,1 при колориметрии на ФЭКе в кювете с толщиной слоя 10 мм и длинах волн 416 или 400—420 нм. В противном случае реактив не годен или подлежит реэкстрагированию бутанолом или эфиром. После экстракции следует снова установить рН 10,5. Хранят реактив в холодильнике в течение 2—3 дней (лучше в замороженном виде).

4. 0,02 н раствор едкого натра. Раствор готовят на дистиллированной воде, освобожденной от углекислого газа путем предварительного кипячения.

5. Стандартный раствор р-нитрофенола —  $5 \cdot 10^{-5}$  моль/л. 69,6 мг химически чистого р-нитрофенола вносят в небольшое количество 0,02 н раствора NaOH и доводят этим же раствором объем до 100 мл. 1 мл основной смеси, содержащей 5 мкмоль р-нитрофенола, доливают 0,02 н раствором NaOH до 100 мл. В 1 мл полученного рабочего реактива входит 0,05 мкмоль р-нитрофенола.

Ход определения. В опытные и контрольные пробирки вносят по 1 мл субстратно-буферного раствора, прогревают их при температуре +37°С в течение 5 мин, затем в опытные пробирки добавляют по 0,1 мл сыворотки. Содержимое пробирок перемешивают и инкубируют 30 мин при +37°С.

После инкубации пробирки помещают в водяную баню со льдом, в контрольные пробы доливают по 0,1 мл сыворотки, затем во все пробирки интенсивной струей (для лучшего перемешивания реактивов) вносят по 10 мл 0,02 н раствора NaOH. Через 3—5 мин пробы колориметрируют на фотоэлектроколориметре с фиолетовым фильтром (400—420 нм) в кювете с толщиной слоя 10 мм. Полученные результаты сравнивают с соответствующими данными контрольных проб. Контрольные пробы проводят для каждой сыворотки.

Затем находят разность экстинкций опытной и контрольной проб и по калибровочной кривой оценивают активность фермента в мкмоль р-нитрофенола высвобожденного из натриевой соли р-нитрофенилфосфата под действием содержащейся в 0,1 мл сыворотки крови щелочной фосфатазы за 30 мин хода ферментной реакции. При пересчете данных на 1 мл сыворотки и на длительность реакции 1 ч количество мкмоль р-нитрофенола умножают на 10 и на 2. При этом получают ответ в мкмоль р-нитрофенола на 1 (ч · мл). Активность фермента, образующего в указанных условиях 1 мкмоль р-нитрофенола, соответствует 1 ед. Бессея, Лоури, Брока. Таким образом, выраженная в ед. Бессея активность щелочной фосфатазы численно равна количеству мкмоль р-нитрофенола, которое выделялось бы в процессе часовой реакции при взаимодействии субстрата с 1 мл сыворотки.

В соответствии с требованиями новой системы единиц, активность ЩФ следует выражать количеством ммоль р-нитрофенола в пересчете на 1 л биологической жидкости за время инкубации 1 ч. Численные значения активности фермента при переводе результатов из старой системы единиц в новую не изменяются.

Для построения калибровочной кривой нужно выполнить следующее. 1, 2, 3, 5 и 7 мл рабочего стандартного раствора, содержащего соответственно 0,05, 0,10, 0,15, 0,25 и 0,35 мкмоль р-нитрофенола, с помощью 0,02 н раствора NaOH доводят до объема 11,1 мл (табл. 16) и измеряют оптическую плотность смеси. Результаты сравнивают с данными измерения оптической плотности 0,02 н раствора NaOH. Строят кривую, откладывая на оси ординат значения экстинкции, а на оси абсцисс — активность фермента в ммоль р-нитрофенола/(ч · л).

Табл. 16. Данные к построению калибровочного графика для определения активности щелочной фосфатазы

№ пробинок	Стандартный раствор р-нитрофенола (мл)	Содержание р-нитрофенола в пробе (мкмоль)	0,02 н NaOH (мл)	Единицы Бессея, Лоури, Брока и численно соответствующие им единицы размерности (ммоль/(ч · л))
1	1,0	0,05	10,1	1
2	2,0	0,10	9,1	2
3	3,0	0,15	8,1	3
4	5,0	0,25	6,1	5
5	7,0	0,35	4,1	7

В норме активность щелочной фосфатазы в сыворотке крови равна 0,5—1,3 ммоль/(ч · л) (или 0,5—1,3 ед. Бессея — Лоури — Брока).

Примечание. Сыворотка не должна быть гемолизирована. Кровь для определения активности щелочной фосфатазы нужно брать у обследуемого через несколько дней после прекращения приема сульфаниламидов и антибиотиков.

Исследование активности щелочной фосфомоноэстеразы в сыворотке крови диагностическим набором реактивов фирмы «Лаксма»

(ЧССР) представляет собой унифицированный метод определения активности щелочной фосфатазы.

Нам хочется лишь отметить, что при пользовании набором реактивов для получения правильных результатов следует брать раствора щелочи на 1,0 мл больше того объема, который рекомендуется применять при постановке опытных и стандартных проб. Только при этом условии можно достичь заполнения кювет с шириной слоя 10 мм. Оценку результатов нужно выражать в ммоль/(ч·л).

В настоящее время фирма «Лахема» (ЧССР) освоила выпуск наборов реактивов для исследования активности щелочной фосфатазы оптимизированным методом.

### Определение активности щелочной и кислой фосфатаз в сыворотке крови по гидролизу $\beta$ -глицерофосфата (метод Боданского)

**Принцип.** Под действием фермента сыворотки крови  $\beta$ -глицерофосфат натрия подвергается гидролизу с освобождением неорганического фосфора, по которому и судят об активности данного энзима.

**Реактивы. 1.** Исходный раствор  $\beta$ -глицерофосфата. В мерную колбу на 100 мл вносят 1 г натриевой соли  $\beta$ -глицерофосфата и 0,85 г барбитуровокислого натрия (медиснала), приливают около 30 мл дистиллированной воды и после полного растворения указанных реактивов объем полученного раствора доводят дистиллированной водой до метки, для консервации к нему добавляют около 3 мл толуола.

Раствор сохраняют в темном флаконе в холодильнике, его можно использовать в течение 10—15 дней.

**2.** Щелочной раствор  $\beta$ -глицерофосфата. В мерную колбу на 100 мл вносят 50 мл исходного раствора  $\beta$ -глицерофосфата, 2,8 мл 0,1 н раствора NaOH и после проверки pH (pH 8,6) объем смеси доводят дистиллированной водой до метки; затем приливают около 3 мл толуола. Раствор может храниться в холодильнике 10 дней.

**3.** Кислый раствор  $\beta$ -глицерофосфата. В мерную колбу на 100 мл приливают 50 мл исходного раствора  $\beta$ -глицерофосфата, 5 мл 1 н уксусной кислоты и после доведения объема смеси дистиллированной водой до метки добавляют около 3 мл толуола. pH раствора должен составлять  $5,0 \pm 0,1$ . Полученный реактив сохраняют в холодильнике.

**4.** Молибденовый раствор. 2,5 г молибденовокислого аммония растворяют в 60 мл дистиллированной воды и фильтруют в мерную колбу на 100 мл. В другом сосуде готовят раствор серной кислоты путем добавления к 25 мл дистиллированной воды 7,5 мл концентрированной  $H_2SO_4$ . Растворы соединяют и по охлаждению объем полученного реактива доводят дистиллированной водой до метки. Меняют раствор один раз в месяц; он не пригоден к работе, если на дне его образуется осадок.

**5.** 0,1 н раствор соляной кислоты (готовят из фиксаля).

**6.** Раствор аскорбиновой кислоты. Непосредственно перед применением 1 г аскорбиновой кислоты растворяют в 100 мл 0,1 н HCl.

**7.** 0,1 н раствор NaOH (готовят из фиксаля).

**8.** 1 н раствор уксусной кислоты.

**9.** Раствор трихлоруксусной кислоты — 10 г/100 мл.

**10.** Основной стандартный раствор фосфора. Отвешивают на аналитических весах 0,1000 г фосфора и растворяют в 100 мл 0,1 н HCl.

литических весах 0,4394 г химически чистого однозамещенного фосфорнокислого калия ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), предварительно высушенного до постоянного веса в эксикаторе над серной кислотой. Отвешенную меру полностью переносят в мерную колбу на 100 мл, растворяют в небольшом количестве воды и доводят объем дистиллированной водой до метки. Для консервации в приготовленный раствор добавляют несколько капель хлороформа.

Перед употреблением основной раствор разбавляют дистиллированной водой в 100 раз: 1 мл основного реактива вливают в мерную колбу на 100 мл и доводят его объем до метки; 1 мл полученного рабочего стандартного раствора содержит 0,01 мг фосфора.

**Ход определения щелочной и кислой фосфатаз.** В 4 пробирки (2 опытных — для исследования активности щелочной и кислой фосфатаз и 2 контрольных — для установления содержания в сыворотке неорганического фосфора) приливают по 1 мл соответствующего (щелочного и кислого) раствора  $\beta$ -глицерофосфата (табл. 17). Первые 2 пробирки на несколько минут помещают в водяную баню или термостат (+37 °C) с целью прогревания раствора субстрата. Затем осторожно, избегая образования пузырьков воздуха, в пробирки вносят по 0,1 мл свежеснятой сыворотки и полученную ферментсубстратную смесь инкубируют в течение 1 ч при температуре +37 °C. Учитывая, что активность кислой фосфатазы в нормальной крови обычно весьма незначительна, иногда гидролиз соответствующей пробы проводят три часа; цифру, выражающую результат, делят на три.

Табл. 17. Определение активности щелочной и кислой фосфатаз в сыворотке крови

Пробирки	Щелочной глицерофосфат (мл)	Кислый глицерофосфат (мл)	Термостат (+37°С, мин)	Сыворотка (мл)	Температура (+37°С, ч)	ТХУ (мл)	Сыворотка (мл)	Центрифугирование (10 мин)	Центрифугат (мл)	Молибденовый раствор (мл)	Аскорбиновая кислота (мл)
Щелочная П <sub>1</sub>	1	—	5	0,1	1	1,1	—	Через 5 мин.	1,5	1	1
К <sub>1</sub>	1	—	—	—	(1)	1,1	0,1	»	1,5	1	1
Кислая П <sub>2</sub>	—	1	5	0,1	1	1,1	—	»	1,5	1	1
К <sub>2</sub>	—	1	—	—	(1)	1,1	0,1	»	1,5	1	1

Время термостатирования опытных проб может быть использовано для определения содержания неорганического фосфора в контрольных пробирках. Для этого к 1 мл щелочного (или кислого) раствора  $\beta$ -глицерофосфата приливают 1,1 мл раствора трихлоруксусной кислоты, после чего добавляют 0,1 мл той же сыворотки; пробирку взбалтывают и через несколько минут фильтруют или центрифугируют.

К 1,5 мл отобранного фильтрата (центрифугата) доливают 1 мл молибденового раствора, 1 мл раствора аскорбиновой кислоты, пробирку выдерживают в течение 10 мин при комнатной температуре, по-



ле чего колориметрируют на ФЭКе с красным светофильтром в кювете с шириной слоя 5 мм. При учете оптической плотности проб в качестве раствора для сравнения используют дистиллированную воду (вместо нее лучше использовать пробу на реактивы, содержащую  $\beta$ -глицерофосфат).

Рассчитывают активность щелочной и кислой фосфатаз по калибровочной кривой. В 6 пробирок приливают 0,6; 1,2; 2,4; 3,6; 4,8 и 6 мл стандартного рабочего раствора неорганического фосфора (табл. 18), содержащего соответственно 0,006; 0,012; 0,024; 0,036; 0,048 и 0,06 мг фосфора.

Табл. 18. Данные к построению калибровочной кривой для определения активности фосфатаз

Реактивы	Номера пробирок					
	1	2	3	4	5	6
Рабочий раствор Р (мл), содержащий фосфор (мг)	0,6	1,2	2,4	3,6	4,8	6,0
Раствор ТХУ (мл)	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
Вода дистиллированная (мл)	5,9	5,3	4,1	2,9	1,7	0,5
Объем отобранной (после избалтывания) смеси (мл)	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
К содержимому всех пробирок добавляют						
молибденовый раствор (мл)	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
аскорбиновую кислоту (мл)	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0

Во все пробирки добавляют по 2,5 мл раствора трихлоруксусной кислоты, а затем такое количество дистиллированной воды, чтобы общий объем в каждой пробирке стал равен 9 мл (соответственно доливают 5,9; 5,3; 4,1; 2,9; 1,7; 0,5 мл дистиллированной воды).

Из каждой пробирки отбирают по 1,5 мл содержимого, добавляют по 1 мл молибденового реактива, по 1 мл раствора аскорбиновой кислоты.

Через 10 мин после приливания молибденового реактива проб колориметрируют на ФЭКе с красным светофильтром в кювете с толщиной слоя 5 мм. Результаты сравнивают с аналогичными данными при фотометрировании дистиллированной воды (наличие проб  $\beta$ -глицерофосфата низкого качества может служить причиной возникновения более или менее выраженной окраски контрольной пробы).

При построении калибровочной кривой на оси абсцисс откладывают цифры содержания фосфора в 1,5 мл раствора (для 1, 2, 3, 4, 5 и 6-й проб — 0,001; 0,002; 0,004; 0,006; 0,008; 0,010 мг), а на оси ординат — соответствующие им значения экстинкции.

В качестве единицы масштаба на оси абсцисс желательнее брать не менее 20 мм: в этом случае график получается более крупный, а возможная ошибка, связанная с его построением, уменьшается.

Активность фосфатазы ранее выражалась количеством мг неорганического фосфора, образующегося в результате деятельности всей фосфатазы, заключенной в 100 мл сыворотки (единицы Боданского).

Для этого по калибровочной кривой рассчитывают число мг неорганического фосфора в опытных ( $\Pi_1$  и  $\Pi_2$ ) и контрольных ( $K_1$  и  $K_2$ ) пробах. Затем, вычтя из показателей содержания фосфора в опытных пробах количество неорганического фосфора, найденное в контрольных пробах, определяют то количество фосфора, которое освободилось при деятельности фосфатазы, заключенной в 0,1 мл сыворотки. Очевидно, под влиянием ферментативной активности фосфатазы, содержащейся в 100 мл сыворотки, неорганического фосфора выделилось бы в 1000 раз больше.

Отсюда активность щелочной (1) и кислой (2) фосфатаз рассчитывают по следующим формулам:

$$(\Pi_1 - K_1) \cdot 1000 = a \text{ ед. Боданского (1),}$$

$$(\Pi_2 - K_2) \cdot 1000 = a \text{ ед. Боданского (2),}$$

где  $\Pi_1$ ,  $\Pi_2$  ( $K_1$ ,  $K_2$ ) — количество неорганического фосфора, содержащегося в опытных (и контрольных) пробах; 1000 — коэффициент пересчета; а — количество единиц Боданского (ВЕ).

В норме активность щелочной фосфатазы в сыворотке взрослых людей составляет 2—5 ед., у детей — 5—12 ед. Боданского.

Активность кислой фосфатазы в сыворотке крови взрослых и детей колеблется в пределах от 0,1 до 0,55 ед. Боданского.

Хочется подчеркнуть, что приведенный способ выражения активности фосфатаз (в ед. Боданского) является устаревшим.

Приказ об унификации лабораторных методов исследования и введении новой системы единиц требуют определять активность этих ферментов по количеству выделенного неорганического фосфора (в ммоль) при действии на субстрат 1 л сыворотки за время инкубации 1 ч при  $+37^\circ\text{C}$ .

Пересчет активности фермента в ммоль неорганического фосфора, образовавшегося в результате инкубации 1 л сыворотки в течение 1 ч при  $+37^\circ\text{C}$ , производится по следующей формуле:

$$(a \cdot 1,47 \cdot 10^4) / 31,$$

где а — количество мг неорганического фосфора, найденное по калибровочному графику;  $1,47 \cdot 10^4$  — коэффициент пересчета с 0,068 мл на 1 л сыворотки; 31 — масса 1 ммоль неорганического фосфора (мг).

Более удобно на оси абсцисс калибровочного графика отложить готовые значения активности фермента, в которых уже предусмотрен пересчет результатов по приведенной формуле на ммоль/(ч·л).

В норме активность щелочной фосфатазы составляет у взрослых 0,5—1,3 ммоль неорганического фосфора на 1 л сыворотки за 1 ч инкубации смеси при температуре  $+37^\circ\text{C}$  (0,5—1,3 ммоль/(ч·л)). Активность кислой фосфатазы — 0,05—0,13 ммоль/(ч·л).

Примечание. Для установления активности фосфатаз кровь у обследуемых нужно брать утром, натощак и через несколько дней после прекращения ими приема сульфаниламидных препаратов и антибиотиков.

Анализ должен быть произведен не позже 24 ч после взятия крови.

Не рекомендуется вести определение активности фермента в сыворотке с признаками гемолиза.

В настоящее время в нашу страну фирма «Лахема» (ЧССР) поставляет диагностические наборы реактивов, позволяющие исследовать как общую активность кислой фосфатазы, так и ее простатическую фракцию. Последнее особенно важно для диагностики новообразований предстательной железы.

Для фракционирования изоферментов ЩФ широко используют и диск-электрофорез в полиакриламидном (с концентрацией акриламида 7,5 г/100 мл) геле (Т. И. Калунаева, 1977). В отличие от электрофореза на других носителях этим методом можно достичь четкого разделения основного печеночного, костного, кишечного и плацентарного изоферментов ЩФ, а при заболеваниях печени выявить увеличение и дополнительных.

*Клинико-диагностическое значение исследования активности щелочной и кислой фосфатазы в сыворотке крови*

Возрастание активности щелочной фосфатазы встречается главным образом у больных с двумя видами патологии: костными заболеваниями, связанными с пролиферацией остеобластов, и с заболеваниями, сопровождающимися явлениями холестаза.

Исследование активности щелочной фосфатазы приобрело особенно большое значение у детей, так как активность этого фермента, как правило, повышается у них при рахите, причем еще до появления клинических симптомов заболевания и раньше снижения неорганического фосфора в крови. Активность щелочной фосфатазы увеличена на протяжении всего периода заболевания и выравнивается после затихания клинических симптомов рахита.

Путем определения щелочной фосфатазы удается выявить скрытые формы рахита, а при систематическом обследовании детей — и предрахитические стадии заболевания. Повышение активности фосфатаз в данном случае надо рассматривать как компенсаторный механизм обеспечения потребностей организма в неорганических фосфатах.

Гиперфосфатаземия встречается также при распаде костной ткани — гиперпаратиреозидизме, болезни Педжета, карциноме костной ткани (болезни Реклинггаузена); часто отмечается параллелизм между высокими показателями активности фермента и истончением скелета.

Изменение щелочной фосфатазы имеет место у больных с саркомой костей, отмечено повышение активности фермента в случае преобладания у них остеобластических процессов и снижение — при остеолитическом течении заболевания. Это подтверждается наблюдением нормального уровня активности щелочной фосфатазы в крови у больных с опухолями костей без новообразований костной ткани (остеомы, хондромы, гигантоклеточная опухоль, множественная миелома и другие).

Не повышается активность фермента в крови также при деструктивном характере повреждения костей.

Метастазирование опухолей в кости приводит к возрастанию активности щелочной фосфатазы, но еще больший подъем активности фермента наблюдается при метастазировании в печень.

При заболеваниях печени, сопровождающихся повреждением паренхимы (вирусный гепатит, саркоидоз, туберкулез, амилоидоз и лим-

фогранулематоз), отмечается умеренное возрастание активности щелочной фосфатазы. Особенно резкое повышение ее активности встречается при желтой атрофии. Увеличивается активность щелочной фосфатазы также при обтурационной (механической) желтухе.

У больных вирусным гепатитом отмечено относительное повышение активности изофермента ЩФ<sub>1</sub> (печеночного). У некоторых больных выявляется кишечный изофермент ЩФ. При тяжелом течении болезни наблюдаются наиболее продолжительные изменения. У больных циррозом печени обнаруживается стойкое увеличение активности печеночного и кишечного изоферментов. Преобладание кишечного изофермента параллельно со слабой активностью или отсутствием печеночного изофермента расценивается у больных как неблагоприятный прогностический признак (Л. Л. Громашевская с соавт., 1979).

Повышение активности щелочной фосфатазы отмечено и при заболеваниях мышц.

Лейкемия, в большей степени миелоидная, сопровождается умеренным возрастанием активности щелочной фосфатазы крови. По-видимому, здесь имеет место выход фермента из разрушающихся лейкоцитов в кровь.

Наблюдаются также гипофосфатаземии (уменьшение активности щелочной фосфатазы крови), которые соответствуют у больных ослабленно остеобластическим процессам (гипотиреоз, гиповитаминоз С, старческий остеопороз, анемия Кули).

Описано самостоятельное заболевание — эссенциальная, или идиопатическая, гипофосфатазия, протекающая в виде тяжелого рахита.

Определение кислых фосфатаз широко используют для диагностики новообразований предстательной железы. Повышение активности кислой фосфатазы при нормальном уровне щелочной указывает на новообразования в железе. Однако в начальной стадии рака предстательной железы активность фосфатазы может находиться в пределах нормы. Статистически установлено, что увеличение активности энзима встречается лишь в 1/4 части случаев первичного рака предстательной железы. Активность фермента особенно повышается при метастазировании рака предстательной железы. Введение тестостерона (провокационные пробы) увеличивает число положительных фосфатазных проб.

При метастазе карциномы предстательной железы в кости может нарастать и активность щелочной фосфатазы.

Замечено, что активность ревматического процесса сопровождается возрастанием уровня кислой фосфатазы в сыворотке крови. Наиболее высокая активность фермента наблюдается у больных с затяжным и непрерывно рецидивирующим процессами. Этот тест может быть применен для оценки эффективности гормональной терапии и выявления малоактивных форм ревматического процесса с неблагоприятным течением.

## ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ $\alpha$ -АМИЛАЗЫ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ И МОЧЕ

$\alpha$ -амилаза (диастаза,  $\alpha$ -1,4-глюкан-4-глюконогидролаза; КФ 3.2.1.1) — фермент, осуществляющий гидролитическое расщепление полисахаридов (крахмала, гликогена и других продуктов, содержащих три и более остатков глюкозы) до декстринов и мальтозы.

Процесс распада полисахаридов, происходящий по месту  $\alpha$ -1,4-глюкозидных связей, включает в себя ряд стадий: крахмал  $\rightarrow$  эритродекстрины  $\rightarrow$  ахродекстрины  $\rightarrow$  мальтотетроза  $\rightarrow$  мальтоза  $\rightarrow$  глюкоза. Конечный продукт действия амилазы не дает цветной реакции с йодом.

Наиболее богаты амилазой поджелудочная и слюнные железы. Амилаза секретируется в кровь главным образом из этих органов.

Плазма крови человека содержит  $\alpha$ -амилазы двух изотипных типов: панкреатическую (р-тип), вырабатываемую поджелудочной железой, и слюнную (S-тип), продуцируемую слюнными железами. Считают, что у здоровых людей в сыворотку крови входит две изоамилазы р-типа и три — S-типа. В каждом из этих типов амилаз имеется несколько изоформ. Так, показано существование 7 фенотипов амилазы слюны и 3 фенотипов амилазы панкреатического сока. Изоамилазы слюны делят на два семейства (в зависимости от их молекулярной массы и электрофоретической подвижности).

Третий тип амилазы — крупная, или макроамилаза.

С мочой выделяется в основном р-амилаза, что является одной из причин большей информативности о функциональном состоянии поджелудочной железы уроамилазы, чем амилазы плазмы или сыворотки крови. Полагают, что 65 % амилазной активности мочи обусловлено панкреатической амилазой, в то время как 60% амилолитической активности сыворотки обеспечивается амилазой слюнных желез. Этим объясняется то обстоятельство, что при остром панкреатите именно она увеличивается в сыворотке (до 89 %) и особенно в моче (92 %) без изменения показателей амилаз слюнных желез.

У здоровых людей содержание слюнной и панкреатической амилазы в крови приблизительно одинаково, в моче же содержание панкреатической амилазы в 2 раза большее, чем амилазы слюнных желез.

Амилолитической активностью обладают не только поджелудочная и слюнные железы, но также кишечник, печень, почки, легкие, тонкая кишка, фаллопиевы трубы, жировая ткань человека и животных. Однако далеко не все из перечисленных органов служат продуцентами амилазы. Считают, что уровень амилазы в крови во многом зависит от функционального состояния печени.

Фермент связан как с белками плазмы крови, так и с форменными ее элементами. Возможно, это является формой депонирования и транспорта фермента.

Существующие методы изучения активности  $\alpha$ -амилазы в биологических жидкостях (сыворотке, моче, поте) крови делятся на две основные группы:

1. Сахарифицирующие, основанные на исследовании образующихся из крахмала сахаров по редуцирующему действию глюкозы и мальтозы.

2. Амнокластические, базирующиеся на определении остатка нерасщепленного крахмала по степени интенсивности его реакции с йодом. Молекулы декстринов, имеющие 30 гексозных остатков, дают в реакции с йодом синюю окраску раствора; молекулы, состоящие из 8—12 остатков, — красную; молекулы с входящими 4—5 гексозными остатками не окрашивают реактив.

По мнению многих авторов, амнокластические методы — более специфичные и чувствительные, чем сахарифицирующие. Из них наиболее удобны для практической работы микрометоды Смита и Роэ,

а также Каравея (со стойким субстратом), которые были предложены в качестве унифицированных.

Фирма «Лахема» (ЧССР) поставляет в нашу страну диагностические наборы реактивов для определения активности  $\alpha$ -амилазы в сыворотке крови и моче.

**Исследование активности  $\alpha$ -амилазы (диастазы)  
в сыворотке крови  
и моче амилокластическим методом**

Принцип метода основан на колориметрическом определении концентрации крахмала до и после его ферментативного гидролиза.

**Реактивы.** 1. Раствор крахмала — 2 г/100 мл. 2,0 г «растворимого» крахмала (например, для колориметрии) тщательно растирают в ступке с небольшим количеством (8—10 мл) воды. Полученную суспензию тонкой струей вливают (при постоянном помешивании) в кипящую в сосуде воду (около 100 мл), доводят объем до 100 мл и кипятят еще несколько минут до получения почти прозрачного раствора. После охлаждения реактив годен к употреблению. Он может храниться в холодильнике в течение 5—7 дней.

Предпочтительно ежедневно готовить раствор крахмала, так как в нем быстро разводятся грибки и бактерии (200 мг крахмала суспендируют в 1 мл холодной воды, затем добавляют 6—7 мл горячей дистиллированной воды, колбу погружают в кипящую водяную баню до полного растворения крахмала и доводят смесь дистиллированной водой до 10 мл). Субстрат должен быть прозрачным.

2. 0,1 моль/л фосфатного буфера, pH 7,2. Готовят (желательно ежедневно) путем смешивания 72 мл 0,1 моль/л раствора двузамещенного фосфорнокислого натрия состава  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (17,4 г/л) с 28 мл 0,1 моль/л раствора однозамещенного фосфорнокислого калия  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (13,6 г безводной соли растворяют в 1 л воды). Исходные смеси могут храниться в холодильнике 10—15 дней.

Кристаллогидрат  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  получают из соли с большим содержанием кристаллизационной воды путем выветривания ее при комнатной температуре на протяжении двух суток (для этого крупные кристаллы в фарфоровой ступке растирают в мелкие и тонким слоем распределяют их на чистом листе фильтровальной бумаги).

3. Раствор  $\text{NaCl}$  — 3 г/100 мл.

4. 1 н раствор  $\text{HCl}$ .

5. 0,1 н раствор йода. При отсутствии фиксанала его готовят следующим образом: 3,0 г  $\text{KI}$  растворяют в 25,0 мл дистиллированной воды, в которую вносят 1,27 г кристаллического йода, после этого объемом раствора доводят дистиллированной водой до 100,0 мл. При хранении в темноте раствор стоек длительное время.

**Ход определения.** В две пробирки (опытную и контрольную) вливают по 0,5 мл раствора крахмала, 0,3 мл фосфатного буфера и 0,1 мл раствора  $\text{NaCl}$ . После 10-минутного прогрева смеси при  $+37^\circ\text{C}$  в опытную пробирку добавляют 0,1 мл сыворотки (можно профильтрованную мочу в разведении 1 : 10 или 1 : 100), содержащее ее хорошо перемешивают и термостатируют точно 30 мин при  $+37^\circ\text{C}$ . Инкубацию смеси прерывают доливанием 0,1 мл раствора соляной кислоты (при этом pH реактива становится ниже, что приводит к прекращению действия амилазы). Затем 0,2 мл содержимого пробир-

ки переносят в 50-миллилитровую мерную колбу, в которую предварительно помещают 40 мл воды, 0,5 мл соляной кислоты, 0,1 мл раствора йода, и после размешивания доводят объем реагентов дистиллированной водой до метки.

Контрольную пробу (для измерения начальной экстинкции крахмала) обрабатывают точно так же, как опытную, но соляную кислоту прибавляют до инкубации смеси (то есть 0,1 мл исследуемого материала — сыворотки или разведенной мочи — вносят только после доливания в пробирку 0,1 мл раствора соляной кислоты).

Опытную и контрольную пробы колориметрируют тотчас же на ФЭКе с красным светофильтром (длина волны 630—690 нм) в кювете с толщиной слоя 10 мм. При фотометрировании проб в качестве раствора для сравнения используют дистиллированную воду.

До недавнего времени активность фермента было принято выражать в амилазных (диастатических) единицах на 100 мл сыворотки (или мочи) при инкубации смеси в течение 30 мин. При этом способе оценки энзиматической активности расчет вели исходя из того, что одна ед. диастазы (амилазы) соответствует расщеплению 10 мг крахмала. В связи с этим активность диастазы (амилазы) определяли формулой:

$$\frac{(E_{\text{к. пр.}} - E_{\text{оп. пр.}}) \cdot 10 \cdot 1000}{E_{\text{к. пр.}} \cdot 10}$$

где 10 в числителе — количество крахмала (мг), введенного в опытную и контрольную пробы; 1000 — коэффициент пересчета активности фермента на 100 мл сыворотки; 10 в знаменателе — коэффициент пересчета на ед. диастазы (амилазы).

После сокращения формула приобретает следующий вид:

$$\frac{E_{\text{к. пр.}} - E_{\text{оп. пр.}}}{E_{\text{к. пр.}}} \cdot 1000 = a \text{ ед. амилазы.}$$

В случае использования разведенной мочи полученный результат умножали на коэффициент разведения.

В норме активность амилазы равна 80—120 ед., диастазы мочи — до 400 ед.

Согласно проведенной унификации и в соответствии с требованиями новой системы единиц рассчитывать активность ферментов следует по формуле:

$$\frac{E_{\text{к. пр.}} - E_{\text{оп. пр.}}}{E_{\text{к. пр.}}} \cdot 10 \cdot 20 = a \text{ г крахмала, гидролизованного 1 л сы-}$$

воротки или мочи за 1 ч инкубации при +37 °С, где 10 — количество крахмала (мг), введенного в опытную и контрольную пробы; 20 — коэффициент пересчета на количество крахмала (г), гидролизованного 1 л сыворотки или мочи за 1 ч инкубации. При расчете активности фермента в моче результаты умножают на цифру соответствующего разведения.

Нормальные показатели активности фермента для сыворотки крови — 16—30 г/(ч·л), в моче — 28—160 г/(ч·л) (в среднем — 107 ± 25,1 г/(ч·л)).

Примечания: 1. Для определения активности α-амилазы рекомендуется исследовать свежую сыворотку и мочу (хотя и существует мнение, что активность амилазы в сыворотке крови при комнатной температуре оста-



ется без изменений в течение нескольких дней). Однако, по данным Л. П. Деклаторской, активность фермента лучше устанавливать сразу после взятия проб, так как хранение сыворотки при комнатной температуре и в холодильнике при  $+4^{\circ}\text{C}$  приводило к снижению активности фермента. Слабый гемолиз не мешает исследованию. Лимоннокислую и щавелевоуксусную плазму применять нельзя, так как соли лимонной и щавелевой кислоты ингибируют активность фермента.

2. Интенсивность окраски йодно-крахмального раствора, содержащегося в колбочке, обратно пропорциональна колебаниям температуры. Поэтому надо следить за тем, чтобы в опытной и контрольной пробе во время цветной реакции температура была постоянной.

3. Профильтрованную мочу можно использовать и неразведенной. Однако при активности фермента выше  $140 \text{ г}/(\text{ч} \cdot \text{л})$  мочу следует развести (или укоротить период ее инкубации), что соответственно должно учитываться в расчете активности ферментов. При высокой гиперферментемии мочу разводят в 100 раз.

4. Нормальные показатели активности фермента для сыворотки крови и мочи желательнее проверять на донорах в каждой лаборатории.

5. При определении амилазной активности нужно иметь в виду, что слюна содержит в 1000 и 10 000 раз больше фермента, чем сыворотка. Пот также обладает амилазной активностью. Так, при перемешивании проб большим пальцем активность амилазы в пробе возрастала на 25—80 %.

### Определение активности $\alpha$ -амилазы со стойким крахмальным субстратом (метод Каравея)

#### Принцип метода амилотестический.

**Реактивы.** 1. Раствор субстрата. Кипятят 13,3 г безводного двузамещенного фосфорнокислого натрия и 4,3 г бензойной кислоты с 250 мл воды. Суспендируют 0,2 г растворимого крахмала в небольшом количестве холодной воды и вливают в кипящую смесь, поддерживают ее в таком состоянии в течение 1 мин. Затем охлаждают и доводят водой до 500 мл. Раствор устойчив при комнатной температуре. Он должен сохранять прозрачность.

2. 0,1 н основной раствор йода, который может быть получен следующими способами: а) из фиксанала; б) из кристаллического йода и йодистого калия: 30 г КJ растворяют в 250 мл дистиллированной воды, туда же вносят 12,7 г йода и доводят объем дистиллированной водой до 1000 мл. Полученный раствор (Люголя) хранят в темноте, он стоек; в) из йодата калия и йодистого калия: 3,567 г йодноватокислого калия ( $\text{KJO}_3$ ) и 45 г КJ растворяют в 800 мл воды и медленно при помешивании добавляют 9 мл концентрированной соляной кислоты, а затем доливают водой до объема 1000 мл.

3. Рабочий (0,01 н) раствор йода. 25 г фтористого калия растворяют в 350 мл воды, вводят 50 мл основного раствора йода и доливают водой до объема 500 мл. Годность раствора — около 2 мес при условии хранения в посуде из темного стекла в холодильнике. Если в рабочий раствор йода не добавлять фтористого калия, то его следует готовить ежедневно.

**Ход определения.** В две колбочки емкостью 50 мл (опытную и контрольную) отмеривают по 5 мл крахмального субстрата. Опытную пробу прогревают при  $+37^{\circ}\text{C}$  в течение 5 мин, после чего к ней доливают 0,1 мл сыворотки или профильтрованной мочи. Содержимое пробирки перемешивают и инкубируют в течение 7,5 мин в водяной бане при температуре  $+37^{\circ}\text{C}$ . Сразу же после прогревания опытной пробы в обе колбочки добавляют по 5 мл рабочего раствора йода. Объем реактивов в колбочках доводят дистиллированной водой до 50 мл и немедленно измеряют экстинкцию растворов на ФЭКе с крас-

ним светофильтром (630—690 нм) в кювете с шириной слоя 10 мм. При фотометрировании проб в качестве раствора для сравнения используют дистиллированную воду.

Рассчитывают активность по формуле:

$$\frac{(E_{\text{к. пр.}} - E_{\text{оп. пр.}}) \cdot 2 \cdot 80}{E_{\text{к. пр.}}} = a \text{ г крахмала, гидролизованного 1 л биологической жидкости за 1 ч инкубации при } +37^{\circ} \text{C} - \text{г}/(\text{ч} \cdot \text{л}),$$

где 2 — количество крахмала, введенного в опытную и контрольную пробы (мг); 80 — коэффициент пересчета на количество крахмала в г, гидролизованного 1 л биологической жидкости за 1 ч инкубации.

Показатели нормы те же, что и для метода Смита и Роэ.

#### Модификация метода определения активности $\alpha$ -амилазы по Каравею

**Принцип.** Тот же, что и в методе Каравея.

**Реактивы.** Те же, что и в методе Каравея.

**Ход определения.** В обычную химическую пробирку вносят 1 мл раствора крахмала, субстрат прогревают 5 мин в термостате (лучше водяном) при  $+37^{\circ} \text{C}$ , после чего к нему добавляют 0,02 мл негемоллизированной сыворотки (это делают пипеткой от гемометра Сали. После выдувания сыворотки ее следует прополоснуть смесью). Пробу вновь помещают ровно на 5 мин в термостат (в суховоздушном термостате для этого должны быть баночки с водой). Контрольную пробу проводят так же, как опытную, но сыворотку в нее не вносят. Затем во все пробирки (опытные и контрольные) доливают по 1 мл рабочего раствора йода и по 8 мл дистиллированной воды, пробирки хорошо взбалтывают и содержащиеся в них растворы колориметрируют на ФЭКе с красным светофильтром (630—690 нм) в кювете с шириной слоя 10 мм. При учете оптической плотности проб в качестве раствора для сравнения используют дистиллированную воду.

Рассчитывают активность  $\alpha$ -амилазы в г расщепленного крахмала на 1 л сыворотки за 1 ч инкубации при  $+37^{\circ} \text{C}$  по формуле:

$$\frac{E_{\text{к.}} - E_{\text{оп.}}}{E_{\text{к.}}} \cdot 240,$$

где 240 = 0,4 · 600; 0,4 — количество крахмала (мг), внесенного в опытную и контрольную пробы; 600 = 50 · 12 (50 — коэффициент пересчета на количество крахмала в г, гидролизованного 1 л сыворотки; 12 — коэффициент пересчета с 5 мин на 60 мин — 1 ч).

Нормативы — те же, что и в методе Каравея.

**Примечание.** Для выражения активности фермента в старых единицах (Сомоджи) значение  $\frac{E_{\text{к.}} - E_{\text{оп.}}}{E_{\text{к.}}}$  умножают на 1200. 1 ед. Сомоджи соответствует расщеплению 10 мг крахмала при действии фермента, заключенного в 100 мл сыворотки, за время инкубации смеси в течение 30 мин.

$$\frac{E_{\text{к.}} - E_{\text{оп.}}}{E_{\text{к.}}} \cdot 1200 = a \text{ ед. Сомоджи.}$$

Отношение между коэффициентами 240 и 1200 доказывают следующим образом:

240 — коэффициент пересчета на 1 мл сыворотки за 1 ч инкубации. Ед. Сомоджи предполагает: 1) пересчет на 100 мл. Отсюда  $240 \cdot 100 = 24\ 000$  мг; 2) пересчет не на 1 ч, а на 30 мин:  $24\ 000 : 2 = 12\ 000$  мг.

1 ед. Сомоджи соответствует расщеплению 10 мг крахмала при указанных выше условиях:

$$\frac{12\ 000\ \text{мг}}{10\ \text{мг}} = 1200.$$

### *Клинико-диагностическое значение определения активности $\alpha$ -амилазы в крови и моче*

Активность  $\alpha$ -амилазы в крови и моче в течение дня (а также от одного дня к другому) подвергается значительным изменениям. Отмечены существенные индивидуальные различия этих показателей у обследуемых без патологии органов пищеварения. Колебания выделения амилазы вызывают необходимость ее исследования в моче, собранной за сутки.

На показателях активности этого фермента сказывается характер питания: при увеличении утилизации глюкозы содержание амилазы в крови снижается. Эмоциональные, стрессовые состояния приводят к гиперамилаземии.

Изменение активности  $\alpha$ -амилазы крови и мочи происходит при беременности. Если в сроки беременности до 19 недель содержание  $\alpha$ -амилазы в крови уменьшается, то позднее оно увеличивается, достигая максимума к 33—34 неделям беременности (на 37—40-ю неделю оно незначительно снижается, будучи несколько выше у небеременных здоровых женщин и у женщин в ранние сроки беременности).

Значительное возрастание активности  $\alpha$ -амилазы встречается главным образом при заболеваниях поджелудочной железы. При остром панкреатите активность фермента крови и мочи увеличивается в 10—30 раз. Гиперамилаземия наступает в начале заболевания, достигает максимума в 12—24 ч после развития, затем быстро снижается и приходит к норме на 2—6-й день. Обычно гиперамилазурия длится дольше, чем увеличение активности фермента в сыворотке. Бывают острые панкреатиты без повышения активности фермента (в частности, при тотальном панкреонекрозе).

У больных с хроническими панкреатитами, раком поджелудочной железы не отмечается резкого возрастания активности амилазы крови, для диагностики этих заболеваний применяют провокационные пробы. Амилазная активность может быть повышена при целом ряде заболеваний, имеющих сходную клиническую картину с острым панкреатитом: острым аппендиците, перитоните, перфоративной язве желудка и двенадцатиперстной кишки (когда в процесс вовлекается и 12-перстная кишка). У больных с перитонитами увеличение амилазной активности является следствием развития образующих амилазу бактерий. Обычно активность фермента при указанных патологических состояниях повышается в 3—5 раз.

К заболеваниям, вызывающим гиперамилаземию непанкреатического происхождения (то есть без поражения непосредственно поджелудочной железы), относят почечную недостаточность, метастазы.

рование при раке легких, поражения слюнных желез с обтурацией их протоков, а также операции на верхней челюсти.

Следовательно, резко выраженная гиперамилаземия позволяет дифференцировать острый панкреатит не только от хронических заболеваний поджелудочной железы, но и от других патологических состояний, в том числе и от острых приступов желчнокаменной болезни.

В целом причинами гиперамилаземии являются нарушения оттока секретов из желез (продуцентов амилазы), некрозы ткани, повышение проницаемости гистогематического барьера в железах. Описание макроамилаземии, при которой из-за большой величины молекулы фермента не выделяются почками.

К заболеваниям с неизвестными или неопределенными причинами гиперамилаземии относят холецистит, холелитиаз, разрыв желчного пузыря, перфоративную пептическую язву, кишечную обтурацию, прерывание беременности, инфаркт брыжейки кишечника, перитонит, острый аппендицит, черепно-мозговую травму, ожог, травматический шок, диабетический кетоацидоз, трансплантацию почки, пневмонию, послеоперационный период, простатит.

Гиперамилаземии вызывают многие фармакологические и некоторые другие вещества: кортикостероидные препараты, адреналин, фуросемид, гистамин, салицилаты, антикоагулянты, морфин, кодеин, тетрациклин, а также алкоголь. В большинстве случаев это объясняется влиянием препаратов на отток секрета из железы и стимуляцией его продукции.

Важно отметить, что при гипертриацилглицеридемии амилотитическая активность сыворотки снижается или не изменяется даже у больных с острым панкреатитом.

Гипоамилаземия в клинической практике встречается редко и свидетельствует о недостаточности экзокринной функции поджелудочной железы.

Почти всегда амилаземия сопровождается амилазурией, но определение активности  $\alpha$ -амилазы мочи не всегда может служить точным показателем диагностики, так как выход амилазы в мочу связан с функцией почек. К тому же почки выделяют из крови только 24 % инкретированной пищеварительными железами амилазы.

А. Я. Жарковская (1979) показала, что исследование  $\alpha$ -амилазы в суточной моче является более надежным биохимическим тестом выявления заболевания поджелудочной железы, чем в разовой ее порции. Это более надежный показатель, чем установление активности  $\alpha$ -амилазы в сыворотке крови.

Повышение активности  $\alpha$ -амилазы в сыворотке крови у больных с хроническими заболеваниями почек и острыми уремиями можно объяснить уменьшением или отсутствием выделения фермента через почки.

Определение активности  $\alpha$ -амилазы в крови и моче может дать некоторые указания о функциональном состоянии почечного фильтра. У больных с нефрозами, гломерулонефритами и т. п. активность  $\alpha$ -амилазы увеличена, в то время как в моче она резко снижена. Коэффициент активности  $\alpha$ -амилазы крови / активность  $\alpha$ -амилазы мочи служит показателем функциональной полноценности почечного фильтра.

Заболеваниями, при которых наблюдается значительное повышение активности  $\alpha$ -амилазы в крови, являются паротиты, но ясная

клиническая картина указанного патологического состояния дает возможность легко объяснить гиперамилаземию. Введение кортизона или АКТГ повышает активность фермента в несколько раз.

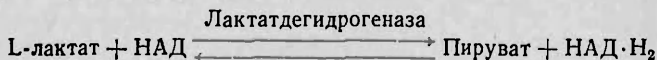
У больных с заболеваниями печени (гепатитами, циррозами, интоксикациями, злокачественными опухолями и их метастазами в печень) наблюдается снижение амилазной активности крови. Гипоамилаземия отмечается также у больных с обширными ожогами кожи, сахарным диабетом, гипотиреозами, с общим расстройством питания и падением веса (острыми, особенно токсическими, диспепсиями), кахексиями.

Таким образом, возрастание активности  $\alpha$ -амилазы крови и мочи не может считаться специфичным диагностическим тестом, так как при многих физиологических и патологических состояниях происходит изменение активности  $\alpha$ -амилазы крови и выделения энзима с мочой. Только значительные колебания активности  $\alpha$ -амилазы в биологических жидкостях достоверно свидетельствуют о патологии органов, продуцирующих фермент. Важное значение для улучшения диагностики заболеваний имеет определение ферментов в крови и моче (чтобы исключить нарушение функции почечного фильтра), а также исследование изоферментов. Так, при хроническом панкреатите, когда общая активность  $\alpha$ -амилазы сыворотки крови не изменяется, активность панкреатических изоферментов в ней понижена, а слюнных — повышена.

#### ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОБЩЕЙ АКТИВНОСТИ ЛАКТАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ

Лактатдегидрогеназа (L-лактат: НАД-оксидоредуктаза; КФ 1.1.1.27) — гликолитический фермент, обратимо катализирующий окисление L-лактата в пирувиноградную кислоту. Для лактатдегидрогеназы в качестве промежуточного акцептора водорода требуется НАД.

Реакция, катализируемая лактатдегидрогеназой, может быть представлена в следующем виде:



Фермент широко распространен в организме человека. По степени убывания активности энзима органы и ткани могут быть расположены в следующем порядке: почки, сердце, скелетные мышцы, поджелудочная железа, селезенка, печень, легкие, сыворотка крови. В последней обнаружено несколько различных белков (изоэнзимов), обладающих каталитическими свойствами этого фермента. Изменения в строении белковой части изоферментов обуславливают их различные физико-химические свойства (в частности, неодинаковую электрофоретическую подвижность разновидностей этого фермента в агаровом, крахмальном, полиакриламидном и других гелях). В сыворотке крови выявлено пять изоэнзимов лактатдегидрогеназы — ЛДГ<sub>1</sub>, ЛДГ<sub>2</sub>, ЛДГ<sub>3</sub>, ЛДГ<sub>4</sub>, ЛДГ<sub>5</sub>, располагающихся в геле в порядке убывания их электрофоретической подвижности. Установлено, что фракция ЛДГ<sub>1</sub> происходит в основном из ткани сердца, ЛДГ<sub>5</sub> — из печени. В отличие от последней ЛДГ<sub>1</sub> обладает устойчивостью к действию мочевины.

Лактатдегидрогеназа содержится не только в сыворотке, но и в значительном количестве в эритроцитах; поэтому сыворотка, используемая для анализа, должна быть свежей, лишенной следов гемолиза.

Существуют следующие методы определения активности лактатдегидрогеназы в сыворотке крови:

1. Спектрофотометрические, основанные на различии спектров поглощения окисленной и восстановленной форм НАД (оптический тест Варбурга).

2. Колориметрические: а) динитрофенилгидразиновые методы, базирующиеся на исследовании пировиноградной кислоты с помощью 2,4-динитрофенилгидразина, б) редоксиндикаторные методы, основанные на превращении бесцветной, окисленной формы тетразолиевых солей в окрашенную, редуцированную форму за счет окисления восстановленного молочного кислотой НАД·Н<sub>2</sub>.

Спектрофотометрические методы связаны с применением дефицитных реактивов и с измерением результатов исследования на спектрофотометре; поэтому, несмотря на свою точность, они не могут быть рекомендованы для клинико-диагностических лабораторий.

Более удобны для практического использования колориметрические методы. Из них самым простым, чувствительным и требующим наименьшего расхода дефицитных реактивов является динитрофенилгидразиновый метод Нательсопа, состоящий в определении непрореагировавшей пировиноградной кислоты с помощью 2,4-динитрофенилгидразина. К сожалению, из-за трудности получения стабильных растворов пировиноградной кислоты способ Нательсопа не может быть рекомендован как унифицированный.

Из колориметрических наиболее точным является метод Севела и Товарека, основанный на окислении лактата в пируват в присутствии лактатдегидрогеназы и НАД. Поэтому он и предлагается как унифицированный для исследования активности лактатдегидрогеназы в сыворотке крови.

Редоксиндикаторные методы точны и технически просты, но требуют большого количества редко используемых реактивов. Фирма «Лахема» (ЧССР) поставляет в нашу страну диагностические наборы реактивов для определения общей активности ЛДГ и ее мочевиностабильной фракции редоксиндикаторным способом. Метод базируется на восстановлении (с помощью НАД·Н<sub>2</sub> и переносчика N-метилфеназопийметилсульфата) йоднитротетразолия фиолетового в красный формазан.

**Колориметрический динитрофенилгидразиновый метод исследования активности лактатдегидрогеназы в сыворотке крови (по Севелу и Товареку)**

**Принцип.** L-лактат в щелочной среде в присутствии лактатдегидрогеназы сыворотки и добавленного НАД окисляется в пируват. По степени его образования и судят об активности фермента.

**Реактивы.** 1. 0,45 моль/л раствора молочнокислого натрия. В мерную колбу емкостью 100 мл вносят 5 мл молочной кислоты концентрации 80 г/100 мл или 10 мл молочной кислоты концентрации 10 г/100 мл и нейтрализуют ее 2 н раствором едкого натра до сла-

бошелошной реакции (рН 7,5) по фенолфталеину (слабо-розовая окраска). Объем доводят дистиллированной водой до 100 мл.

2. 0,03 моль/л раствора пиродосфорнокислого натрия, рН 8,8. 6,69 г  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$  растворяют в 50 мл воды, устанавливают рН 8,8 с помощью 1 н раствора соляной кислоты и доливают объем до 500 мл дистиллированной водой. Реактив стабилен в течение месяца при хранении в холодильнике.

3. Раствор НАД. 3 мг НАД (х. ч.) смешивают с 1 мл дистиллированной воды (из расчета 0,6 мг на пробу). Реактив стабилен четыре недели при хранении в холодильнике.

4. Раствор 2,4-динитрофенилгидразина. 19,8 мг 2,4-динитрофенилгидразина растворяют в небольшом количестве 1 н раствора соляной кислоты при нагревании смеси на водяной бане. После охлаждения доводят ее объем 1 н раствором соляной кислоты до 100 мл. На следующий день реактив фильтруют. Раствор хранят в посуде из темного стекла, он годен к употреблению в течение года.

5. 0,4 н раствор едкого натра.

6. 1 н раствор соляной кислоты.

7. Стандартный раствор пировинограднокислого натрия. 11 мг кристаллического пировинограднокислого натрия растворяют в небольшом количестве дистиллированной воды, переносят в мерную колбу емкостью 100 мл и доливают объем раствора до метки дистиллированной водой.

1 мл раствора содержит 110 мкг пирувата натрия, что соответствует 88 мкг пировиноградной кислоты.

Рабочий стандартный раствор готовят разведением основного в 10 раз дистиллированной водой. В 1 мл рабочего раствора 8,8 мкг пировиноградной кислоты.

Ход определения. 0,1 мл сыворотки, разведенной 1 : 2, смешивают с 0,3 мл раствора НАД и прогревают 5 мин при  $+37^\circ\text{C}$ . Затем добавляют 0,8 мл раствора пиродосфорнокислого натрия и 0,2 мл раствора молочнокислого натрия, предварительно прогретых при  $+37^\circ\text{C}$ . Смесь инкубируют при  $+37^\circ$  в течение 15 мин. Тотчас же после инкубации в пробу доливают 0,5 мл раствора 2,4-динитрофенилгидразина и выдерживают ее 20 мин при комнатной температуре. Затем вносят 5 мл раствора едкого натра, содержимое пробирки перемешивают и через 10 мин измеряют экстинкцию пробы на ФЭКе с зеленым светофильтром в кювете с толщиной слоя 10 мм (длина волны 500—560 нм). Регистрируют показания оптической плотности исследуемой пробы, учитывая экстинкцию контрольной.

Контрольную пробу ставят так же, как опытную, но разведенную 1 : 2 сыворотку добавляют после инкубации смеси.

Рассчитывают активность фермента по калибровочному графику. Активность лактатдегидрогеназы выражают в мкмоль пировиноградной кислоты, образовавшейся при инкубации 1 мл сыворотки в течение 1 ч при  $+37^\circ\text{C}$ .

Чтобы получить данные для построения калибровочного графика, необходимо сделать следующее. Из рабочего стандартного раствора пировинограднокислого натрия готовят ряд разведений (табл. 19). Затем в пробирки приливают по 0,5 мл раствора 2,4-динитрофенилгидразина. Далее стандартные пробы обрабатывают так же, как опытные.

Контрольную пробу проводят так же, как стандартную, но вместо стандартного раствора добавляют дистиллированную воду.



Табл. 19. Данные к построению калибровочного графика для определения активности лактатдегидрогеназы в сыворотке крови

Рабочий стандартный раствор пирувата Na (мл)	Раствор пироглутаронного натрия (мл)	Дистиллированная вода (мл)	Содержание пировиноградной кислоты в стандартной пробе		Активность пировиноградной кислоты на 1 л сыворотки за 1 ч инкубации (ммоль)
			мкг	ммоль	
0,1	0,8	0,5	0,88	0,01	1,2
0,2	0,8	0,4	1,76	0,02	2,4
0,4	0,8	0,2	3,52	0,04	4,8
0,6	0,8	—	5,28	0,06	7,2
0,8	0,6	—	7,04	0,08	9,6

Пересчет активности лактатдегидрогеназы в ммоль пировиноградной кислоты на 1 л сыворотки за 1 ч инкубации при + 37°C производят по формулам 1 или 2.

Активность лактатдегидрогеназы в ммоль / (ч · л) =  $C_1 \cdot 120$  (1), где  $C_1$  — количество ммоль пировиноградной кислоты в стандартной пробе; 120 — коэффициент пересчета ммоль пировиноградной кислоты в ммоль на 1 л сыворотки крови и время инкубации 1 ч.

Для выражения активности фермента в единицах новой размерности можно применять и другую формулу:

Активность лактатдегидрогеназы в ммоль / (ч · л) =  $(C_2 \cdot 120) / 88$  (2),

где  $C_2$  — количество мкг пировиноградной кислоты в пробе; 120 — коэффициент пересчета мкг пировиноградной кислоты в мг на 1 л сыворотки и время инкубации 1 ч; 88 — масса 1 ммоль пировиноградной кислоты в мг.

При построении калибровочного графика на оси абсцисс откладывают значения активности фермента, выраженные в размерности ммоль / (ч · л) и представленные в последней графе табл. 19.

Прямолинейная зависимость между концентрацией пировиноградной кислоты и оптической плотностью сохраняется от 0 до 10 ммоль / (ч · л).

Нормальные величины активности общей ЛДГ в сыворотке крови — от 0,8 до 4 ммоль пировиноградной кислоты на 1 л сыворотки за 1 ч инкубации при +37°C.

Примечания: 1. Сыворотка крови не должна быть гемолизирована.  
2. Для исследования лучше использовать свежую сыворотку.  
3. Щавелевоуксусную плазму употреблять не рекомендуется, так как щавелевой кислоты ингибируют фермент.

Пользуясь данным методом, можно исследовать и мочевиностабильную фракцию ЛДГ.

Принцип метода основывается на свойстве мочевины почти на 100% ингибировать активность ЛДГ<sub>5</sub>. При параллельном определении активности общей ЛДГ рассчитывают процент содержания стабильной к мочедине фракции.

**Реактивы.** Те же, что и в предыдущем методе. Дополнительно используют раствор мочевины на 0,03 моль/л раствора пирофосфорнокислого натрия (растворяют 14,4 г мочевины в 100 мл пирофосфорнокислого натрия, рН 8,8).

**Ход определения** активности общей и мочевиностабильной фракции ЛДГ отличается такими особенностями:

1. В методике исследования активности мочевиностабильной фракции ЛДГ применяют раствор пирофосфата натрия, содержащий мочевины.

2. Первый этап этого метода состоит в следующем. 0,1 мл сыворотки, разведенной 1 : 2, тщательно смешивают с 0,08 мл раствора пирофосфорнокислого натрия, содержащего мочевины, и с 0,3 мл раствора НАД. Препарацию проводят в течение 1 ч при +25 °С, закрыв пробирку крышкой. Затем в пробирку добавляют 0,2 мл раствора молочной кислоты и инкубируют смесь 15 мин при +37 °С.

3. В методике определения активности общей ЛДГ исключают этап предварительного прогревания раствора при температуре +37 °С и после сливания реактивов комнатной температуры сразу же приступают к инкубации смеси в течение 15 мин при температуре +37 °С.

В остальном оба метода не отличаются от описанного выше.

Расчет сводится к установлению процентного содержания мочевиностабильной ЛДГ по отношению к общей.

По литературным данным, в норме мочевиностабильная ЛДГ составляет 25—36 % от общей ЛДГ.

**Примечания:** те же, что и к методике определения активности общей ЛДГ. Кроме того, следует отметить, что: 1) для получения точных результатов нужно строго воспроизводить указанные условия инaktivации изоэнзима ЛДГ мочевиной (концентрация растворов, температура, время инкубации); 2) процент мочевиностабильной фракции ЛДГ от общей активности фермента в норме следует проверять на донорах в каждой лаборатории; 3) при установлении активности лактатдегидрогеназы с использованием диагностических наборов реактивов фирмы «Ляхема» (ЧССР) для выражения результатов исследования в соответствии с современной системой унификации нужно пользоваться формулой:

$$\frac{A_1 - A_2}{A_4 - A_5} \cdot Q \cdot 60 = a \text{ мкмоль/(ч} \cdot \text{л)},$$

где Q — активность, указанная на этикетке лиофилизированного эталона; 60 — фактор перевода размерности результатов из Е/л в мкмоль/(ч · л); A<sub>1</sub>—A<sub>5</sub> — приведенные в инструкции обозначения проб.

#### Методика разделения изоферментов лактатдегидрогеназы в полиакриламидном геле

Dietz и Lubrano (1967), используя предложенную Ornstein и Davis (1964) методику диск-электрофоретического фракционирования белков сыворотки крови, предложили способ разделения изоферментов ЛДГ в столбиках полиакриламидного геля. Д. П. Панавене (1974) и другие авторы внесли некоторые изменения в способ Dietz и Lubrano, позволяющие осуществлять более четкое выявление фракций лактатдегидрогеназы за короткий промежуток времени.

В качестве разделяющего ингредиента применяют полиакриламидный (с концентрацией 5,5 г акриламида/100 мл) гель (схема его приготовления дана в подразделе «Методика диск-электрофорес-

тического фракционирования белков сыворотки крови» — Реактивы). Следует отметить, что для получения хорошего качества электрофореза изоэлектрических гели необходимо готовить плотными, не содержащими пузырьков воздуха; их столбики не должны отслаиваться от внутренней поверхности стеклянных трубочек. Д. П. Панавене рекомендует после окончания полимеризации прикоснуться к поверхности полиакриламида ровным краем трубочки, скрученной из фильтровальной бумаги: если полиакриламид пристает и тянется нитями вслед за фильтровальной бумагой, такая колонка непригодна для проведения электрофореза. При осуществлении электрофореза на некачественных колонках для поддержания силы тока 2,5 мА на колонку необходимо увеличить подаваемое на камеру напряжение. Причинами неудовлетворительной полимеризации геля, как указывалось, могут быть плохо обезжиренная поверхность стеклянных трубок, несоответствие рН раствора значению, указанному в методике, неосторожное насаивание воды на поверхность геля.

В силу того что методика, предложенная Dietz и Lubrano в 1967 г., не всегда обеспечивает разделения пяти изоферментов, некоторыми исследователями были внесены в оригинальный метод определенные изменения. Нами успешно применяется хорошо себя зарекомендовавшая модификация способа диск-электрофоретического фракционирования изоэлектрических ЛДГ.

**Принцип.** Метод основан на выявлении фракций лактатдегидрогеназы специальными красителями после проведения элизи-электрофореза в столбиках полиакриламидного геля.

**Реактивы.** I. Приготовление реагентов для формирования ПААГ см. в подразделе «Методика диск-электрофоретического фракционирования белков сыворотки крови» — Реактивы.

II. Реагенты для выявления изоэлектрических ЛДГ в ПААГ.  
1. 1 моль/л раствора лактата лития. Растворяют 288 мг (384,0 мг, 480 мг) лактата лития в 3,0 мл (4,0 мл, 5,0 мл) воды или фосфатного буфера (рН 7,4).

При отсутствии лактата лития можно воспользоваться раствором лактата натрия. К 0,42 мл коммерческого раствора лактата натрия прибавляют 4,58 мл дистиллированной воды. Предпочтительнее для этих целей лактат лития.

2. НАД. Растворяют 10 мг реактива в 1,0 мл воды или лучше 20 мг реактива в 1,0 мл воды.

3. p-Нитротетразоловый синий (ПТС). 1 мг/1 мл воды или фосфатного буфера.

4. Фепазинметасульфат (ФМС) — 1 мг/1 мл воды.

5. 0,1 моль/л раствора NaCl.

6. 0,005 моль/л раствора MgCl<sub>2</sub>.

7. 0,5 моль/л фосфатного буфера, рН 7,4.

**Примечания:** 1. Растворы персульфата аммония (компонент геля), лактата натрия, ПТС и ФМС желательно готовить в день проведения электрофореза. Есть указание (Д. П. Панавене, 1974), что при температуре +5 °С и в темноте все растворы (за исключением НАД) сохраняются долгое время. Раствор НАД всегда готовят перед опытом.

2. Раствор сахарозы (40 г сахарозы добавляют к 60 мл воды) следует хранить в холодильнике.

**Ход определения.** На столбик полиакриламидного геля наносят сыворотку (несколько лучшие результаты получаются именно с сывороткой, а не плазмой крови), разведенную раствором сахарозы в

отношении 1:2 (на 1 часть сыворотки — 2 части раствора сахаразы, 40 г/100 мл). Количество сыворотки может варьировать в пределах от 0,01 мл до 0,075 мл (его подбирают опытным путем). В наших условиях потребовалось 0,06—0,07 мл сыворотки. На слой исследуемого материала приливают электродный буфер (по мнению Dietz и Lubrano, обязательным условием разделения ЛДГ на пять фракций является насаивание полиакриламидной «крыши», формируемой из акриламида концентрации 5,5 г/100 мл). После помещения колонок в электрофоретическую камеру нижний и верхний ее резервуары заполняют разведенным (1:10) электродным буфером (рН 8,3). Wilkinson, 1965; Д. П. Панавене, 1974, повысив значение рН до 8,6—8,7, добились тем самым увеличения расстояния между стартовой зоной и ЛДГ, что в последующем облегчило и улучшило денситометрическую запись выделенных фракций.

После разделения изоэнзимов ЛДГ на фракции (для этого требуется около 90 мин при силе тока 25 мА на колонку) извлеченные из стеклянных колонок столбики полиакриламидного геля обрабатывают в инкубационной среде (красящей смеси).

Красящую смесь из исходных реактивов готовят по следующей схеме (табл. 20).

Табл. 20. Схема приготовления инкубационной (красящей) смеси из исходных реактивов

Исходные растворы реактивов (мл)	Количество трубочек (колонок)		
	6	8—9	12
1. Лактат лития	4,0	6,0	8,0
2. НАД	2,0	3,0	4,0
3. NaCl	4,0	6,0	8,0
4. MgCl <sub>2</sub>	4,0	6,0	8,0
5. Фосфатный буфер	5,0	7,5	10,0
6. НТС	10,0	15,0	20,0
<i>Выдерживание смеси в течение 15 мин при +37 °С</i>			
7. ФМС	1,0	1,5	2,0
Общее количество	30,0	45,0	60,0

Каждый столбик полиакриламидного геля помещают в отдельную пробирку, заливают инкубационной средой и ставят в термостат при +37 °С на 1,0—1,5 ч.

По истечении срока инкубации столбики геля обмывают водой и переносят в пробирки, содержащие раствор уксусной кислоты (7,5 г/100 мл). При температуре 5 °С и в темноте диск-электрофограммы изоэнзимов ЛДГ могут сохраняться (до записи электрофограмм) не более 7 дней.

Гелеграммы записывают на микроденситометре в проходящем свете либо исследуют спектрофотометрически (И. С. Колчанова, А. П. Щербакова, 1977). Денситограммы подвергают количественной

обработке методом планиметрии, взвешиванием вырезанных пиков, по соответствующим формулам и т. д. (см. подраздел «Методика диск-электрофоретического фракционирования белков сыворотки крови» — Количественный учет результатов).

Отдельные изоферменты ЛДГ можно также элюировать в погретый до  $+80-85^{\circ}$  раствор диметилформамида (10 г/100 мл) с последующей колориметрией. Относительную активность изоферментов выражают в процентах от суммы, полученной после сложения площади экстинкций всех изоферментов ЛДГ. При записи диск-электрофореграмм изоферментов лактатдегидрогеназы сыворотки крови практически здоровых людей на денситометрах БИАН-170, ER1-65 наиболее выраженными оказываются фракции ЛДГ<sub>1</sub>, ЛДГ<sub>2</sub>, ЛДГ<sub>3</sub>. Это свидетельствует о том, что в норме общая активность лактатдегидрогеназы в основном обусловливается этими фракциями.

Результаты выражают либо в относительных, либо в абсолютных единицах (например, мкмоль НАД · Н<sub>2</sub> в 1 мин на 1 мг белка).

$$\text{Активность изофермента} = \frac{\text{Опт. плотн. изоферм.} \cdot \text{Общ. активн. ЛДГ}}{\text{Сумма опт. плотн. изоферм.}}$$

В норме имеет место следующее распределение изоэнзимов ЛДГ плазмы крови (Л. В. Джикия, 1973): ЛДГ-1 ( $31,3 \pm 1,7$ ), ЛДГ-2 ( $46,5 \pm 2,2$ ), ЛДГ-3 ( $11,3 \pm 1,2$ ), ЛДГ-4 ( $4,6 \pm 0,4$ ), ЛДГ-5 ( $4,1 \pm 0,2$ ) относит. %.

*Примечание.* В эритроцитах здоровых людей методом диск-электрофореза в полиакриламидном геле выявляют пять обычных фракций ЛДГ и дополнительную во 2-й зоне (ЛДГ-2') (И. Н. Броновец, С. В. Вестужева, 1978). В норме имеется следующее распределение изоферментов (относит. %): ЛДГ-1 ( $26,63 \pm 0,70$ ); ЛДГ-2 ( $33,82 \pm 0,76$ ); ЛДГ-2' ( $11,60 \pm 0,33$ ); ЛДГ-3 ( $23,12 \pm 0,44$ ); ЛДГ-4 ( $4,03 \pm 0,22$ ); ЛДГ-5 ( $0,30 \pm 0,66$ ). При заболеваниях печени или вовлечении ее в патологический процесс увеличивается содержание фракций ЛДГ-4 и ЛДГ-5 лактатдегидрогеназы эритроцитов.

### *Клинико-диагностическое значение определения общей активности ЛДГ и ее изоферментов*

Как уже отмечалось, из-за лизиса эритроцитов в процессе свертывания крови активность лактатдегидрогеназы у практически здоровых людей более высока в сыворотке, чем в плазме крови. Однако при некоторых формах патологии, например остром инфаркте миокарда, это различие стирается, что, по всей вероятности, можно объяснить изменением изоферментного состава плазмы при заболеваниях.

Активность лактатдегидрогеназы в сыворотке крови возрастает у больных с повреждением миокарда, лейкозами, почечными заболеваниями, гемолитической, серповидноклеточной анемиями, тромбоцитопениями, инфекционными мононуклеозами, а также прогрессирующей мышечной дистрофией.

Все заболевания, протекающие с некрозом тканей (инфаркт миокарда, некротическое поражение почек, гепатит, панкреатит, опухоль), как правило, сопровождаются резким повышением активности ЛДГ в сыворотке крови.

При остром гепатите активность лактатдегидрогеназы в сыворотке крови увеличена в первые недели желтушного периода, при

легкой и среднетяжелой формах заболевания рассматриваемый показатель возвращается к нормальному уровню довольно быстро. При заболеваниях печени процент мочевиностабильной фракции ЛДГ падает (<20).

Вместе с тем при инфекционном гепатите относительная активность изоферментов ЛДГ<sub>4</sub> и ЛДГ<sub>5</sub> в первые 10 дней повышена у всех больных. Причем степень повышения не зависит от тяжести заболевания. У 34 % больных увеличение относительной активности ЛДГ<sub>4</sub> и ЛДГ<sub>5</sub> было единственным показателем, свидетельствующим о незаконченном восстановительном процессе в печени после клинического выздоровления.

По данным Нательсона, у больных инфарктом миокарда повышение активности фермента в сыворотке крови отмечается через 8—10 ч после начала приступа, достигая максимума через 24—28 ч. Активность остается увеличенной на протяжении первой недели заболевания. К 8—9-му дню рассматриваемый показатель нормализуется. Подчеркивается, что активность сывороточной лактатдегидрогеназы у больных с инфарктом миокарда сохраняется повышенной вдвое дольше, чем активность других ферментов. Ценность определения данного фермента особенно велика в неясных случаях заболевания, при нетипичной клинической и электрокардиографической картине. У больных со стенокардией активность лактатдегидрогеназы в сыворотке крови не увеличивается.

Исследования активности общей ЛДГ имеет не только диагностическое, но и прогностическое значение. При мелкоочаговом инфаркте миокарда сдвиг активности ЛДГ умеренный. При высоком уровне ЛДГ надо опасаться неблагоприятного исхода заболевания, ибо это свидетельствует о наличии обширного, нередко трансмурального инфаркта миокарда. Нормализация общей ЛДГ далеко не всегда сопровождается снижением уровня ЛДГ<sub>1</sub> (или мочевиностабильной фракции ЛДГ). Иногда наблюдается уменьшение ЛДГ до нормальных величин, в то время как снижение уровня ЛДГ<sub>1</sub> может затягиваться до трех недель и, по-видимому, отражает замедление процесса репарации.

Привлекает внимание работа чешских исследователей Плисека с соавт. (1979), которые, задавшись целью установить корреляцию между размерами инфаркта миокарда и показателями активности аминотрансфераз, креатинфосфокиназы, лактатдегидрогеназы и других лабораторных тестов, установили, что наибольшее диагностическое значение имеет определение активности лактатдегидрогеназы. В этом случае найдена достоверная статистическая связь между размером очага омертвения в миокарде и величиной активности лактатдегидрогеназы.

Инфаркт миокарда сопровождается возрастанием (>40 %) мочевиностабильной фракции ЛДГ. Повышение содержания этой фракции ЛДГ указывает на наличие острого инфаркта задолго до электрокардиографического подтверждения. Увеличение ее содержания наблюдается еще у больного в предынфарктном состоянии. Изменяемая уже в первые дни развития инфаркта величина отношения изоферментов ЛДГ<sub>1</sub>/ЛДГ<sub>2</sub> достигает обычно нормальных значений на 31—34-й день болезни, иногда нормализация этого коэффициента затягивается и на более долгий период времени.

Небезынтересно, что осложнения инфаркта миокарда сопровождаются дополнительным повышением активности ферментов.

Развитие сердечной недостаточности с преобладанием недостаточности кровообращения по малому кругу вызывает увеличение специфичной для легочной фракции ЛДГ<sub>3</sub>. Застой крови преимущественно в большом круге кровообращения приводит к повышению содержания фракций ЛДГ<sub>4</sub> и ЛДГ<sub>5</sub>.

Осложнение инфаркта миокарда тромбозом легочной артерии протекает со значительным увеличением фракции ЛДГ<sub>3</sub>. Кстати, возрастание уровня этой фракции отмечается и при почечных заболеваниях.

## ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ ХОЛИНЭСТЕРАЗ

В крови человека содержится два вида холинэстераз: ацетилхолинэстераза (ацетилгидролаза ацетилхолина; КФ 3.1.1.7), локализуемая в эритроцитах, и холинэстераза (ацилгидролаза ацилхолинов; КФ 3.1.1.8), находящаяся в сыворотке крови. Оба фермента расщепляют эфиры холина на холин и соответствующую кислоту и отличаются своей специфичностью. Так, ацетилхолинэстераза гидролизует только ацетилхолин, за что этот фермент раньше называли специфической, или истинной, холинэстеразой. Холинэстераза же способна расщеплять наряду с ацетилхолином и бутирилхолин (причем в 2 раза быстрее, чем ацетилхолин). Поэтому она еще известна как бутирилхолинэстераза, или ложная сывороточная холинэстераза. Последняя синтезируется в печени, в связи с чем степень активности холинэстеразы крови служит тестом, отражающим функциональное состояние печени. Исследование активности истинной холинэстеразы в нервной и других тканях организма может дать определенное представление о функциональном состоянии холинэргического звена вегетативной и соматической нервной системы.

Фермент относительно стабилен. Сыворотка, разведенная физиологическим раствором, и гемолизированные эритроциты могут храниться около четырех дней при температуре +2—6 °С без заметной потери активности энзима.

Существующие методы установления активности холинэстераз делятся на следующие группы: 1) биологические — неразрушенным и подвергшимся предварительной обработке исследуемой сывороткой ацетилхолином воздействуют на мышцу животного. По разнице в степени реакции мышцы судят о количестве ацетилхолина, разрушенного холинэстеразой;

2) химические и биохимические; они основываются на: а) точном измерении количества уксусной кислоты, образовавшейся за известный промежуток времени при разложении холинэстера под влиянием холинэстеразы;

б) установлении количества разложившегося ацетилхолина за определенный промежуток времени, что устанавливают с помощью различного рода колориметрических методик;

в) реакции со специфическими субстратами, при гидролизе которых образуются вещества, определяемые колориметрически;

г) спектрофотометрическом исследовании в ультрафиолетовой части спектра количества гидролизованного бензоилхолина.

Бензоилхолин имеет максимум поглощения в области 240 нм, а продукты его расщепления ультрафиолетовые лучи свободно пропускают. Следовательно, по степени уменьшения абсорбции света можно судить об активности холинэстеразы.



В качестве унифицированных предлагается колориметрический метод, основанный на измерении количества уксусной кислоты (она образуется при ферментативном расщеплении ацетилхолина), и исследование активности холинэстеразы в сыворотке крови экспресс-методом с применением индикаторной бумаги.

#### Определение активности сывороточной холинэстеразы колориметрическим методом

**Принцип.** Под действием холинэстеразы происходит гидролиз ацетилхолинхлорида с выделением уксусной кислоты и холина. Уксусная кислота подкисляет реакционную среду, что устанавливают с помощью индикатора по изменению цвета буферного раствора.

**Реактивы.** 1. 0,9 моль/л раствора ацетилхолинхлорида. 1,67 г ацетилхолинхлорида растворяют в 10 мл воды. Реактив хранят в холодильнике. Он годен в течение 6—7 дней (из-за гигроскопичности этого вещества открытую ампулу с ацетилхолинхлоридом держат в эксикаторе).

2. Вероналовый буфер, рН 8,4. 1,545 г натриевой соли веронала (мединала) растворяют в 500 мл дистиллированной воды, добавляют 9,0 мл 0,1 н соляной кислоты и 150 мл раствора индикатора. Объем доводят дистиллированной водой до 1 л. Буфер хранят в холодильнике в защищенном от света месте. Он годен один месяц.

3. Индикатор феноловый красный. Зона перемены окраски индикатора (от желтой к красной) лежит в пределах рН 6,8—8,4. 0,1 г сухого индикатора растирают в ступке с 5,7 мл 0,05 н раствора едкого натра и после растворения смеси объем доливают дистиллированной водой до 25 мл. Из полученного основного раствора (0,4 г/100 мл) готовят его разведение (0,01 г/100 мл) путем разбавления основного раствора дистиллированной водой в 40 раз.

4. Водный раствор прозерина — 0,7 г/100 мл.

5. 0,1 н раствор уксусной кислоты. Готовят из фпксанала или при его отсутствии путем растворения 3 г (2,84 мл) ледяной уксусной кислоты в 500 мл дистиллированной воды.

**Ход определения.** В пробирку вносят 5,0 мл вероналового буфера, 0,2 мл дистиллированной воды и 0,1 мл сыворотки. Смесь прогревают при +37 °С в течение 5 мин. Затем к ней добавляют 0,2 мл раствора ацетилхолинхлорида и инкубируют 30 мин при +37 °С. После инкубации доливают в пробирку 0,2 мл раствора прозерина. Экстинкцию измеряют на ФЭКе с зеленым светофильтром (длина волны 500—560 нм) в кювете с толщиной слоя 5 мм. Колориметрирование проводят в пределах одного часа.

Контрольную пробу ставят так же, как опытную, но раствор прозерина доливают в пробирку вместе с ацетилхолинхлоридом. Из показателей экстинкции контрольной пробы вычитают данные экстинкции опытной. Рассчитывают активность холинэстеразы по калибровочному графику в ммоль уксусной кислоты на 1 л сыворотки за 1 ч инкубации.

С целью получения данных для построения калибровочного графика необходимо сделать следующее. Из 0,1 н раствора уксусной кислоты готовят разведения (табл. 21). Из каждого раствора отбирают по 0,2 мл, смешивают это количество с 5,0 мл буфера, 0,1 мл сыворотки, прогревают смесь 5 мин при +37 °С, затем добавляют в нее 0,2 мл прозерина, 0,2 мл ацетилхолинхлорида, инкубируют ее

в течение 30 мин при  $+37^{\circ}\text{C}$  и быстро охлаждают. Измеряют экстинкцию этих стандартных проб при колориметрировании опытных проб. Контрольные пробы ставят так же, как опытные, но вместо стандартных растворов используют дистиллированную воду. Из данных экстинкции контрольной пробы вычитают величину экстинкции стандартной. Полученную разницу откладывают на оси ординат, количество ммоль уксусной кислоты в пересчете на 1 л сыворотки и время инкубации в течение 1 ч при  $+37^{\circ}\text{C}$  (ммоль/(ч·л) — на оси абсцисс.

Норма — 160—340 ммоль/(ч·л).

Табл. 21. Разведения 0,1 и раствора уксусной кислоты для построения калибровочного графика

№ пробирок	0,1 и раствор уксусной кислоты (мл)	Дистиллированная вода (мл)	$\text{CH}_3\text{COOH}$ в стандартной пробе (мкмоль)	$\text{CH}_3\text{COOH}$ в пересчете на 1 л сыворотки и 1 ч инкубации при $+37^{\circ}\text{C}$ (ммоль)
1	2,0	8,0	4	80
2	4,0	6,0	8	160
3	6,0	4,0	12	240
4	8,0	2,0	16	320
5	9,0	1,0	18	360

**Определение активности холинэстеразы в сыворотке крови экспресс-методом с применением индикаторной бумаги**

Холинэстеразная индикаторная бумага представляет собой полосу хроматографической бумаги размером  $65 \times 10$  мм с линией перфорации, отделяющей конец индикаторной бумаги, пропитанный ацетилхолином и индикатором, меняющим цвет в зависимости от pH среды. После контакта исследуемой сыворотки с индикаторной бумагой под влиянием холинэстеразы наступает гидролиз ацетилхолина и освобождается уксусная кислота, которая изменяет pH и цвет индикатора. Реакция должна длиться до тех пор, пока pH достигнет определенного уровня, а соответствующий этому цвет индикаторной бумаги не сравняется с цветом эталона.

Мерой активности холинэстеразы является время (мин), на протяжении которого под влиянием исследуемой сыворотки произойдет изменение цвета индикаторной бумаги вплоть до совпадения с цветом эталона.

**Ход определения.** Микропипеткой наносят 0,05 мл сыворотки крови на поверхность чистого предметного стекла (оно должно лежать на белой бумаге для создания фона).

На каплю сыворотки помещают пропитанный реагентами конец индикаторной бумаги таким образом, чтобы сыворотка распространилась до линии перфорации. Затем быстро накладывают второе предметное стекло, слегка прижимая его с целью более равномерного распределения сыворотки в полоске индикаторной бумаги.

Верхнее стекло не следует снимать, чтобы не вызвать высыхания бумаги. Рядом должен находиться эталон, представляющий собой полоску бумаги желто-зеленого цвета.

Исследование проводят при комнатной температуре (+18—22 °С).

Индикаторная бумага в сухом виде имеет желтый цвет. После контакта с сывороткой цвет ее становится темно-зеленым или синезеленым, на протяжении реакции он меняется в пределах различных оттенков зеленого цвета и в конце определения сравнивается с желто-зеленым цветом бумаги-эталона.

Отсчет времени ведут с момента контакта индикаторной бумаги с сывороткой до момента, когда цвет бумаги сравнивается с цветом эталона. Время от 7-й до 21-й мин соответствует нормальной активности холинэстеразы, период, меньший 6 мин,— повышенной активности и время от 21 до 60 и больше мин свидетельствует о резком снижении активности фермента.

Расхождение результатов в параллельных определениях — не больше 1 мин.

### *Клинико-диагностическое значение исследования активности холинэстеразы сыворотки крови*

В связи с тем что синтез холинэстеразы (так же как и альбумина) происходит в печеночных клетках, гипохолинэстераземия, как правило, сопровождается заболеваниями печени. Степень снижения активности фермента в сыворотке крови отражает тяжесть и распространенность поражения печеночных клеток. Весьма низкий уровень холинэстеразной активности отмечается при распространенных злокачественных новообразованиях печени. Однако и острые гепатиты, в том числе и болезнь Боткина, а также хронические заболевания печени характеризуются уменьшением активности фермента. У больных с механической желтухой снижение активности холинэстеразы говорит о вовлечении в процесс паренхимы печени. Закономерным является уменьшение активности сывороточной холинэстеразы при белковой недостаточности, кахектических состояниях и других вследствие нарушения протеосинтетической функции печени. Снижение активности фермента отмечается у больных с инфарктом миокарда, отравлениями фосфорорганическими соединениями, инсектицидами, миорелаксантами и с врожденными метаболическими нарушениями (эссенциальная гипохолинэстераземия, дисхолинэстераземия).

Определение холинэстеразной активности крови имеет большое значение в хирургической клинике при применении миорелаксантов. Резкое снижение активности холинэстеразы в этих условиях может привести к тяжелому холинэргическому шоку.

В некоторых случаях отмечается повышение активности холинэстеразы. К таким патологическим состояниям относятся гипертоническая болезнь, миомы матки, язвенная болезнь, хорея Хаттингтона (табл. 22). При тяжелых нефритах содержание холинэстеразы может возрастать в 3 раза. Ожирение также приводит к повышению уровня холинэстеразы. Увеличение активности сывороточной холинэстеразы может иметь место при нефрозах. Причиной этого является возрастание скорости процессов синтеза белка в печени, связанное со значительными потерями белков плазмы крови с мочой.

**Табл. 22.** Изменение активности холинэстеразы при различных заболеваниях (по данным разных авторов)

Заболевание	Активность холинэстеразы
Эпидемический гепатит	В зависимости от степени повреждения паренхимы печени может снижаться в сильной степени
Застойные явления в печени, холецистит, холангит, желчно-каменная болезнь, холецистопатия	Резко уменьшена (при застойных явлениях). Снижена в зависимости от степени инфекционного или токсического поражения паренхимы печени
Механическая желтуха	Уменьшается только при поражении паренхимы печени
Карцинома различной локализации	Умеренно или резко снижена
Миелома, плазмоцитомы, лимфогранулематоз	Большой частью понижена
Нефротический синдром	Повышена
Экссудативный энтерит	В отдельных случаях повышена
Рахит	Понижена
Травма черепа	Понижена
Недостаточность окологлоточных желез	Понижена
Коллагенозные заболевания	Понижена
Бронхиальная астма	Повышена
Гипертония	Повышена
Миома матки	Повышена
Ревматизм	Понижена

В литературе имеется большое количество исследований уровня холинэстеразы у больных с различными патологическими состояниями.

#### ИССЛЕДОВАНИЕ АКТИВНОСТИ γ-ГЛУТАМИЛТРАНСПЕПТИДАЗЫ

Открытый в 1950 г. Hanes с соавт. (1950) фермент γ-глутамил-транспептидаза (γ-ГТП; КФ 2.3.2.2) катализирует реакцию переноса γ-глутамилового остатка с γ-глутамилового пептида на аминокислоту или реакцию гидролиза γ-глутамилового пептида с образованием свободной γ-глутаминовой кислоты (Hepгу с соавт., 1974).

Донором может быть любой гамма-глутамиловый пептид, акцептором — пептид, аминокислота или даже вода. Наиболее действенным акцептором считается глицилглицин.

$\gamma$ -ГТП содержится почти во всех органах человека. Активность этого фермента в почках, печени, поджелудочной железе, селезенке, мозге составляет соответственно 222,5; 8,65; 18,5; 3,4; 1,1; в сердце, скелетных мышцах, легких, тонких кишках — 0,1, 0,15; 0,7; 2,1 мкмоль расщепленного субстрата на 1 г белка за 1 мин.

Если говорить о биологических жидкостях, то наиболее высокая активность  $\gamma$ -ГТП наблюдается в желчи, моче. В сыворотке крови активность фермента в 4—6 раз ниже, чем в моче. В эритроцитах рассматриваемый фермент отсутствует.

$\gamma$ -ГТП представлена различными изоферментами (методом диск-электрофореза в полиакриламидном геле выявлено пять фракций изоэнзимов  $\gamma$ -ГТП). В зависимости от вида патологии количество изоферментов у больного может быть различным. Фермент содержится в лизосомах, мембранах и цитоплазме клетки.

Методы определения активности  $\gamma$ -ГТП различаются по используемому субстрату. В настоящее время одним из наиболее часто применяемых субстратов является L- $\gamma$ -глутамил-4-нитроанилид.

В качестве унифицированного предлагается метод с использованием субстрата L- $\gamma$ -глутамил-4-нитроанилида и глицилглицилового буфера как точный и доступный для клинико-диагностических лабораторий.

Внедрение унифицированного метода в практику обеспечивается применением диагностических наборов реактивов фирмы «Лахема» (ЧССР).

#### Определение активности $\gamma$ -глутамилтранспептидазы в сыворотке крови

**Принцип.** Под действием  $\gamma$ -ГТП расщепляется хромогенный субстрат  $\gamma$ -глутамил-4-нитроанилид и  $\gamma$ -глутамиловый остаток переносится на акцепторный дипептид глицилглицин, который одновременно служит буфером реакции. Реакция активируется хлористым натрием. Освобожденный 4-нитроанилин определяют фотометрически при 410 нм после остановки ферментативной реакции уксусной кислотой. Интенсивность окрашивания является мерой ферментативной активности.

**Реактивы.** 1. Субстрат. 28 мг L- $\gamma$ -глутамил-4-нитроанилида и 82 мг натрия хлористого в 1 таблетке (4 таблетки).

Раствор субстрата готовят следующим образом. В пробирку наливают 10 мл дистиллированной воды и добавляют 1 таблетку субстрата. Таблетку измельчают стеклянной палочкой, выдерживая пробирку в кипящей водяной бане в течение 60 с. Затем смесь охлаждают до +37 °С и доливают 2,5 мл буферного раствора. Приготовленный реактив во время работы хранят в водяной бане при +37 °С. Непользованный раствор можно держать в холодильнике неделю. При комнатной температуре и на холоде субстрат выпадает в осадок. Поэтому перед употреблением выкристаллизовавшийся субстрат растворяют нагреванием в кипящей водяной бане. Однако это можно повторять не более двух раз.

2. Буферный раствор. 0,55 моль/л глицилглицина с рН 8,3—11 мл.

3. Основной калибровочный раствор 4-нитроанилина (82,9 мг/100 мл) — 10 мл.

4. Раствор уксусной кислоты (не содержится в наборе). Получают его разбавлением 10 мл ледяной уксусной кислоты (ч. д. а., к. ч.) дистиллированной водой до 100 мл.

Ход определения. Для приготовления опытной пробы в пробирку вносят 0,5 мл раствора субстрата и помещают в водяную баню с температурой +37 °С. Затем в смесь приливают 0,05 мл сыворотки крови, содержимое перемешивают и инкубируют точно 15 мин. Приближают 3 мл раствора уксусной кислоты и содержимое пробирки перемешивают.

Контрольную пробу ставят так же, как опытную, но сыворотку доливают после инкубации смеси. Оптическую плотность измеряют на ФЭКе с фиолетовым светофильтром (длина волны 410 нм) в кювете с шириной слоя 10 мм. Результаты сравнивают с аналогичными данными контрольной пробы. Окраска стабильна в течение нескольких часов.

Для получения данных к построению калибровочной кривой из основного калибровочного раствора готовят рабочие (табл. 23). В каждую из 6 пробирок наливают по 0,05 мл рабочих калибровочных растворов (1—6), прибавляют по 3,5 мл раствора уксусной кислоты, содержимое перемешивают и измеряют экстинкцию. Результаты сравнивают с аналогичными данными экстинкции уксусной кислоты. По значениям экстинкций строят калибровочный график.

Табл. 23. Данные к построению калибровочного графика для оценки активности  $\gamma$ -глутамилтранспептидазы

№ пробирок	Калибровочный раствор 4-нитроанилина (мл)	Дистиллированная вода (мл)	Активность $\gamma$ -ГТП	
			мкмоль/(мин·л), (Е/л)	ммоль/(ч·л)
1	0,25	3,75	25	1,5
2	0,50	3,50	50	3,0
3	1,00	3,00	100	6,0
4	1,00	1,00	200	12,0
5	1,50	0,50	300	18,0
6	2,00	—	400	24,0

Рассчитывают активность  $\gamma$ -ГТП по калибровочной кривой, выражают ее в мкмоль 4-нитроанилина, освобожденного 1 л сыворотки в течение 1 мин при +37 °С (Е/л), или в ммоль/(ч·л).

Вместо рекомендованных инструкций к диагностическим наборам реактивов значений активности фермента, данных в Е/л (25; 50; 100; 200; 300; 400), следует использовать соответствующие им показатели в ммоль/(ч·л) (1,5; 3,0; 6,0; 12,0; 18,0; 24,0).

Норма для мужчин — 0,9—6,36 ммоль/(ч·л), или 15—106 Е/л, для женщин — 0,6—3,96 ммоль/(ч·л), или 10—66 Е/л.

Примечания: 1. Если полученная величина активности превышает 18 ммоль/(ч·л), то сыворотку следует развести физиологическим раствором и результаты измерений умножить на коэффициент разведения.

2. Фермент стабилен неделю, если хранить исследуемый материал при температуре +4 °С, и 2—3 дня, если содержать его при комнатной температуре.

*Клинико-диагностическое значение определения активности  $\gamma$ -глутамилтранспептидазы в сыворотке крови*

Несмотря на большое содержание  $\gamma$ -ГТП в почках, определение активности фермента в сыворотке крови проводят преимущественно для диагностики заболеваний печени и желчных путей. При эпидемическом гепатите повышение активности  $\gamma$ -ГТП отмечается примерно в 90 % случаев наряду с аналогичным возрастанием активности щелочной фосфатазы (ЩФ) и лейцинаминопептидазы (ЛАП). Активность  $\gamma$ -ГТП превосходит нормальные показатели у больных обычно в 6 раз, в то время как повышение аспартатамиотрансферазы — в 27, а аланинамиотрансферазы — иногда в 113 раз. Чем тяжелее форма болезни Боткина и чем выше активность трансаминазы, тем ниже активность  $\gamma$ -ГТП. И наоборот, возрастание активности  $\gamma$ -ГТП (так же как ЩФ и ЛАП) начинается с момента падения активности трансаминаз. После выздоровления людей от эпидемического гепатита активность  $\gamma$ -ГТП у них в сыворотке крови находится в пределах нормы.

При хроническом гепатите активность  $\gamma$ -ГТП увеличена в 75 % случаев, чаще, чем показатели какого-либо другого лабораторного теста (ЛАП, флокуляционные пробы, электрофорез протеинов сыворотки крови).

При хроническом холангиогепатите активность энзима обычно превышает верхнюю границу нормы у всех больных.

У больных циррозом печени процент аномальных величин активности  $\gamma$ -ГТП достигает 86. Решающее значение в этом имеет степень декомпенсации функции печени. При компенсированных циррозах активность рассматриваемого показателя почти всегда повышена, в то время как с наступлением декомпенсации активность его снижается (наоборот ведут себя трансаминазы и билирубин). Понижение активности фермента служит наиболее надежным прогностическим признаком декомпенсации.

У всех больных с механической желтухой была найдена увеличенная активность  $\gamma$ -ГТП. Возрастание активности энзима в этих случаях достигает наивысшей степени (в 5—138 раз больше верхней границы нормы). После ликвидации обтурации уровень  $\gamma$ -ГТП входит в норму быстрее, чем показатели остальных ферментов.

Повышение активности  $\gamma$ -ГТП у больных холециститом и холелитиазом с субиктером отмечается в 82 % случаев, у больных с нормобилирубинемией — примерно в 50 %. После удаления у них желчного пузыря уровень  $\gamma$ -ГТП незначительно увеличен (у 30 % больных), это характерно для больных с рецидивирующей желчнокаменной болезнью.

Из изложенного следует, что  $\gamma$ -ГТП — высокочувствительный печеночный тест. С помощью этого показателя, трансаминаз и холинэстеразы можно диагностировать около 95 % всех заболеваний печени.



Таким образом, повышение активности  $\gamma$ -ГТП наблюдается при заболеваниях желчных путей с явлениями обтурации, при гепатитах, опухолях и метастазах в печень, причем активность  $\gamma$ -ГТП в сыворотке крови увеличивается параллельно таковой щелочной фосфатазы, но активность  $\gamma$ -ГТП возрастает раньше, сохраняет повышенные цифры более длительное время; относительное увеличение активности фермента в несколько раз выше, чем щелочной фосфатазы.

В дифференциальной диагностике желтух исследованием  $\gamma$ -ГТП оказывают большую помощь, чем щелочной фосфатазы. Этому особенно способствует индекс АЛТ/ $\gamma$ -ГТП, позволяющий в отличие от индекса АЛТ/ЩФ почти полностью различить обтурационную и вирусную желтухи.

У больных с острыми панкреатитами активность  $\gamma$ -ГТП увеличена в 100 % случаев. Причем превышение, как правило, в 25 раз превосходит норму.

У больных злокачественными опухолями без метастазов в печень лишь в редких случаях было найдено относительно малое возрастание активности  $\gamma$ -ГТП, в основном связанное с имеющимися заболеваниями печени или желчных путей (неопухольного происхождения). У больных с метастазами в печень без желтухи и с желтухой было установлено весьма значительное повышение активности фермента в 100 % случаев.

При инфаркте миокарда в течение первых трех дней после его развития активность  $\gamma$ -ГТП нормальная (кроме случаев, осложненных другими заболеваниями). Начиная с четвертого дня активность фермента слегка повышается (83 %) и достигает максимума через 2—3 недели, потом в большинстве случаев постепенно входит в норму. Возрастание активности фермента находится в соответствии с течением репаративных процессов в печени и миокарде.

При остальных заболеваниях сердечно-сосудистой системы активность  $\gamma$ -ГТП увеличивается в соответствии со степенью декомпенсации сердечной деятельности.

Наркотики, седативные средства, этанол индуцируют активность  $\gamma$ -ГТП в печени. Поэтому  $\gamma$ -ГТП является чувствительным тестом для диагностики алкогольно-токсических заболеваний печени.

Исследование изоферментов  $\gamma$ -ГТП не имеет большого диагностического значения.

У больных с хроническим гломерулонефритом, пиелонефритом, амилоидозом почек в период обострения процесса при достаточной функции почек наблюдается повышение активности  $\gamma$ -ГТП в сыворотке крови. Поэтому определение активности  $\gamma$ -ГТП целесообразно включать в ферментный диагностический спектр при основных формах нефропатии.

Резюмируя все изложенное, можно отметить, что во всех тех случаях, когда имеет место повышение активности  $\gamma$ -ГТП, всегда есть повреждение какого-либо органа. Ход изменений активности фермента при болезни Боткина свидетельствует против предположения, что дистрофия и некроз ткани печени являются причиной повышенной активности  $\gamma$ -ГТП в сыворотке крови. Увеличение секреции фермента в кровь может быть результатом адаптивно увеличенного клеточного синтеза  $\gamma$ -ГТП. Возрастание интенсивности транспептидазных процессов, катализируемых  $\gamma$ -ГТП, играет важную роль в процессе регенерации печени. Ввиду изменения градиента концентрации большее число ферментов переходит в кровь. Снижение ак-

тивности при декомпенсированном циррозе печени связано с изменением структур, синтезирующих  $\gamma$ -ГТП.

При инфаркте миокарда повышенные активности можно приписать, как регенеративным процессам в миокарде, так и общему отклику организма, прежде всего печени, на развивающееся патологическое состояние.

## ИССЛЕДОВАНИЕ АКТИВНОСТИ АРГИНАЗЫ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ

Большинство методов исследования аргиназы (L-аргинин-уреогидролаза, КФ 3.5.3.1) основаны на определении количества образовавшейся мочевины, служащего мерой активности фермента. Эти методы сложны, требуют большего использования субстрата, дефицитных реактивов и аппаратуры, в связи с чем весьма затруднено внедрение указанных методов в широкую практику.

Для определения активности аргиназы в сыворотке крови М. Е. Семендяева и М. М. Гусева использовали метод, который базируется на принципе энзиматического расщепления аргиназой исследуемого субстрата (аргинина). Приводим его описание.

### Метод определения активности аргиназы в сыворотке крови

Принцип метода основан на количественном определении остатка неразрушенного в ходе реакции аргинина.

**Реактивы.** 1. Рабочий раствор солянокислого аргинина, содержащий 250 мкг аргинина в 1 мл (готовят по мере надобности из основного раствора с концентрацией 500 мкг солянокислого аргинина в 1 мл — 50 мг/100 мл, хранящегося при температуре  $+5^{\circ}\text{C}$  не более двух недель).

2. Пирофосфатный буфер 0,1 моль/л, pH 9,5. Можно пользоваться и глициновым буфером, дающим более четкую цветную реакцию.

3. Раствор трихлоруксусной кислоты — 10 г/100 мл.

4. Раствор 8-гидроксихинолина — 0,02 г/100 мл (получают из 0,2 г/100 мл спиртового раствора 8-гидроксихинолина путем разведения его в 10 раз дистиллированной водой).

5. Водный раствор едкого натра — 10 г/100 мл.

6. Щелочной раствор брома (1 г брома помещают в мерный цилиндр, содержащий 50—80 мл раствора едкой щелочи, и доводят этим же раствором щелочи до объема 100 мл, щелочь — 5 г/100 мл).

7. Водный раствор мочевины — 40 г/100 мл.

Все реактивы необходимо хранить в холодильнике.

**Ход определения.** В пробирку наливают 0,6 мл рабочего раствора солянокислого аргинина (150 мкг) и 0,3 мл буфера, после чего пробирку ставят в водяную баню при температуре  $+37^{\circ}\text{C}$ . Спустя 5 мин в нее добавляют 0,1 мл негемолизированной сыворотки, содержащее быстро смешивают и инкубируют точно 10 мин. После инкубации осаждают белки сыворотки крови с помощью 4 мл раствора трихлоруксусной кислоты. Центрифугируют смесь в течение 10—15 мин (при 1500—2000 об/мин). Надосадочную жидкость сливают в чистую пробирку.

В пробирку, содержащую 5 мл опытного раствора, доливают 1 мл раствора 8-гидроксихинолина и 1 мл раствора едкого натра. Содержимое пробирки смешивают и ставят на холод (2 мин), после чего в нее добавляют 0,2 мл раствора брома и не позднее чем через 15 с — 1 мл раствора мочевины. Точно через 60 мин сюда же приливают 5 мл холодной дистиллированной воды.

Колориметрируют смесь на ФЭКе с зеленым светофильтром в течение 5 мин. Одновременно проводят контрольный опыт с использованием всех указанных реагентов, но с доливанием в контрольную пробирку вместо раствора аргинина дистиллированной воды.

Чтобы получить необходимые данные для построения калибровочной кривой, готовить пробы следует с применением раствора солянокислого аргинина из расчета 50 мкг аргинина в 1 мл — 0,25; 50; 75; 100; 125 и 150 мкг.

По калибровочной кривой рассчитывают количество разрушенного субстрата и преобразуют эту величину в размерность мкмоль/(мин·мл). Одну единицу активности фермента соотносят с одним мкмоль расщепленного аргинина при температуре +37 °С за 1 мин под действием аргиназы, содержащейся в 1 мл сыворотки крови.

В соответствии с принятой сейчас системой единиц, результаты определений активности аргиназы в сыворотке крови нужно преобразовывать в ммоль/(ч·л) по формуле:

$$\text{ммоль/(ч·л)} = C_{\text{ед.}} \cdot 60,$$

где  $C_{\text{ед.}}$  — количество мкмоль/(мин·мл); 60 — фактор пересчета.

#### *Клинико-диагностическое значение определения активности аргиназы в сыворотке крови*

По данным М. Е. Семендяевой и М. М. Гусевой, активность аргиназы в сыворотке крови здоровых людей колеблется в пределах от 2,4 до 22,8 ед., составляя в среднем  $12,7 \pm 0,5$  ед., причем рассматриваемый показатель у женщин оказался несколько выше, чем у мужчин. При сопоставлении величины активности аргиназы у больных различных возрастных групп установлены меньшие ее значения у лиц пожилого возраста.

По данным М. М. Гусевой, М. Е. Семендяевой, при острой форме эпидемического гепатита отмечается заметное повышение активности аргиназы сыворотки крови, достигающее 25,2—53,3 ед. Обращает на себя внимание четкое соответствие колебаний активности фермента тяжести процесса.

Период реконвалесценции характеризуется довольно быстрым снижением уровня активности аргиназы, не возвращающимся, однако, к норме при наличии у больного остаточных явлений перенесенного заболевания.

При холестатическом варианте эпидемического гепатита сдвиги активности исследуемого показателя были менее выраженными, и в период реконвалесценции, как правило, уровень активности аргиназы приходил к норме.

Затяжное течение эпидемического гепатита отличалось от гепатита обычного циклического течения волнообразными колебаниями величины активности аргиназы с длительными периодами повышения этого показателя.

У больных с остаточными явлениями перенесенного гепатита ферментативная активность оказывалась в пределах нормы или отмечалась отчетливая положительная ее динамика вплоть до полной нормализации. В то же время при обострениях процесса под влиянием различных неблагоприятных факторов имели место повторные волны гиперферментемии. В случае формирования хронического процесса диагностическая ценность определения аргиназы была относительно низкой, так как в ряде наблюдений активность фермента оставалась в пределах нормы. У больных с хронической формой эпидемического гепатита колебания ферментативной активности также носили менее выраженный характер, чем у больных с острым гепатитом, примерно в половине случаев не выходя за рамки нормальных величин. Как правило, изменения активности аргиназы отмечались у больных с обостренным хроническим гепатитом.

При механической желтухе активность аргиназы в сыворотке крови мало отличалась от таковой при хроническом гепатите. Величина исследуемых сдвигов определялась в основном степенью патологических изменений в печени. И, наконец, в группе больных с заболеваниями, не связанными с патологией печени, активность аргиназы оставалась в пределах нормы.

## ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ СЫВОРОТОЧНОЙ СОРБИТДЕГИДРОГЕНАЗЫ

В 1955 г. Holzer с сотр. описали сорбитдегидрогеназу — СДГ (идитол: НАД — оксидоредуктаза, идитолдегидрогеназа; КФ 1.1.1.14), представляющую собой гликолитический, термолабильный печеночно-специфический, локализующийся в цитоплазме фермент. По данным Sudhof, Hollman с сотр. (1961), при хранении сыворотки крови в холодильнике активность фермента снижается через 6 ч на 20 %, через 24 ч — на 30 % и после 24 ч хранения — более чем на 50 %. Активность СДГ теряется даже при содержании сыворотки в температурой  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Фермент в высокой концентрации имеется в печени, в меньшей концентрации — в простате, селезенке, почках. Большинство авторов указывает, что в сыворотку практически здоровых людей не входит СДГ или в ней наблюдаются лишь ее следы.

### Метод исследования активности сорбитдегидрогеназы в сыворотке крови

**Принцип.** СДГ катализирует обратимое превращение фруктозы в алкогольный сорбит. Участвующий в реакции НАД $\cdot\text{H}_2$  окисляется, что регистрируется падением спектрофотометрической экстинкции.

**Реактивы** 1. 0,1 моль/л буферного раствора триэтаноламингидрохлорида, рН 7,4. Для его приготовления 1,856 г триэтаноламингидрохлорида растворяют в 100 мл дистиллированной воды (навеску доводят до 100 мл водой). К 94,5 мл полученного раствора добавляют 5,5 мл 0,1 н раствора NaOH, значение рН должно быть 7,4 (достигают этого с помощью 0,1 н NaOH). Буфер хранят в холодильнике.

2. Дигидроникотинамидадениндинуклеотид (НАД·Н<sub>2</sub>). 5,85 мг НАД·Н<sub>2</sub> растворяют в 1 мл буферного раствора триэтаноламингидрохлорида. Рекомендуется пользоваться только свежеприготовленным раствором.

3. Раствор фруктозы — 10 г/100 мл.

**Ход определения.** Кровь, взятую у обследуемого из вены пато- щак в количестве не менее 10 мл, оставляют в пробирке при ком- натной температуре в течение 2—3 ч до получения сыворотки. После этого сыворотку отделяют центрифугированием. Анализ проводят как можно быстрее после взятия крови, так как при длительном ее стоянии наступает быстрая потеря сывороточной активности. Затем к 1,5 мл буферного раствора добавляют 1 мл сыворотки и 0,1 мл раствора НАД·Н<sub>2</sub>, смесь тщательно перемешивают стеклянной па- лочкой и инкубируют в течение 60 мин в водяной бане при +24 °С (поскольку комнатная температура непостоянна). За это время про- дукты обмена веществ полностью реагируют с собственными сыво- роточными энзимами. При возрастании температуры от +24 °С до +36 °С отмечается повышение сывороточной активности СДГ в 2— 3 раза.

В качестве контрольной пробы используют 2,9 мл буфера и 0,1 мл раствора НАД·Н<sub>2</sub>, также подвергшиеся инкубации в водя- ной бане на протяжении 60 мин.

После инкубации смесь переносят в кюветы, в опытную пробу добавляют 0,4 мл раствора фруктозы, размешивают содержимое стеклянной палочкой и замеряют изменение экстинкции на спектро- фотометре в течение 10 мин с интервалом 1 мин при длине волны 366 нм.

Расчет производят по формуле:  $\Delta E_{366 \text{ нм}}^{60 \text{ с}} \cdot 1000 = a$  ед. активност ДГ в испытуемом количестве смеси.

Единицей активности обладает то содержащееся в 1 мл сыворот- ки количество фермента, которое при конечном объеме реакционной смеси 3 мл, толщине слоя 10 мм и температуре +24 °С вызывает изменение экстинкции на 0,001 ед. в 1 мин при длине волны 366 нм.

### *Клинико-диагностическое значение исследования активности СДГ в сыворотке крови*

Активность фермента в сыворотке крови практически здоровых людей ничтожна (менее 1 ед/мл).

Сывороточная активность у больных с болезнью Боткина, опре- деленная в первые три недели заболевания, превышает норму в 10—30 и более раз, выявляя большие, по-видимому, некротические изменения гепатоцитов.

Гиперферментемия СДГ свидетельствует о повышенной прони- цаемости гепатоцитов, некрозе, нарушении обменных процессов в печени. Этот показатель, возможно, позволит глубже понять сущ- ность патологических изменений в исследуемом паренхимном ор- гане.

Для решения вопроса, отражает ли сывороточная активность СДГ патологию печени при ее вторичных повреждениях, И. В. При- валова произвела определение данного ферментного теста у боль- ных с пороками сердца, осложненными хронической сердечной недо-

статочностью, и инфарктом миокарда. По степени сердечной недостаточности пациентов распределили согласно классификации Г. Ф. Ланга.

У больных с первой стадией сердечной недостаточности (14 человек) сывороточная активность СДГ варьировала от 0 до 1 ед., причем сывороточная активность, равная 1 ед., выявлена лишь у двух больных. В среднем она составляла  $0,14 \pm 0,1$  ед.

Среди больных со второй стадией сердечной недостаточности (20 человек) сывороточная активность СДГ колебалась от 0 до 8 ед., в среднем она была равна  $0,89 \pm 0,28$  ед.

В группе больных с третьей стадией сердечной недостаточности (20 человек) сывороточная активность СДГ варьировала в пределах от 0 до 4 ед. при средних величинах  $0,82 \pm 0,28$  ед.

У девяти пациентов с инфарктом миокарда (из 25 обследованных) отмечалось повышение сывороточной активности СДГ от 1 до 8,5 ед., составляя в среднем  $1,6 \pm 0,52$  ед. Увеличенная сывороточная активность наблюдалась у тех больных, у которых инфаркт миокарда был осложнен коллапсом. Четкой зависимости повышения сывороточной активности СДГ от размеров очага инфаркта в миокарде выявить не удалось.

Таким образом, можно сделать вывод, что СДГ в качестве органоспецифичного печеночного фермента отражает патологию печени как при первичном ее повреждении, так и при вторичном, обнаруживая нарушения в ней обменные процессы.

У больных с острой сердечной недостаточностью сывороточная активность увеличена чаще и возрастает выше, чем у больных с хронической сердечной недостаточностью.

Можно полагать, что данный ферментный тест синдрома цитолиза позволит выявить ранние изменения в печени и глубже понять сущность патологических сдвигов в гепатоцитах.

## ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ ЛЕЙЦИНАМИНОПЕПТИДАЗЫ В МОЧЕ И СЫВОРОТКЕ КРОВИ

В последние годы в клиническую практику все шире внедряются методы исследования активности ферментов при самых разных заболеваниях, в том числе и болезнях почек. Так, установлено значительное увеличение активности лейцинаминопептидазы — ЛАП (КФ 3.4.1.1) мочи при остром гломерулонефрите и нефротическом синдроме.

Данное наблюдение объясняется тем, что особенно богата этим ферментом ткань почек. Гистохимические исследования показали, что ЛАП содержится исключительно в цитоплазме клеток проксимальных канальцев и отсутствует в других частях нефрона. Вопрос о том, каким образом фермент проникает в мочу, окончательно не решен. Одни авторы считают, что фермент попадает в мочу из крови, проходя через клубочковый фильтр. Согласно другой точке зрения ЛАП секретируется в мочу клетками проксимальных канальцев. Можно предположить, что повреждение клеток, секретирующих этот фермент, приводит к увеличению проницаемости мембранного барьера для молекул фермента, благодаря которой ЛАП проникает в окружающую среду.

Метод исследования активности  
лейцинаминопептидазы в моче и сыворотке крови

**Принцип.** Метод основан на количественном определении  $\beta$ -нафтиламина, освобождаемого из L-лейцил- $\beta$ -нафтиламидгидрохлорида при ферментативном его гидролизе.

**Реактивы.** 1. Субстрат. 1,37 ммоль/л раствора L-лейцил- $\beta$ -нафтиламидгидрохлорида. 40 мг субстрата растворяют в 100 мл 0,2 моль/л фосфатного буфера, рН 7,0.

2. 0,2 моль/л раствора фосфатного буфера, рН 7,0.

3. Раствор трихлоруксусной кислоты — 40 г/100 мл.

4. Раствор нитрита натрия ( $\text{NaNO}_2$ ) — 0,1 г/100 мл.

5. Раствор сульфаминовокислого аммония ( $\text{NH}_4\text{SO}_3\text{NH}_2$ ) — 0,5 г/100 мл.

6.  $\alpha$ -нафтилэтилендиаминадигидрохлорид в 95° этаноле — 0,5 мг на 1 мл.

**Ход определения активности ЛАП в моче.** Активность фермента устанавливают в суточном количестве мочи, которую сохраняют при комнатной температуре с добавлением тимола в качестве консерванта. Для устранения эндогенных хромогенов, могущих мешать определению, проводят диализ мочи (последний осуществляют в течение четырех ч, погружая целлофановые мешочки с мочой в проточную воду из крана). 1 мл 10% раствора диализованной мочи инкубируют с 1 мл буферного раствора субстрата (рН смеси 7,0—7,2) в термостате при +37°С на протяжении 1 ч (предварительно пробирки со смесью ставят в водяную баню при +39°С и вместе с водяной баней помещают в термостат).

Через 1 ч ферментативный гидролиз заканчивают добавлением в пробирку 1 мл раствора трихлоруксусной кислоты. Контрольная пробирка содержит 1 мл раствора диализованной мочи, 1 мл буферного раствора субстрата, 1 мл раствора трихлоруксусной кислоты. 1 мл исследуемой смеси переносят в другую пробирку и заканчивают диазотитрованием  $\beta$ -нафтиламина доливанием в нее 1 мл раствора нитрита натрия. Через 3 мин избыток нитрита натрия разлагают добавлением 1 мл раствора сульфаминовокислого аммония. Реакция длится 2 мин. Затем в пробирку помещают 2 мл  $\alpha$ -нафтилэтилендиаминадигидрохлорида (рН смеси 1,2). Эта реакция протекает 10 мин при комнатной температуре. Постепенно раствор приобретает синюю окраску в результате образования азо-красителя. Оптическую плотность азо-красителя можно определять на фотоэлектроколориметре с зеленым светофильтром.

Показатели экстинкции с помощью калибровочной кривой переводят в мкмоль  $\beta$ -нафтиламина.

Для получения данных к построению калибровочного графика готовят растворы стандартного реактива, содержащего 90; 45; 36; 28,8; 18; 10,8; 7,2; 3,6 мкг  $\beta$ -нафтиламина в 1 мл воды. К 1 мл каждого разведения добавляют 1 мл фосфатного буфера и 1 мл трихлоруксусной кислоты. С 1 мл полученной смеси ставят цветную реакцию. На основании полученных после фотометрирования проб данных строят калибровочную кривую, показывающую зависимость оптической плотности растворов от содержания в них стандартного вещества. В качестве примера приводим результаты одного из таких построений (табл. 24).



Табл. 24. Данные для построения калибровочного графика в случае разведения  $\beta$ -нафтиламина в воде

Е (показания ФЭКэ)	Количество $\beta$ -нафтиламина в 1 мл воды (мкг)	Количество $\beta$ -нафтиламина в 1 мл воды (мкмоль)
1,0	90	0,620
0,560	45	0,310
0,460	36	0,251
0,370	28,8	0,201
0,240	18	0,126
0,150	10,8	0,075
0,100	7,2	0,050
0,050	3,6	0,025

Определение активности ЛАП в сыворотке крови. 1 мл 2 % раствора сыворотки проводят через описанные для мочи этапы методики. Для количественного исследования  $\beta$ -нафтиламина берут 1 мл надосадочной жидкости, полученной после центрифугирования пробы в течение 10 мин при 3000 об/мин. Центрифугирование необходимо для отделения белка, осажденного добавлением раствора трихлоруксусной кислоты. Активность ЛАП мочи и сыворотки С. О. Андросева и В. А. Буробин выражали в единицах активности.

Одна такая единица соответствовала 1 мкмоль  $\beta$ -нафтиламина, освобожденного за 1 ч инкубации при  $+37^\circ\text{C}$  под влиянием фермента 1 мл мочи или сыворотки. Окончательно активность фермента мочи выражают в условных единицах с учетом всей собранной за 24 ч мочи. Активность ЛАП мочи для любого человека в течение суток относительно постоянна.

*Клинико-диагностическое значение исследования активности лейцинаминопептидазы в моче и сыворотке крови*

Отмечено, что увеличение активности ЛАП сыворотки крови наблюдается у больных с гипоксией, связанной с сердечной декомпенсацией. Содержащийся в клетках печени фермент при этом состоянии выходит в кровь, что объясняется увеличением проницаемости мембран печеночных клеток.

Активность фермента мочи у больных острым гломерулонефритом превышает норму в 6 раз, у больных с обострением хронического нефрита — в 4 раза. При хроническом нефрите нефротического типа активность фермента так же велика, как и при остром гломерулонефрите. У больных с хроническим нефритом и исходом в уремию активность ЛАП мочи не превышает нормы. У больных с амилоидозом почек выявлено незначительное возрастание активности фермента мочи. У большинства больных с различными видами почечной патологии активность фермента сыворотки была нормальной (С. О. Андросова, В. А. Буробин).

## ИССЛЕДОВАНИЕ АКТИВНОСТИ ТРАНСАМИДИНАЗЫ В БИОЛОГИЧЕСКИХ ЖИДКОСТЯХ

В клинической практике встречаются ситуации, когда для диагностики определенных заболеваний можно признать весьма целесообразным установление активности трансаминазы в крови и моче. Это касается прежде всего дифференциальной диагностики между острым панкреатитом и панкреонекрозом, подлежащим срочному оперативному лечению, а также диагностики внезапно развившегося некроза (инфаркта) коры почек.

Все применяемые методы изучения активности трансаминазы в сыворотке крови можно условно подразделить на способы, основанные на реакции Сакагучи (используемой для исследования гуанидинуксусной кислоты), и способы, предусматривающие определение в качестве продукта реакции орнитина (по взаимодействию с ингибрином).

Первоначально предложенный А. А. Карелиным и С. Р. Мардашевым метод, базирующийся на исследовании активности трансаминазы в сыворотке крови и моче по образованию гуанидинуксусной кислоты (за счет переноса амидиновой группы с L-аргинина на глицин), оказался сложным, многоэтапным, хотя и воспроизводимым. Поэтому в дальнейшем упомянутые авторы разработали более простой метод определения активности трансаминазы в сыворотке крови и моче, основанный на применении в качестве субстрата фермента L-капавамина и L-орнитина. Продукт реакции L-аргинин устанавливают по реакции Сакагучи в модификации Сакатэ и Люка (1958).

В качестве унифицированного предлагается способ определения активности трансаминазы по А. А. Карелину. Приводим его описание.

### Определение активности трансаминазы в сыворотке крови и моче

**Принцип.** Трансаминаза (L-аргинин: глицин-амидинотрансфераза; глицин-амидинотрансфераза; КФ 2.6.2.1) катализирует перенос амидиновой группы с L-аргинина на глицин с образованием продуктов реакции L-орнитина и гуанидинуксусной кислоты (гликоциамина). Фермент также ускоряет реакцию переноса амидиновой группы с L-капавамина на L-орнитин с превращением их в L-аргинин и L-капавалин.

Образующийся L-аргинин определяют на спектрофотометре или на фотоэлектроколориметре по цветной реакции Сакагучи в модификации Сакатэ и Люка при длине волны 490—500 нм.

**Реактивы.** 1. Фосфатный буфер — 0,14 моль/л, pH 7,5. 31,93 г  $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$  растворяют в 1 л дистиллированной воды, 3,80 г  $KH_2PO_4$  — в 200 мл дистиллированной воды. Смешивают 1000 мл раствора  $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$  со 150 мл раствора  $KH_2PO_4$ , доводят pH по потенциометру до 7,5.

2. Буферный раствор капавамина сульфата — 7,0 ммоль/л. 270 мг L-капавамина сернокислого растворяют в 140 мл фосфатного буфера.

3. Буферный раствор орнитина гидрохлорида — 7,0 ммоль/л. 159 мг L-орнитина солянокислого вносят в 140 мл фосфатного буфера, 185 мг ЭДТА растворяют в оставшемся объеме реактива 1 (700—720 мл) и используют последний для забуферения сыворотки крови или мочи. Во все указанные растворы добавляют такое количество хлороформа, чтобы всегда на дне сосудов обнаруживались капли консерванта. Реактивы хранят в холодильнике при +4—7 °С.

4. Раствор трихлоруксусной кислоты. 25 г ТХУ растворяют в 50 мл дистиллированной воды.

5. Раствор хромогена. 200 мг 8-оксхинолина (ч. д. а) растирают в ступке в небольшом объеме 3 и NaOH. Растворенную часть реактива сливают в колбу. К осадку в ступке вновь добавляют 3 и натриевой щелочи, смесь сливают в колбу и доводят до 1000 мл. Для ускорения процедуры растворения колбу целесообразно подогреть на водяной бане. Полученный прозрачный зеленоватый раствор переливают в склянку из коричневого стекла. Хранят при комнатной температуре в течение нескольких недель.

6. Раствор N-бромсукцинимиды — 0,1 г/100 мл. Содержат при комнатной температуре в нерастворенном виде. Готовят реактив перед употреблением, делая навески по расчету числа исследуемых проб, исходя из пропорции 1 мг на 1 мл дистиллированной воды.

7. Калибровочный раствор L-аргинина (HCl). 21,07 мг растворяют в мерной колбе в 100 мл дистиллированной воды. 5 мл такого раствора доливают до 100 мл (рабочий реактив). 2 мл рабочего раствора соответствуют 0,1 мкмоль L-аргинина. Из этого реактива готовят серию разведений, содержащих в 2 мл 0,000625; 0,00125; 0,0025; 0,005; 0,01 мкмоль L-аргинина. Используя полученные данные, строят калибровочный график.

Перед процедурой анализа необходимо подготовить следующие реагенты.

1. Исследуемый материал. В чистую сухую пробирку вносят 1 мл фосфатного буфера и 1 мл сыворотки крови или мочи. Содержимое пробирки осторожно перемешивают.

2. Смесь для проведения реакции. 0,35 мл раствора L-капаваина сульфата (2,45 мкмоль), 0,35 мл раствора L-орнитина гидрохлорида (2,45 мкмоль), 0,2 мл забуференной сыворотки крови или мочи.

3. Субстратный раствор представляет собой смесь буферного раствора капаваина и буферного раствора орнитина. Сначала вносят в колбу раствор капаваина, подогреть его на водяной бане при +75 °С в течение 5 мин, а затем добавляют равный объем раствора L-орнитина. Содержимое колбы перемешивают.

Ход определения. В центрифужные пробирки с опытными пробами отмеривают по 0,7 мл субстратного раствора (смесь 0,35 мл раствора капаваина сульфата и 0,35 мл раствора орнитина гидрохлорида). Содержимое пробирок преникубируют в водяной бане при +37 °С 5 мин, затем в опытные и контрольную пробы вносят по 0,2 мл забуференной сыворотки крови или мочи (0,1 мл цельной сыворотки или 0,1 мл цельной мочи). После перемешивания пробы помещают в водяную баню при +37 °С и инкубируют в течение 1 ч. По истечении указанного срока пробирки вынимают из ванны и в контрольную пробу доливают 0,7 мл субстратного раствора. Реакцию прекращают добавлением 0,1 мл раствора ТХУ. Содержимое пробирок перемешивают. Осадок белков отделяют центрифугированием на протяжении 10 мин при 3000 об/мин.

Из надосадочной жидкости отбирают 0,5 мл, доводят этот объем водой до 2 мл. При проведении цветной реакции к 2 мл опытной и холостой проб вносят 2 мл раствора 8-оксихинолина и 1 мл раствора N-бромсукцинимида. После перемешивания пробирки вместе со штативом ставят в холодильник для более эффективного развития окраски.

Через 20 мин измеряют оптическую плотность опытных проб на спектрофотометре типа СФ-4 (СФ-16, СФ-26) при 500 нм или на ФЭКе (длина волны 490 нм), в кювете с толщиной слоя 20 мм (крышку кюветы кладут под ее дно). В качестве раствора для сравнения используют контрольную (холостую) пробу.

Калибровочную кривую строят по известным принципам. Для получения необходимых данных к 2 мл каждого из пяти разведений рабочего калибровочного раствора добавляют (см. «Реактивы», п. 7) 2 мл раствора оксихинолина и 1 мл раствора N-бромсукцинимида с последующей их фотометрией.

Величину прироста количества аргинина, образовавшегося в опытной пробе, получают по калибровочной кривой при сравнении соответствующих данных с показателями холостой пробы.

Активность трансаминазы в сыворотке крови и моче выражают количеством мкмоль или ммоль L-аргинина, наработанного за 1 ч инкубации опытной пробы при +37°C в расчете на 1 л сыворотки крови или мочи. При этом нужно иметь в виду, что с 0,7 мл забуференной сыворотки фактически вносят 0,1 мл биологического материала, а фотометрируемые опытные пробы соответствуют ферментативной активности 0,05 мл сыворотки крови (или мочи). Следовательно, для выражения активности фермента в мкмоль/(ч·л) полученные по калибровочной кривой значения (мкмоль L-аргинина) необходимо умножить на 20 000 ( $2 \cdot 10^4$ ). Для облегчения расчетов можно на оси абсцисс калибровочного графика отложить уже пересчитанные на 1 л биологической жидкости значения величин мкмоль L-аргинина. С этой целью проведенные при описании приготовления реактива 7 значения содержащихся в разведениях калибровочного раствора количеств L-аргинина (от 0,000625 до 0,01 мкмоль в 2 мл раствора) умножают на  $2 \cdot 10^4$ .

*Клинико-диагностическое значение определения активности трансаминазы в сыворотке крови и моче*

Использование трансаминазного теста в клинической диагностике обусловлено тем, что, во-первых, трансаминаза содержится у позвоночных почти исключительно в почках, поджелудочной железе, отсутствуя в других органах и тканях, и, во-вторых, тем, что трансаминаза локализуется большей частью в митохондриях почечных и ацинозных клеток поджелудочной железы. Поэтому появление фермента в сыворотке крови или моче свидетельствует о наличии тубулярного некроза (например, при отравлении большим сулемой), панкреонекроза или деструкции.

Поскольку трансаминаза — это органоспецифический фермент, степень повышения его активности в крови и моче по сравнению с неспецифическими ферментами менее выражена.

При заболеваниях почек трансаминаза появляется в сыворот-

ке крови и моче. Однако ферментурия встречается гораздо чаще, чем ферментемия. Как правило, обострение любого заболевания почек (острая почечная недостаточность, нефрит, пиелонефрит, нефрозы, нефротический синдром, туберкулез почек, почечнокаменная болезнь, коллагеноз с поражением почек) сопровождается подъемом энзиматической активности в моче. При терминальных нефритах (хроническая уремия) трансаминаза не обнаруживается ни в сыворотке крови, ни в моче.

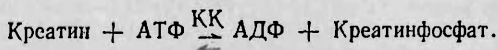
Общий вывод, который вытекает из результатов исследования трансаминазы мочи у больных с нефритами и сыворотки крови у больных с панкреатитами, заключается в том, что этот тест улучшает диагностику поражений почек и поджелудочной железы (С. Р. Мардашев, 1970).

Подобный органоспецифический подход к диагностике у больных панкреатитом открывает путь для установления диагноза на основе определения в крови больных панкреатоспецифических белков — антигенов.

Сывороточная трансаминаза является специфической ферментной пробой для диагностики деструктивных панкреатитов и острого панкреонекроза.

### ИССЛЕДОВАНИЕ АКТИВНОСТИ КРЕАТИНФОСФОКИНАЗЫ (КРЕАТИНКИНАЗЫ)

Креатинкиназа (АТФ: креатин-фосфотрансфераза КФК, КК; КФ 2.7.3.2) представляет собой энзим, катализирующий реакцию:



Этот фермент играет важную роль в энергетическом обмене мышечной и нервной тканей. Наиболее богаты им скелетная мускулатура, миокард и мозг. КК — гетерогенный энзим, молекула которого состоит из двух субъединиц — В и М. Поскольку молекула фермента имеет димерную структуру, при комбинации этих субъединиц образуется три изофермента: ММ — мышечный, ВВ — мозговой и МВ — гибридный, содержащийся в большом количестве в сердечной мышце. Эти изоэнзимы различают по некоторым физико-химическим и иммунологическим свойствам. Определенные органы и ткани имеют характерный для них набор изоферментов. Изменение их содержания в отдельных органах находит отражение в спектральной картине изoenзимов КК сыворотки (плазмы) крови.

Используемые в клинической лабораторной диагностике методы исследования общей активности креатинфосфокиназы сыворотки крови основываются либо на определении креатина, либо на учете образования (по количеству накапливающегося неорганического фосфата) креатинфосфата.

Наиболее удобными, простыми в исполнении и вместе с тем достаточно чувствительными и специфичными являются методы исследования активности фермента, базирующиеся на проведении цветной реакции между креатином, диацетилом и  $\alpha$ -нафтолом. Однако колориметрические методы, в которых применяется данная реакция, сейчас не могут быть широко использованы в практике лабораторной

диагностики. В связи с этим большее распространение получили методы, состоящие в определении креатинфосфата по количеству освобождающегося в процессе его гидролиза неорганического фосфора. Эти способы исследования более сложны и отличаются многоэтапностью. На результатах анализа сказывается качество обработки (мытьё) лабораторной посуды.

Учитывая, что в СССР в большом количестве поступают диагностические наборы реактивов фирмы «Ляхема» (ЧССР) (к ним прилагается инструкция с подробным описанием методики определения общей активности КК сыворотки крови), мы сочли возможным не прибегать в справочнике аналогичный метод, а лишь указать на необходимость: 1) измерять оптическую плотность растворов в кюветах Фенкла с толщиной рабочего слоя 3 мм (при пользовании спектрофотометром и при применении прямоугольной кварцевой кюветы объем раствора опытных, стандартных и контрольных проб нужно увеличить до полного заполнения кюветы); 2) не оценивать активность фермента в Е/л соответственно формуле:

$$\frac{A_1 - A_2}{A_3 - A_4} \cdot 20,$$

где  $A_1 - A_2$  — разность значений экстинкций опытной и контрольной проб ( $E_{оп.}$ );  $A_3 - A_4$  — разность значений экстинкций стандартной и соответствующей ей контрольной проб ( $E_{ст.}$ ).

Поскольку эталонный раствор содержит 1,2 ммоль Р/л, а время инкубации при  $+37^\circ\text{C}$  составляет 1 ч, мы рекомендуем пользоваться следующей формулой расчета:

$$E_{оп.}/E_{ст.} \cdot 1,2 = a \text{ ммоль Р/(ч} \cdot \text{л)}.$$

К такому видоизменению формулы можно прийти также на основании следующих рассуждений: 1 Е/л есть 1 мкмоль Р/(мин  $\cdot$  л), что соответствует 60 мкмоль Р/(ч  $\cdot$  л). В норме активность КК составляет до 20 Е/л, или (что то же) до 1200 мкмоль Р/(ч  $\cdot$  л). В связи с этим более целесообразно (как это и вытекает из требований принятой системы единиц) выражать результаты в ммоль Р/(ч  $\cdot$  л) — данные в мкмоль (например, 1200 мкмоль Р/(ч  $\cdot$  л) следует разделить на 1000 — 1,2 ммоль Р/(ч  $\cdot$  л).

Более правильно было бы, используя коэффициент пересчета (находится отношением молекулярных масс), выражать активность фермента в ммоль креатинфосфата, а не фосфат-ионов.

3) замораживать небольшие порции (по 0,5 мл) приготовленного согласно инструкции раствора активатора, что дает возможность продлить сроки использования набора. Т. А. Борец и А. Р. Спектором (1981) было показано, что применение предварительно размороженных растворов активатора в течение 10 дней не приводит к искажению результатов исследования.

Известны также флюориметрические модификации описанных колориметрических методов.

Основным недостатком теста исследования общей активности КК является то, что при многих состояниях, не связанных с диагностируемым заболеванием (например, при повторных внутримышечных инъекциях), может наблюдаться значительное повышение уровня креатинкиназы в сыворотке крови.

В связи с этим неизмеримо большее значение для диагностики инфаркта миокарда и ряда других заболеваний имеет определение отдельных изоэнзимов креатинфосфокиназы. Большинство используемых для этого методов основывается на применении зонального электрофореза (на агаре, в полнакриламидном геле и на других носителях). Если говорить о диагностике инфаркта миокарда, то наиболее удобными, точными и специфичными являются методы радиоиммунного анализа, разработанные Roberts, Sobel, Parfier (1976).

Однако способы исследования, основывающиеся на этом принципе, в нашей стране еще не получили широкого распространения. Более доступны электрофоретические методы анализа.

### Определение изоферментов креатинкиназы в сыворотке крови методом диск-электрофореза

**Принцип.** Изоферменты КК обнаруживают при помощи сопряженных ферментативных реакций и восстановления нитросинего тетразолия в синий формазан под влиянием НАД·Н<sub>2</sub>.

**Реактивы.** 1. Сахароза. 2. Хлористый калий. 3. Трис(оксиметил)-аминометан. 4. Креатин. 5. АТФ («Реанал»). 6. Фосфоенолпируват (серебро-бариевая соль — «Реанал»). 7. Сернистый магний (MgSO<sub>4</sub>). 8. НАД·Н<sub>2</sub> («Реанал»). 9. Лактатдегидрогеназа (кристаллическая суспензия — «Реакхим»). 10. Пируваткиназа (кристаллическая суспензия — «Реанал»). 11. м-Нитросиний тетразолий («Реанал»). 12. Метилфеназинметосульфат (ФРГ).

**Примечание.** Реактивы с 4 по 12 приготавливаются на трис-буфере (рН 9,0) непосредственно перед выявлением изоферментов КК.

Для исследования изоферментов КК берут 0,02 мл сыворотки крови, разведенной раствором сахарозы (концентрация 40 г/100 мл) в соотношении 1 : 1.

**Ход определения.** Продолжительность электрофореза сыворотки крови составляет 2,5 ч. Электрофорез проводят в специальной холодной камере при температуре +4°.

Полученные гелевые столбики помещают в свежую инкубационную смесь (по Б. Ф. Коровкину): к 3 мл смеси (0,5 моль/л трис-буфера, рН 9,0, содержащего 0,068 моль/л креатина, 0,0035 моль/л АТФ, 0,002 моль/л фосфоенолпирувата, 0,008 моль/л сернистого магния, 0,002 моль/л НАД·Н<sub>2</sub>) добавляют 0,15 мл раствора лактатдегидрогеназы (1 мг/мл) и 0,04 мл раствора пируваткиназы (1 мг/мл). Инкубация длится 18 ч при +37°С. Затем инкубационную смесь сливают, столбики заливают свежим красящим раствором, содержащим 6 мг феназинметосульфата и 24 мг нитросинего тетразолия в 21 мл 0,5 моль/л трис-буфера (рН 9,0). Пробирки со столбиками, залитыми красящим раствором, помещают в термостат без доступа света на 10 мин. За это время весь столбик окрашивается в синезеленый цвет (тетразолий восстанавливается в синий формазан под влиянием НАД·Н<sub>2</sub>). В местах локализации изоферментов креатинкиназы НАД·Н<sub>2</sub> окисляется в НАД. Изоферменты КК выявляются в виде бледно-серых полос на темном фоне. Фракции учитывают методом денситометрии или другим способом. Этим способом в сыворотке крови здоровых людей обнаруживают пять изоферментов КК, которые располагаются в области β<sub>2</sub>-, γ-глобулинов.



*Клинико-диагностическое значение исследования  
активности креатинкиназы и ее изоэнзимов  
в сыворотке крови*

Как уже было указано, изоферменты креатинкиназы находятся в скелетной мускулатуре, миокарде и центральной нервной системе. Поэтому определение общей активности креатинкиназы применяют для диагностики миопатий, инфаркта миокарда, заболеваний центральной нервной системы. Данный тест нашел наиболее широкое распространение для диагностики инфаркта миокарда. Поскольку у больных с острой коронарной недостаточностью скелетная мускулатура и ЦНС, как правило, не вовлекаются в патологический процесс, то повышение активности КФК в этих случаях обычно свидетельствует о поражении миокарда. При неосложненной стенокардии и острой очаговой дистрофии активность креатинфосфокиназы остается нормальной. При мелкоочаговом инфаркте миокарда чувствительность этого теста составляет 92 % всех выявлений. Возрастание активности фермента начинается уже через 2—3 ч от начала заболевания. Максимум ее, в 5—10 раз превышающий норму, наблюдается через 13—30 ч. Нормализуется активность креатинкиназы на 2—3-и сутки. При крупноочаговом инфаркте миокарда чувствительность теста соответствует 98 % всех выявлений. Активность фермента, в 15—20 раз превышающая норму, приходит к исходной величине на 5—8-е сутки от начала заболевания.

Следует отметить, что у больных с выраженным нарушением коронарного кровообращения, сопровождающимся длительным ангинозным приступом, пароксизмальной тахикардией и коллапсом, повышенная активность КФК сохраняется до 10—12-го дня острого периода инфаркта миокарда. Длительное удерживание гиперэнзимемии (до 2—3 недель) наблюдается у больных с затяжным течением инфаркта миокарда. Кстати, при инфарктах легкого активность КФК не выходит за пределы нормы (что имеет известное дифференциально-диагностическое значение).

Определение общей активности креатинфосфокиназы в динамике развития у больных острого и подострого периодов течения инфаркта миокарда может также иметь прогностическое значение. Замечено, что у лиц с длительно сохраняющейся гиперферментемией в последующем, в постинфарктном периоде, хроническая сердечно-сосудистая недостаточность развивается быстрее по сравнению с больными, у которых наблюдается кратковременная гиперэнзимемия.

Высокую активность КФК (в 6—10 раз превышающую норму) находят у больных с мышечной дистрофией. При прогрессирующей мышечной дистрофии (миопатии) увеличение активности рассматриваемого показателя (обычно 10—50-кратное) обнаруживается уже в первые стадии болезни, еще до появления четких клинических признаков патологического состояния. С развитием заболевания мускулатура у больных замещается жировой и соединительной тканью, вследствие чего в конечной стадии активность КФК приходит к норме.

Высокая активность КФК выявляется и при других мышечных заболеваниях, прежде всего многогенного происхождения (полимиозит, дерматомиозит и т. д.). При нейрогенных мышечных дистрофиях (миастения, нейральная мышечная атрофия и прочие) обнаруживается лишь небольшой подъем активности КФК.

Следует отметить, что спортивные нагрузки и мышечные травмы (как и некоторые лечебные процедуры, например внутримышечные инъекции) могут приводить к кратковременному увеличению активности фермента.

Возрастает активность фермента у больных и при хирургических операциях, после применения у них длительной анестезии.

Наилучшим тестом для диагностики инфаркта миокарда является исследование МВ-изофермента креатинфосфокиназы. Его максимальная активность отмечается через 20 ч после первых клинических симптомов инфаркта миокарда, снижение до нормального уровня обычно происходит спустя 40—50 ч от начала заболевания. Из-за высокой вариабельности этого теста в норме важно определение популяционной принадлежности обследуемых.

Если говорить о диагностической значимости диск-электрофоретического метода фракционирования изоэнзимов креатинфосфокиназы, то следует отметить, что у больных в острый период инфаркта миокарда резко возрастает уровень  $КК_1$  и уменьшается содержание  $КК_2$  в крови. В первые дни поступления в стационар у некоторых больных со стенокардией обнаруживается небольшое увеличение содержания фракции  $КК_1$ . При выписке больных из стационара спектр изоферментов  $КК$  нормализуется.

Повышение активности  $КК_1$  в сыворотке крови у больных стенокардией, возможно, свидетельствует о наличии невыявленного на электрокардиограмме и при определении общей активности  $КК$  небольшого участка некроза в миокарде.

## Глава VII

### ИЗУЧЕНИЕ УГЛЕВОДНОГО ОБМЕНА

Для диагностики целого ряда заболеваний (сахарный диабет, патологические состояния, связанные с недостаточностью функции печени и почек, некоторые эндокринные заболевания, новообразования мозга, поджелудочной железы и надпочечников, гиповитаминоз  $B_1$ , а также ряд наследственных аферментозов) важно иметь объективное представление о состоянии углеводного обмена у больных, одним из показателей которого является уровень глюкозы в крови. Ее концентрация в крови взрослого человека составляет 3,32—5,55 ммоль/л. Наряду с глюкозой в крови содержатся также фруктоза и связанные с белками полисахариды. Однако к исследованию концентрации других сахаров и гликогена прибегают значительно реже. Известную диагностическую ценность представляет также определение молочной и пировиноградной кислот, активности ряда ферментов углеводного обмена и других показателей.

#### ОПРЕДЕЛЕНИЕ ГЛЮКОЗЫ В КРОВИ

1. Редуктометрические методы, основанные на свойстве сахара восстанавливать в щелочной среде соли тяжелых металлов. К ним относятся:

1. Титрометрический способ Хагедорна и Пенсена (1923), в котором используют свойство сахаров восстанавливать при кипячении

в щелочной среде железосинеродистый калий (красную кровяную соль) в железистосинеродистый калий (желтую кровяную соль). По степени этого восстановления титрометрически исследуют концентрацию сахара в крови. Однако ввиду того что в крови присутствует ряд соединений, не относящихся к углеводам, но обладающих восстановительными свойствами (мочевая кислота, глутатин, креатинин), полученный результат включает всю сумму восстанавливающих соединений и получаемое редуктометрическими методами количество сахара в крови оказывается значительно выше истинного количества глюкозы. В этом заключается недостаток всех редуктометрических способов. Однако они тем не менее сохраняют свое клиническое значение, поскольку разность между кажущимся сахаром крови и истинной глюкозой (так называемая остаточная редукция) у одного и того же лица есть величина постоянная, не зависящая, в частности, от введения инсулина или приема глюкозы.

2. Колориметрические методы, основанные на определении степени окраски соединений, образующихся в результате различных цветных реакций: а) метод Сомоджи (1933), в котором применяется способность глюкозы восстанавливать гидрат окиси меди в закись меди, превращающей, в свою очередь, арсеномолибденовую кислоту в молибденовую лазурь. Этот метод неспецифичен, трудоемок и в настоящее время редко используется в клинко-диагностических лабораториях;

б) метод Фолина — Ву (1919), состоящий в определении интенсивности окраски комплекса, образующегося в результате восстановления тартрата меди в окись меди. Последняя, взаимодействуя с молибдотустенговой кислотой, дает цветную реакцию. Способ относительно прост: недостатком его является то, что между имеющейся в крови глюкозой и получаемой окраской не существует строгой пропорциональности;

в) метод Крезелиуса—Зейферта (Крезелиус, Зейферт, 1928, 1942), базирующийся на восстановлении пикриновой кислоты в пикраминовую с последующим ее колориметрированием. Способ быстр в исполнении, но не очень точен. Ошибка может превышать 10—20%. В связи с этим указанный метод имеет ориентировочное значение. Им можно пользоваться для исследования уровня сахара в крови при профилактических осмотрах;

г) метод с антроновым реактивом по Моррису (1948) и Роз (1955). Антроновый способ заключается в колориметрировании цветного комплекса, образующегося в результате соединения антрона с углеводами. Точные результаты могут быть получены только при наличии чистейших реактивов и соблюдении постоянной температуры реакции;

д) ортотолуидиновый метод Гультмана в модификации Хивариена — Никкила (1962), состоящий в установлении интенсивности окрашивания раствора, возникающего при взаимодействии ортотолуидина с глюкозой. Этот способ точен и дает возможность более специфичного определения содержания глюкозы, поэтому он предлагается в качестве унифицированного.

II. Энзиматические (глюкозооксидазные) методы (Нельсон, 1940, и др.), основанные на каталитическом действии фермента глюкозооксидазы. Из способов этой группы наиболее широкое применение получил глюкозооксидазный метод определения глюкозы в крови по И. С. Лукомской и В. К. Городецкому (1961).

Согласно приказу об унификации, в качестве обязательных для использования предлагается три способа исследования: глюкозооксидазный, ортотолуидиновый и метод Хагедорна — Йенсена.

Ортотолуидиновый и глюкозооксидазный методы определения глюкозы могут выполняться с применением диагностических наборов реактивов фирмы «Лаксма» (ЧССР).

В нашей стране также освоен выпуск наборов химических реактивов для исследования глюкозы в биологических жидкостях по цветной реакции с ортотолуидином.

### Определение глюкозы в крови и моче по цветной реакции с ортотолуидином

**Принцип.** Глюкоза при нагревании с ортотолуидином в растворе уксусной кислоты дает зеленое окрашивание, интенсивность которого (прямо пропорциональная концентрации сахара в крови) устанавливаются колориметрически.

**Реактивы.** 1. Ортотолуидин, очищенный путем перегонки (с этой целью используют электроплитку с асбестовой сеткой или песчаную баню). Реактив должен иметь слегка желтоватую окраску. Хранят в холодильнике в посуде из темного стекла без доступа воздуха.

Предпочтительнее ортотолуидин перегонять в условиях создаваемого в аппарате разрежения вакуума, так как при температуре кипения  $+200,2^{\circ}\text{C}$  происходит его разложение. При атмосферном давлении  $10,64\text{ кПа}$  ( $80\text{ мм рт. ст.}$ ) температура кипения ортотолуидина равна  $+121^{\circ}\text{C}$ , в связи с чем становится возможным получение бесцветного реактива. Перегонке подлежит ортотолуидин желтого или коричневого цвета.

2. Ледяная уксусная кислота — х. ч.

3. Раствор трихлоруксусной кислоты —  $3\text{ г}/100\text{ мл}$ .

4. Тимочевина.

5. Ортотолуидиновый реактив.  $0,15\text{ г}$  ( $1,5\text{ г}$ ) тимочевины растворяют в  $94\text{ мл}$  ( $940\text{ мл}$ ) ледяной уксусной кислоты и смешивают с  $6\text{ мл}$  ( $60\text{ мл}$ ) бесцветного или слегка желтоватого ортотолуидина. Реактив стоек. Хранят его на холоде. Можно пользоваться готовым ортотолуидиновым реактивом отечественного производства.

6. Основной стандартный раствор глюкозы —  $27,80\text{ ммоль}/\text{л}$ . В мерную колбу на  $100\text{ мл}$  вносят  $500\text{ мг}$  высушенной до постоянного веса при  $+100^{\circ}\text{C}$  глюкозы и добавляют до метки бензойную кислоту ( $0,2\text{ г}/100\text{ мл}$ ).

Раствор бензойной кислоты готовят следующим образом:  $0,2\text{ г}$  кристаллической бензойной кислоты растворяют в небольшом количестве воды, нагревая смесь на водяной бане до полного растворения. После охлаждения до комнатной температуры реактив переносят в мерную колбу на  $100\text{ мл}$  и доливают до метки дистиллированной водой. Бензойная кислота увеличивает стабильность стандартного раствора глюкозы.

Можно также пользоваться водным раствором глюкозы, однако время хранения такого стандартного реактива значительно меньше. Экстинкция стандартного раствора не должна давать резких колебаний, в противном случае необходимо приготовить новый раствор. Хранить его следует в холодильнике.

Ход определения глюкозы в крови. В центрифужную (или серо-

логическую) пробирку наливают 0,9 мл раствора трихлоруксусной кислоты и выдувают на стенку ее 0,1 мл крови, взятой микропипеткой из пальца обследуемого. Смесь взбалтывают, центрифугируют. К 0,5 мл центрифугата добавляют 4,5 мл ортолунидинового реактива. Пробирку со смесью помещают в кипящую водяную баню на 8 мин (1), охлаждают ее под краном холодной водой (или в водяной бане). Колориметрируют на ФЭКе с красным (длина волны 600—650 нм) или желтым (длина волны 595 нм) светофильтром в кювете с шириной слоя 10 мм. В качестве раствора для сравнения вместо контрольной пробы можно использовать дистиллированную воду, поскольку значения их экстинкций практически одинаковы.

При проведении контрольной пробы (в чем нет необходимости) к 4,5 мл ортолунидинового реактива доливают 0,5 мл трихлоруксусной кислоты. Далее пробу обрабатывают так же, как опытную.

М. Е. Халецкий и Ф. М. Колерно (1972), обобщив опыт 5-летнего использования этого метода в клинической практике (всего проведено более 8000 исследований сахара в крови), рекомендуют к 0,5 мл надосадочной жидкости добавлять 2,0 мл ортолунидинового реактива, а фотометрирование осуществлять на ФЭКе с желтым светофильтром в кювете с шириной слоя 5 мм.

**Примечание.** После кипячения содержимое пробирок иногда бывает мутноватым. В таких случаях пробы необходимо вновь отцентрифугировать на протяжении 10 мин, а затем отобрать и проколориметрировать надосадочную жидкость.

Описанным способом может быть установлен сахар и в спинномозговой жидкости.

Стандартные пробы ставят так же, как опытные, но вместо сыоротки берут основной стандартный раствор глюкозы, разбавленный перед употреблением в 5 раз, с концентрацией 5,55 ммоль/л (в случае высокого содержания глюкозы в крови используют стандартные растворы с концентрацией 16,65 ммоль/л или основной раствор с концентрацией 27,80 ммоль/л).

Рассчитывают по формуле:

$$C_{\text{оп.}} = \frac{C_{\text{ст.}} \cdot E_{\text{оп.}}}{E_{\text{ст.}}}$$

где  $C_{\text{оп.}}$  — концентрация глюкозы в опытной пробе (ммоль/л);  $C_{\text{ст.}}$  — концентрация глюкозы в стандартной пробе, близкая к физиологической (5,55 ммоль/л);  $E_{\text{оп.}}$  — оптическая плотность опытной пробы;  $E_{\text{ст.}}$  — оптическая плотность раствора стандарта.

Этот вариант расчета дает наиболее точные результаты, поскольку он устраняет разнообразное влияние различных факторов, сказывающихся в процессе обработки опытных проб.

Однако при четко отработанной технике выполнения исследования, строгом соблюдении постоянства условий на всех этапах определения (в наибольшей степени это касается стандартизации условий прогревания проб в ходе анализа) расчет можно производить по калибровочным кривым или с применением коэффициента пересчета.

Чтобы получить данные для построения калибровочной кривой, необходимо сделать следующее. Из основного стандартного раствора глюкозы с концентрацией 55,50 ммоль/л (1000 мг/100 мл) берут 8, 10, 20, 30, 40 мл и доводят объемы раствором бензойной кислоты

(0,2 г/100 мл) до 100 мл. Полученные таким путем рабочие стандартные растворы содержат соответственно 4,44; 5,55; 11,10; 16,65; 22,20 ммоль/л глюкозы.

Стандартные пробы обрабатывают так же, как опытные. Экстинкцию измеряют на ФЭКе с красным или желтым светофильтром в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора для сравнения используют дистиллированную воду (или контрольные реактивы). На основании полученных значений строят калибровочную кривую.

Закон Беера действителен при концентрировании глюкозы в сыворотке крови в пределах от 2,78 до 22,20 ммоль/л.

При содержании глюкозы в концентрации более 400 мг/100 мл (22,20 ммоль/л) исходное ее количество уменьшают в 2 раза и исследование повторяют.

С помощью построенной калибровочной кривой может быть выведен фактор пересчета. Тогда для определения концентрации глюкозы (ммоль/л) применяют следующую формулу:

Глюкоза в ммоль/л = экстинкция · константу (фактор пересчета).

Константу находят по значениям экстинкции различных концентраций глюкозы (5,55; 11,10; 16,65; 22,20 ммоль/л).

Константу вычисляют по формуле:

$K = \text{концентрация глюкозы} / \text{экстинкция}$ .

Полученные для каждой экстинкции значения констант складывают, после чего находят их среднее значение.

При пользовании другой серией ортолуидина необходимо каждый раз строить новую калибровочную кривую.

Учитывая это обстоятельство, а также большую сложность соблюдения строгого постоянства условий, мы не рекомендуем устанавливать концентрацию глюкозы по калибровочной кривой.

В норме содержание глюкозы составляет в цельной крови 3,32—5,55 ммоль/л, в плазме — 3,32—6,10 ммоль/л.

В ряде случаев возникает необходимость определения глюкозы в эритроцитах. Известно, что большая проницаемость клеточных мембран эритроцитов по отношению к глюкозе исключает возможность их отмывания от плазмы крови, так как при этом из них удаляется глюкоза. И. В. Сидоренков с соавт. (1974) предложили формулу, на основании которой возможен расчет концентрации глюкозы в эритроцитах:

$$C_{\text{э}} = \frac{(100\% \cdot C_{\text{к}}) - (П \cdot C_{\text{п}})}{\text{Э}}$$

где  $C_{\text{э}}$ ,  $C_{\text{к}}$ ,  $C_{\text{п}}$  — содержание глюкозы в эритроцитах, цельной крови и плазме в отдельности, а П и Э — процентное содержание плазмы и эритроцитов (гематокритное число).

Показано, что хранение крови при +4° в течение первых двух часов после ее взятия практически мало отражается на содержании глюкозы в эритроцитах и плазме крови.

Ход определения глюкозы в моче. После проведения качественной пробы на содержание глюкозы мочу разводят в 2—10 раз в зависимости от характера реакции.

0,1 мл подготовленной таким способом мочи смешивают с 4,5 мл

ортотолуидинового реактива и далее пробы обрабатывают так же, как опытные, при исследовании глюкозы в крови.

При расчете надо учитывать соответствующее разведение мочи.

В порце моча содержит следы глюкозы. Для перехода от процентной концентрации к выражению содержания глюкозы в ммоль/л следует воспользоваться фактором пересчета 5,55.

**Примечание.** Наличие белка в моче не влияет на определение глюкозы.

Исследование глюкозы в крови, спинномозговой жидкости и моче, проводимое ортотолуидиновым методом с использованием наборов реактивов (рижский завод «Реагент» и фирма «Лаксема», ЧССР), подробно изложено в прилагаемых инструкциях. При использовании наборов реактивов нужно делать пересчет результатов из мг/100 мл в ммоль/л, для чего применяют фактор пересчета 0,0555.

Замечено, что при определении глюкозы ортотолуидиновым методом у больных сахарным диабетом получаютя слишком низкие цифры содержания сахара в крови (по сравнению с аналогичным показателем по Хагедорну — Йенсену) — например 7,76 ммоль/л вместо 13,88 ммоль/л. Поэтому нередко говорят о том, что ортотолуидиновый метод не выявляет высоких цифр сахара в крови. Это может быть связано с недостаточным содержанием самого реактива в пробе. Для того чтобы выйти из этого положения, мы рекомендуем вводить в пробу меньшее количество исследуемой биологической жидкости. При пользовании, например, ультрамикрометодом объем центрифугата (0,25 мл) разводят вдвое физиологическим раствором и из полученного объема раствора (0,5 мл) отбирают половинное его количество (0,25 мл), которое и проводят через все этапы методики. **Полученный результат умножают на 2.**

Не следует пользоваться сывороткой крови: при стоянии содержание сахара в ней резко падает.

**Примечание.** При определении содержания глюкозы в биологических жидкостях с помощью ортотолуидинового реактива отечественного производства необходимо соблюдать некоторые меры предосторожности. В состав этого реактива входят ортотолуидин и концентрированная уксусная кислота. Ортотолуидин (или ортоаминотолуол) представляет собой жидкость с низким давлением паров, поэтому отравление этим веществом происходит не за счет вдыхания его паров, а контактным путем, то есть через кожу, причем ортотолуидин не оказывает на кожу раздражающего действия. В литературе описаны случаи острого и хронического отравления этим веществом людей, имевших дело с высокими концентрациями ортотолуидина (при его промышленном производстве).

Концентрация ортотолуидина (6 мл/100 мл), используемая при работе с набором реактивов, не представляет какой-либо опасности для здоровья человека. Раздражающее действие на органы дыхания и кожу оказывают уксусная кислота и ее пары. Чтобы избежать нежелательного действия паров кислоты, работу с набором реактивов необходимо проводить под тягой, в резиновых перчатках, применять пробирки с пробками, ни в коем случае не тягивать реактив в пипетку ртом (следует пользоваться резиновой грушей).

#### Определение глюкозы биологических жидкостей анилиновым методом

Исследования Е. Г. Григоряна и И. З. Кириша (1978) показали, что ортотолуидин с успехом может быть заменен анилином. При этом метод, сохраняя специфичность ортотолуидинового, оказывается еще более чувствительным.

**Принцип.** Анилин, взаимодействуя (подобно ортотолуидину) с



глюкозой, образует комплекс, о содержании которого судят по интенсивности светопоглощения пробы при 365 нм.

**Реактивы.** 1. Осадитель белков: а) раствор трихлоруксусной кислоты — 3 г/100 мл или б) раствор хлорной кислоты — 4 г/100 мл.

2. Раствор анилина в ледяной уксусной кислоте (6 г/100 мл), содержащий тиомочевину в концентрации 0,15 г тиомочевины на 100 мл раствора анилина в ледяной уксусной кислоте. Анилин предварительно пергоняют, лучше без доступа воздуха.

3. Калибровочные растворы — 2,78 ммоль/л (50 мг/100 мл), 5,55 ммоль/л (100 мг/100 мл), 11,10 ммоль/л (200 мг/100 мл) глюкозы.

**Ход определения.** В центрифужные пробирки набирают 0,9 мл раствора осадителя, в который выдувают 0,1 мл крови или спинномозговой жидкости. Раствор тщательно перемешивают и центрифугируют при 1500 об/мин в течение 10—15 мин. Из надосадочной жидкости отбирают 0,5 мл, переносят в пробирки, в которые добавляют по 4,5 мл раствора анилина, все перемешивают и помещают пробирки в кипящую водяную баню точно на 10 мин. После этого пробирки извлекают, охлаждают и растворы колориметрируют на ФЭКе-56 в кюветках с толщиной рабочего слоя 10 мм (длина волны 365 нм) с использованием ртутной лампы СВД-120 А.

Экстинкцию продуктов конденсации глюкозы с анилином можно измерять как в ультрафиолетовой (365 нм), так и в видимой области (460 нм).

При фотометрии стандартных растворов глюкозы в ультрафиолетовых лучах на ФЭКе-56 их экстинкции в 4—5 раз выше, чем при колориметрии рассматриваемых растворов в видимых лучах.

Нормы содержания глюкозы те же, что и при исследовании этого компонента ортотолуидиновым методом.

#### **Определение глюкозы в крови, плазме (сыворотке) и спинномозговой жидкости глюкозооксидазным методом**

**Принцип.** Глюкоза в присутствии фермента глюкозооксидазы окисляется кислородом воздуха с образованием в ходе реакции перекиси водорода. Перекись водорода окисляет ортотолуидин, превращая его в окрашенное соединение, интенсивность окраски которого пропорциональна содержанию глюкозы.

**Реактивы.** 1. Кристаллический препарат глюкозооксидазы ( $\beta$ -D-глюкоза:  $O_2$ -оксидоредуктаза; КФ 1.1.3.4). Отечественную глюкозооксидазу выпускают, как правило, с активностью 90—120 тыс. глюкозооксидазных единиц на 1 г препарата. Хранят в холодильнике в герметической упаковке.

2. Кристаллический препарат пероксидазы (перекись водорода: оксидоредуктаза; КФ 1.11.1.7). Пероксидаза фирмы «Реанал» (ВНР) со степенью очистки 0,6 пригодна для определения глюкозы. Содержат в холодильнике в герметической упаковке.

3. Раствор хлористого натрия — 0,9 г/100 мл.

4. 0,25 моль/л раствора уксуснокислого натрия. 17 г кристаллического уксуснокислого натрия ( $CH_3COONa \cdot 3H_2O$ ) растворяют в мерной колбе на 500 мл в небольшом количестве воды и доводят объем дистиллированной водой до метки.

5. 0,25 моль/л раствора уксусной кислоты. В мерную колбу на

500 мл наливают небольшое количество воды, добавляют 7,75 мл 10% раствора уксусной кислоты и доливают объем дистиллированной водой до метки.

6. 0,25 моль/л ацетатного буфера, рН 4,8. 0,25 моль/л раствора уксуснокислого натрия смешивают с 0,25 моль/л раствора уксусной кислоты в соотношении 6 : 4. Проверяют рН. Буферный раствор стабилен при хранении в холодильнике в течение месяца.

7. Раствор сернистого цинка. 50 г кристаллического сернистого цинка ( $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ ) растворяют в 1 л дистиллированной воды. Раствор стабилен. Содержат при комнатной температуре.

8. 0,3 н раствор едкого натра.

Раствор сернистого цинка и едкого натра берут для реакции в эквивалентных количествах, то есть они должны нейтрализовать друг друга. Для этого раствор сернистого цинка титруют раствором едкого натра до нейтральной реакции по фенолфталеину (слабо розовая окраска). Если на титрование пошло равное количество растворов, то реактив пригоден для использования.

9. Ортотолидин (азоамин синий К; 3,3-диметилбензидин), ч. д. а. Имеющийся в продаже ортотолидин перекристаллизовывают из горячего абсолютного этилового спирта добавлением дистиллированной воды с последующим быстрым отсасыванием выпавших кристаллов на воронке Бюхнера и высушиванием ортотолидина в вакуум-экдикаторе над хлористым кальцием.

10. Абсолютный этиловый спирт, полученный в лаборатории или коммерческий.

11. Раствор ортотолидина в абсолютном этиловом спирте — 1 г/100 мл. 1 г ортотолидина растворяют в небольшом количестве теплого этилового спирта. После охлаждения доводят объем смеси этиловым спиртом до 100 мл. Раствор стабилен на протяжении нескольких месяцев при хранении в холодильнике в плотно закрытой посуде из темного стекла.

12. Энзимо-хромогенный реактив. В мерную колбу на 500 мл помещают 300—400 мл 0,25 моль/л ацетатного буфера (рН 4,8), добавляют 10 мг глюкозооксидазы (навеска взята из расчета активности глюкозооксидазы — 92 000 ед. на 1 г препарата; при применении препарата с другой активностью фермента соответственно будет меняться величина навески), содержимое перемешивают до полного растворения, вносят 5 мг пероксидазы. Смесь опять перемешивают до полного растворения. Добавляют 5 мл 1 г/100 мл раствора ортотолидина и доводят объем до метки ацетатным буфером, затем реактив фильтруют. Он стабилен в течение 3—4 недель при хранении в холодильнике в плотно закрытой посуде из темного стекла.

Только что полученный реактив бесцветен или окрашен в слабо-зеленый цвет. Годен к употреблению через 2 ч после приготовления. Если реактив интенсивного зеленого цвета, то это свидетельствует о загрязнении ортотолидина. В таком случае ортотолидин необходимо перекристаллизовать.

13. Раствор бензойной кислоты — 0,2 г/100 мл. Готовят нагреванием.

14. Стандартный раствор D-глюкозы в 0,2 г/100 мл растворе бензойной кислоты. Высушенную до постоянного веса при  $+37^\circ C$  D-глюкозу хранят в эксикаторе. 500 мг глюкозы растворяют в мерной колбе на 100 мл в 0,2 г/100 мл растворе бензойной кислоты.

Оставляют стоять на свету в течение 12—16 ч. 1 мл стандартного раствора содержит 5 мг глюкозы.

**Ход определения.** Для приготовления опытной пробы в центрифужную пробирку помещают 1,1 мл раствора хлористого натрия, добавляют 0,1 мл крови (плазмы, сыворотки или спинномозговой жидкости), несколько раз промывают пипетку, приливают 0,4 мл раствора сернистого цинка и 0,4 мл раствора едкого натра. Содержимое пробирки тщательно перемешивают и через 10 мин центрифугируют при 2500 об/мин на протяжении 10 мин. Тотчас же сливают надосадочную жидкость.

К 1 мл надосадочной жидкости помещают 3 мл энзимо-хромогенного реактива, доведенного предварительно до комнатной температуры. Осторожно все перемешивают и на 20—23-й мин измеряют экстинкцию раствора на фотоэлектроколориметре с красным светофильтром в кювете с толщиной слоя 10 мм (длина волны 625 нм). Результаты сравнивают с аналогичными данными контрольной пробы.

Контрольную пробу готовят следующим образом. К 1 мл дистиллированной воды добавляют 3 мл энзимо-хромогенного реактива.

Количество проб в серии не должно превышать 10—15. Причем отрезок времени с момента доливания энзимо-хромогенного реактива до измерения экстинкции раствора должен быть во всех пробах одинаковым.

Расчет производят по формуле:

$$C_{оп.} = E_{оп.} / E_{ст.} \cdot C_{ст.},$$

где  $C_{оп.}$  — концентрация глюкозы в крови (мг/100 мл);  $C_{ст.}$  — концентрация глюкозы в стандартном растворе (мг/100 мл, например, 100 мг/100 мл);  $E_{оп.}$  — экстинкция опытной пробы;  $E_{ст.}$  — экстинкция стандартной пробы.

Поскольку результаты определений зависят в значительной степени от условий выполнения исследования, то стандартную пробу ставят параллельно опытной и обрабатывают ее так же, как и опытную. На 1 серию проводят 1 стандартную пробу. Линейная зависимость между оптической плотностью и концентрацией глюкозы сохраняется от 0 до 400 мг/100 мл.

Нормальные величины концентрации глюкозы в крови — 56—94 мг/100 мл (3,11—5,22 ммоль/л), в плазме и сыворотке — 55—100 мг/100 мл (3,05—5,55 ммоль/л), в спинномозговой жидкости — 50—70 мг/100 мл (2,78—3,89 ммоль/л).

**Примечания:** 1. Цельную кровь необходимо исследовать немедленно после взятия.

2. В каждую последующую пробу серии энзимо-хромогенный реактив добавляют с интервалом в 1 мин.

3. Для получения более точных результатов время максимального окрашивания (20—23 мин) устанавливают в каждой серии тестов по нарастающему экстинкции первой опытной пробы.

4. За 3 дня до определения нужно исключить прием обследуемым аскорбиновой кислоты, антибиотиков тетрациклинового ряда.

### *Клинико-диагностическое значение определения глюкозы и фруктозы в крови*

В цельной крови здорового взрослого человека концентрация сахара составляет 4,44—6,66 ммоль/л (по Хагедорну — Генсену). Основным его компонентом является глюкоза, содержащаяся в крови

и концентрации 2,78—5,27 ммоль/л. Наряду с этим в крови в незначительном количестве имеются и другие сахара — фруктоза, галактоза, пентозы.

На содержание сахара в крови оказывают влияние самые разнообразные физиологические и патологические процессы. Увеличение концентрации глюкозы в крови — гипергликемия — наблюдается обычно при следующих состояниях:

1) сахарном диабете, остром панкреатите, панкреатических циррозах (эти заболевания дают гипергликемию, связанную с недостатком в организме инсулина);

2) токсическом, травматическом, механическом раздражении центральной нервной системы. Травма, опухоль мозга, а также эпидемия, менингит, отравление окисью углерода, синильной кислотой, опиумом, ртутью сопровождаются так называемой центральной (нервной) гипергликемией;

3) повышении гормональной деятельности щитовидной железы, коры и мозгового слоя надпочечников, гипофиза;

4) после обильного приема с пищей углеводов — алиментарная гипергликемия;

5) сильным эмоциональном и психическом возбуждении;

Уменьшение уровня глюкозы в крови — гипогликемия — встречается при:

1) передозировке инсулина (во время лечения сахарного диабета);

2) заболевании почек, когда нарушается процесс реабсорбции в канальцах;

3) плохом всасывании углеводов вследствие заболевания тонкого кишечника;

4) иногда при сердечной недостаточности;

5) сниженной гормональной деятельности перечисленных выше желез внутренней секреции;

6) спленомегалии (у детей);

7) отравлении фосфором, бензолом, хлороформом;

8) после большой потери крови;

9) гиперфункции островков Лангерганса поджелудочной железы (аденома, гиперплазия, гипертрофия);

10) несбалансированной диете (при неправильном соотношении пищевых веществ), от недоедания и голода — алиментарная гипогликемия.

Среди заболеваний, связанных с нарушением обмена углеводов, следует отметить наследственную непереносимость фруктозы и эссенциальную фруктоземию.

Наследственная непереносимость фруктозы — довольно частое и весьма тяжелое заболевание, которое обнаруживается при переводе детей на смешанное вскармливание и проявляется судорогами, рвотой, потерей сознания, тяжелыми поражениями печени и почек, большей частью со смертельным исходом.

Непереносимость фруктозы связана с отсутствием в печени, почках и слизистой кишечника фруктозо-1-фосфатаальдозы и значительным снижением активности фруктозо-1,6-дифосфатаальдозы.

Эссенциальная фруктоземия — доброкачественная врожденная

аномалия обмена фруктозы, вызванная недостаточной активностью фруктокиназы.

Содержание фруктозы в крови увеличивается при заболеваниях печени, ее наследственной недостаточности.

Алиментарная фруктоземия часто наступает (обычно у детей) после обильного приема фруктозы с пищей.

### ИЗУЧЕНИЕ УГЛЕВОДНОГО ОБМЕНА МЕТОДОМ НАГРУЗОК (ТЕСТЫ ТОЛЕРАНТНОСТИ К ГЛЮКОЗЕ — ТТГ)

Исследование углеводного обмена в клинике обычно начинается с анализа мочи на присутствие сахара и кетоновых тел, поскольку появление последних тесно связано с нарушениями углеводного обмена, кроме того, производится определение содержания сахара в крови.

Установлено, что у одного и того же человека в разные дни колебание сахара в крови натощак находится в пределах 0,55—0,83 ммоль/л. Более резкие отклонения наблюдаются при чрезмерно лабильном состоянии вегетативной нервной системы и должны рассматриваться как нарушения ее тонуса.

Изменения состояния вегетативной нервной системы могут отмечаться и у здоровых людей, особенно у юношей и детей, что свидетельствует о неустойчивости и повышенной возбудимости их нервной системы. Данное обстоятельство необходимо учитывать при подборе контрольной группы для сравнения нормального и патологического состояния углеводного обмена при том или другом заболевании.

Если в результате исследований обнаружено повышение концентрации сахара в крови и наличие сахара и кетоновых тел в моче, то этого оказывается достаточно для подтверждения диагноза диабета. Заболевания других внутренних органов не дают всей триады — гипергликемии, глюкозурии и наличия кетоновых тел, так как присутствие последних свидетельствует о грубых нарушениях не только углеводного, но и жирового обмена, что имеет место при заболеваниях поджелудочной железы.

В случаях, если результаты анализов мочи и крови оказываются нормальными, то более углубленное исследование углеводного обмена производят при помощи сахарной нагрузки.

#### Ход выполнения тестов толерантности к глюкозе

Проба с сахарной нагрузкой (однократная) заключается в следующем. Утром натощак у больного берут кровь из пальца для определения содержания сахара, после чего ему дают выпить заранее приготовленный раствор 100 или 50 г глюкозы (как правило, ограничиваются 50 г) в 200 мл теплой кипяченой воды или жидкого чая (из расчета 1 г глюкозы на 1 кг массы тела). Глюкоза может быть заменена сахаром. В этом случае расчет строят из соотношения 3 или 1,5 г сахара на 1 кг массы.

Время, в течение которого обследуемый пьет раствор, не долж-

но превышать 5 мин, после чего через 0,5 ч (иногда через 15 мин) у него берут из пальца кровь для установления содержания сахара. Эту процедуру повторяют через полчаса, затем через час и еще через час после взятия крови.

Что касается длительности проведения пробы, то ее ставят в течение 3 ч после приема сахара в том случае, если больному было дано 100 г глюкозы, и в течение 2,5 ч — если ему было дано 50 г. При последнем варианте между исследованиями крови на сахар надо делать получасовые промежутки на протяжении выполнения всей пробы.

Учитывая то обстоятельство, что из одного и того же укола иглой (пером) в палец можно осуществлять забор крови дважды (с промежутками через полчаса), мы рекомендуем следующую схему проведения однократной сахарной нагрузки (табл. 25).

Табл. 25. Данные для проведения однократной сахарной нагрузки

№ п. п. укола в палец	I		II		III	
	I	II	III	IV	V	VI
№ п. п. забора крови	I	II	III	IV	V	VI
Промежутки времени между заборами крови (ч)	0	+ 0,5	+ 0,5	+ 0,5	+ 0,5	+ 0,5
Общее время исследования	0	0,5	1,0	1,5	2,0	2,5
ч	0	0,5	1,0	1,5	2,0	2,5
мин	0	30	60	90	120	150
№ п. п. исследования (per os 50 г глюкозы)	I	II	III	IV	V	VI

Примечание. 4-кратный забор крови делать необязательно.

У детей сахарную нагрузку осуществляют так же, как и у взрослых, изменяя лишь дозы вводимой глюкозы. Так, детям в возрасте от 1,5 до 3 лет рекомендуется давать глюкозу исходя из соотношения 2 г/кг, от 3 до 12 лет — 1,75 г/кг, после 12 лет — 1,25 г/кг.

Детям достаточно 25 г глюкозы.

На основании полученных данных строят кривую, откладывая на вертикальной оси значения концентрации и глюкозы, а на горизонтальной — время (мин или ч).

Гликемические кривые у детей имеют такой же характер, что и у взрослых, с тем лишь отличием, что повышение концентрации сахара в крови у детей меньше.

Анализируя гликемические кривые, можно отметить, что у здорового человека уже через 15 мин после приема глюкозы наблюдается увеличение концентрации сахара в крови, которое достигает своего максимума к первому часу (в промежутке между 30-й и 60-й мин). После этого начинается уменьшение содержания сахара, которое ко второму часу наблюдения (120-я мин) или снижается до исходной цифры (до уровня глюкозы натощак), или не достигает его (остается повышенным), или же падает ниже исходной цифры. К 3-му ч во всех трех описанных вариантах уровень сахара в крови приходит к исходному уровню.

В конце проведения пробы у больного собирают мочу для исследования ее на наличие сахара. Установлено, что сахар в моче у здоровых людей при этой нагрузке приблизительно в половине случаев не выявляется вовсе либо это имеет место только в момент наибольшего повышения его содержания в крови, то есть между 30—60-й мин. Если в моче обнаруживается сахар, то, как правило, это свидетельствует о той или иной форме эндокринной глюкозурии. Из патологических состояний неэндокринной этиологии только тяжелое поражение печени может привести к появлению у больного глюкозы в моче при проведении данной пробы — и то в небольших количествах.

**Патофизиологические механизмы, обуславливающие изменение концентрации глюкозы крови после углеводной нагрузки**

1. Первый подъем уровня сахара после введения углеводов отражает силу рефлекторного раздражения симпатических нервов, возникающего при попадании глюкозы в пищеварительный канал. При этом в зависимости от тонуса симпатической нервной системы содержание сахара может повышаться (или понижаться) в известных пределах даже у здорового человека.

2. Дальнейшее увеличение концентрации сахара, как правило, связано с быстротой всасывания углеводов (определяемой, в частности, состоянием кишечной стенки), функцией печени и всех остальных периферических органов. У здорового человека цифра содержания сахара в крови через час после приема нагрузки на 50—75 % превышает уровень сахара крови натощак.

3. Исходящее колено гликемической кривой отражает продукцию инсулина и зависит от состояния парасимпатической нервной системы обследуемого, функции поджелудочной железы, печени и других органов. Этот отрезок гликемической кривой носит название гипогликемической фазы.

4. Последняя точка на гликемической кривой, определяемая через 2,5—3 ч, обусловлена состоянием равновесия всех участвующих систем организма. В норме она должна совпадать с цифрой содержания сахара в крови у обследуемого натощак.

Для трактовки гликемических кривых (складывающейся из оценки высоты подъема уровня сахара в крови и характера его падения) было предложено вычислять различные коэффициенты. Один из них — гликемический коэффициент Бодуэна, представляет собой отношение цифры наибольшего повышения содержания сахара в крови к исходной, то есть к цифре концентрации сахара натощак:

$$K = B/A,$$

где В — максимальный; А — исходный уровень сахара, К — частное от деления максимальной цифры концентрации сахара после нагрузки на исходную величину его концентрации натощак.

В норме коэффициент Бодуэна равен 1,3—1,4—1,5 (по Франку — 1,6).

Пример расчета. Первоначальное содержание сахара в крови больного составляет 5,55 ммоль/л (100 мг/100 мл), после нагрузки максимальная концентрация показателя оказалась равной 8,34 ммоль/л (150 мг/100 мл). Отсюда гликемический коэффициент составляет  $(8,34 : 5,55) = 1,5$ .



А. А. Покровский с сотр. приводят иной способ расчета коэффициента Бодуэна, предлагая выражать его в процентах:

$$\bar{K}_{\text{Бодуэна}} = \frac{(B - A) \cdot 100}{A},$$

где В — максимальный уровень, А — исходный уровень сахара.

У здорового человека коэффициент Бодуэна равен приблизительно 50 % (максимальное отклонение — до 75 %). Цифры выше 80 %, как правило, свидетельствуют о патологии углеводного обмена.

Следует находить и постгликемический коэффициент Рафальского. Он представляет собой частное от деления цифры содержания сахара в крови у обследуемого через 2 ч после нагрузки на исходную цифру (величину содержания сахара натощак).

$$K_{\text{Рафальского}} = C/A,$$

где С — самый низкий уровень сахара (определяемый через 2 ч); А — исходный уровень сахара.

У здорового человека коэффициент Рафальского ниже 1 или равен 1. Считают, что в норме этот постгликемический коэффициент составляет 0,9—1,04.

Пример расчета. Первоначальное (исходное) содержание сахара в крови больного — 5,55 ммоль/л (100 мг/100 мл), через 2 ч после нагрузки — 5,77 ммоль/л (104 мг/100 мл).

Постгликемический коэффициент равен  $5,77/5,55 = 1,04$ .

Увеличение коэффициента говорит о нарушении обмена углеводов. Однако нужно помнить, что не столько эти коэффициенты, сколько сам тип гликемической кривой в целом определяет нормальное или патологическое состояние углеводного обмена.

При проведении сахарной нагрузки следует иметь в виду те факторы, которые могут оказывать влияние на характер гликемической кривой.

Прежде всего возникает вопрос, имеет ли значение количество вводимой глюкозы. По данным большинства авторов, величина сахарной нагрузки существенно не отражается на характере гликемической кривой. Однако есть относительно этого мнения и возражения, указывающие на определенную зависимость увеличения концентрации сахара в крови от количества вводимых углеводов. По данным В. Н. Топарской, хотя количество глюкозы и влияет на повышение содержания сахара в крови, однако тип кривой при этом сохраняется прежним. Все же при динамических исследованиях желательно осуществлять сахарную нагрузку с одним и тем количеством глюкозы, чтобы можно было получать более сравнимые результаты.

При построении сахарной кривой нет необходимости исследовать кровь больного через каждые полчаса, так как характер линии на графике от этого в основном не изменяется, поскольку он обусловливается теми процессами, которые выявляют себя в названных четырех пунктах гликемической кривой.

Несомненно известная связь между качеством предшествующего питания и типом сахарной кривой, вернее высотой ее подъема. Показано, что при преимущественно углеводной диете у обследуемых наблюдаются гликемические линии на графике с наиболее низ-

ким подъемом (определяется этот предел через 1 ч после нагрузочной пробы), при преимущественно жировой диете — кривые с наиболее высоким подъемом, у обследуемых при белковом питании линии на графике поднимаются на среднюю по сравнению с первыми двумя высоту. Имеет значение в этом вопросе и длительность предшествующего голодания.

### *Клиническое значение исследования углеводного обмена методом нагрузок*

У больных с сахарным диабетом уровень сахара крови натощак бывает повышенным, нарастание гликемической кривой происходит медленнее, достигая через 60—150 мин значительной величины (ей соответствует концентрация рассматриваемого показателя, более чем в 1,8 раза превышающая исходное его значение). Гипогликемическая фаза спада за время проведения пробы обычно не выявляется (отсутствует). Нагрузка глюкозой у обследуемых сопровождается в большинстве случаев переходом сахара в мочу. Чем тяжелее заболевание, тем позже достигается максимум гликемии и тем он выше. Понижение кривой происходит очень медленно, чаще оно растягивается на 3—4 ч. Все порции мочи, как правило, содержат сахар. Подобный характер кривой можно объяснить нарушением выделения инсулина, что влечет за собой замедление отложения гликогена и торможение окисления глюкозы.

При массовом обследовании лиц с целью выявления ранних форм диабета следует отдавать предпочтение определению глюкозы в крови через 2 ч после принятия ими завтрака, содержащего 100,0 г углеводов. При обнаружении у обследуемых глюкозурий более рациональным является использование мочи, собранной у них в течение 2 ч после еды (содержание рациона — 100,0 г углеводов) с применением ТТГ.

Повреждение печени характеризуется быстрым увеличением концентрации глюкозы (нарастание гликемической кривой) в результате ослабления ассимиляционной способности печени. Однако максимальный подъем линии на графике не достигает такого уровня, как при диабете.

Заболеваниям щитовидной железы, связанным с ее гиперфункцией, свойственны гликемические кривые с более быстрым, чем в норме, подъемом, что, возможно, вызвано более интенсивным обменом веществ и возбуждением симпатического отдела вегетативной нервной системы.

При гиперфункции передней доли гипофиза (болезнь Иценко—Кушинга, акромегалия) и коры надпочечников, феохромоцитоме, поражении центральной и расстройстве вегетативной нервной системы, инфекционных заболеваниях (ревматизм, дифтерия, тиф, дизентерия, сепсис, бронхопневмония), а также при анемии и токсикозе (токсикоз беременных, тиреотоксикоз и другие) наблюдаются гликемические кривые со значительным подъемом и замедленным возвращением к норме. Возможно, это обусловлено нарушением гликогенообразовательной функции печени. Подобное явление отмечается и при панкреатитах. Гипергликемия может сопровождаться глюкозурией, особенно в тех случаях, когда содержание сахара в крови превышает почечный порог (при упомянутых выше патологических состояниях почечный порог глюкозы может и снижаться).

У больных с аденомой Лапгергансовых островков, гипотиреозом, болезнью Аддисона график, построенный по рассматриваемому показателю, характеризуется низким исходным уровнем кривой, низкой ее вершиной и высоким постгликемическим коэффициентом. Особенно типичны в этом плане кривые у больных с гиперинсулинизмом, энцефалитом и некоторыми другими состояниями. Глюкоза при указанных патологических состояниях может появляться в моче в результате ренальной глюкозурии.

Применение двукратной нагрузки глюкозой, нагрузки адреналином, инсулином, комбинированных нагрузок инсулином, глюкагоном, кортизоном, АКТГ и глюкозой позволяет обнаружить у обследуемых скрытые формы сахарного диабета, нарушение функции печени и эндокринных желез. Дача крахмала обуславливает такую же картину кривой, как и нагрузка глюкозой, но несколько более растянутую во времени.

Двукратная нагрузка глюкозой используется в основном для диагностики скрыто протекающего сахарного диабета.

### Проба с двойной нагрузкой (по Штаубу — Трауготту)

**Принцип.** Если здоровому человеку в период падения уровня сахара крови, то есть в момент, когда продукция собственного инсулина особенно высока, повторно ввести прежнее (употребленное накануне) количество сахара, то новое повышение его концентрации в крови окажется значительно меньше первого подъема или будет вообще отсутствовать. Это явление называется положительным эффектом Штауба — Трауготта. Отсутствие повышения содержания сахара зависит от интенсивности продукции инсулина поджелудочной железой. У больных сахарным диабетом, у которых островки Лангерганса поджелудочной железы выделяют лишь незначительное количество инсулина, после второго введения сахара наблюдается столь же выраженное или даже еще более сильное возрастание его концентрации в крови, чем после первой нагрузки углеводами. Это отрицательный эффект Штауба — Трауготта.

В 8 ч утра натощак у больного определяют содержание сахара в крови. Сразу же после этого ему дают 50 г (страдающему сахарным диабетом — 20—30 г) глюкозы, растворенной в 200 мл теплой воды.

Определение сахара в крови проводят через 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 3,0, а иногда — 4—5 ч. Через 1,5 ч после первого приема сахара, то есть в 9 ч 30 мин, больной получает еще 50 г (или 20—30 г) глюкозы в 200 мл теплой воды или чая.

В некоторых случаях ко времени взятия крови у обследуемого берут мочу для установления в ней содержания сахара.

В ходе проведения пробы обследуемый не должен принимать пищи.

### Проба Экстона — Розе

**Ход определения.** У испытуемого натощак определяют сахар в крови и дают выпить 50 г глюкозы, растворенной в 350 мл воды. Через 30 мин вторично устанавливают уровень сахара и вновь дают

принять 50 г глюкозы в растворе. Дальнейшие этапы пробы ничем не отличаются от таковых при выполнении однократной сахарной нагрузки.

*Клиническое значение тестов толерантности  
к глюкозе с применением  
двойных нагрузочных проб*

Эти пробы имеют особую ценность для выявления скрытых форм сахарного диабета, диагностика которых облегчается установлением отрицательного эффекта Штауба—Трауготта, то есть обнаружением увеличения содержания сахара в крови после второго приема большим глюкозы. Отрицательный эффект Штауба—Трауготта может наблюдаться и при некоторых заболеваниях центральной нервной системы, печени, а также при гипертиреозах, острых инфекциях, тучности.

Для диагностики нарушения обмена веществ у больных с диабетом важно наличие следующих критериев: 1) чрезвычайно высокая вершина сахарной кривой; 2) оставшийся повышенным уровень сахара в крови через 3 ч после приема большим порции глюкозы, то есть отсутствие возврата уровня сахара крови к величинам, наблюдаемым у него натошак.

При проведении сахарных нагрузок следует помнить, что количество принятого внутрь сахара в довольно широких пределах — от 0,5 до 2,0 г на 1 кг массы тела — не играет решающей роли в отношении высоты и длительности гипергликемии. Однако на характере графических линий могут сказываться: а) замедленное опорожнение желудка, снижение кислотности желудочного сока и вид предшествующего питания. Целесообразно в течение трех дней до проведения нагрузки назначать больному пищу, содержащую достаточное количество углеводов, но не слишком богатую белками и жирами; б) никотин, кофеин, физические и психические нагрузки; в) состояние погоды.

## Глава VIII

### МЕТОДЫ ИЗУЧЕНИЯ УГЛЕВОДСОДЕРЖАЩИХ БЕЛКОВ И ИХ КОМПОНЕНТОВ В КРОВИ

Углеводсодержащие белки — обширный класс соединений, единая классификация которых до сих пор не установлена. А. Ц. Анасашвили (1968) подразделяет углеводсодержащие белки на две большие группы: мукопротеиды и гликопротеиды.

Мукопротеиды представляют собой белки, простетическими группами которых являются гликозаминогликаны (амниополисахариды). Состоят гликозаминогликаны из аминсахаридов, гексуроновых и серной кислот. Эти углеводсодержащие соединения имеют сильно выраженные кислотные свойства благодаря наличию большого числа карбоксильных групп и остатков серной кислоты. К числу гликозаминогликанов, входящих в данную группу углеводсодержащих белков,

принадлежат гиалуроновая кислота, хондроитинсульфаты А, В, С, D, хитрансульфат, гепарин, гепарансульфат.

Связь между белками и гликозаминогликанами в соединениях рассматриваемой группы непрочна, чем, вероятно, и обусловлено их участие в регуляции тканевой проницаемости.

Гликопротеиды являются белками, прочно соединенными с аминокислотами, не содержащими урановых кислот и сульфатов. В состав их простетической группы входят гексозы, гексозамины, фукозы и сialовые кислоты. Наличие последних придает гликопротеидам слабо выраженные кислотные свойства. Наиболее известные представители веществ этой группы — различные ферменты (холинэстераза, церулоплазмин), гормоны (гонадотропин, эритропоэтин), группоспецифические субстанции крови, протромбин, фибриноген, гамма-глобулины, уромукопротеиды, плевомукопротеиды, гаптоглобин, трансферрин и другие.

В настоящее время считается вполне обоснованным выделение из этой группы веществ подгруппы серогликоидов (серомукоидов) для обозначения гликопротеидных комплексов, растворимых в хлорной кислоте.

В клинической практике наиболее распространено определение углеводсодержащих белков сыворотки крови по одному из входящих в их состав компонентов (гексозам, гексозаминам, фукозе, сialовым кислотам) или же по способности сialовых кислот, фукозы и некоторых других углеводов давать реакцию йодная кислота — реактив Шиффа.

Получили известность также методы исследования углеводнобелковых комплексов по их белковой части (турбидиметрические, нефелометрические, по тирозину белка и другие).

Все перечисленные группы методов позволяют иметь косвенное представление о содержании гликопротеидов в сыворотке крови. Из них наиболее приемлемым для клинико-диагностических лабораторий следует считать определение гексоз, связанных с белками, методами с применением триптофана и орцина. Эти способы хорошо зарекомендовали себя на практике. Для исследования содержания гексозаминна (глюкозаминна) необходимы дефицитные реактивы (ацетилацетон, стандартный раствор гексозаминна) и большое количество сыворотки (5,0 мл). Метод определения фукозы прост, однако требует использования спектрофотометра.

На основании изложенного для определения гликопротеидов в сыворотке крови мы рекомендуем два метода: орциновый (унифицированный) и способ с применением триптофана.

## ИССЛЕДОВАНИЕ ОБЩЕГО КОЛИЧЕСТВА ГЛИКОПРОТЕИДОВ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ТРИПТОФАНА

Методы определения общего содержания гликопротеидов сыворотки крови по реакции с триптофаном были разработаны Шепардом, Эверетом (1937), Зейбертом с соавт. (1948), Т. П. Соловьевой (1961) и другими исследователями. Они отличаются многоэтапностью и несколько большей, чем аналогичные другие способы анализа, трудоемкостью. Вместе с тем благодаря их высокой чувствительности и широкой доступности применяемых реагентов эти методы могут быть ре-

комендованы к внедрению при невозможности освоить в лаборатории (например, из-за отсутствия необходимых реактивов) унифицированный способ определения гексоз, связанных с белками. В основу предлагаемого метода положен способ Т. П. Соловьевой.

### Метод определения содержания гексоз, связанных с белками, по реакции с триптофаном

**Принцип.** Гликопротеиды сыворотки крови при нагревании с концентрированной  $H_2SO_4$  подвергаются гидролитическому расщеплению, продукты которого в присутствии триптофана дают окрашенные в синий цвет соединения. Реакцию проводят при участии борной кислоты, необходимой для увеличения интенсивности фиолетовой окраски раствора и подавления неспецифического его окрашивания, которое может развиваться в процессе реакции.

**Реактивы.** 1. Абсолютный этиловый спирт (см. «Определение холестерина по Abell и Ильку»).

2. Борно-серный раствор, состоящий из 770 мл концентрированной х. ч.  $H_2SO_4$ , 230 мл дистиллированной воды и 50 г борной кислоты.

3. Раствор триптофана. 1 г триптофана растворяют в 100 мл дистиллированной воды при нагревании смеси до начала кипения (предпочтительнее использовать L-триптофан, а не DL-форму, так как L-триптофан лучше растворим в воде. К тому же реактив L-триптофана остается более стабильным при хранении на холоде).

4. Эталонный раствор маннозы — 0,1 г/100 мл. В присутствии нескольких капель толуола его можно содержать в холодильнике несколько часов.

**Ход определения.** Всю реакцию проводят в одной пробирке. Аппарат складывается из нескольких этапов: а) осаждение гликопротеидов и белков. На дно пробирки помещают 0,05 мл сыворотки, прибавляют 10 мл абсолютного спирта и содержимое пробирки взбалтывают, после чего пробу оставляют при комнатной температуре на 15 мин. Затем производят ее центрифугирование при 2500 об/мин в течение 10 мин, спирт удаляют осторожным сливанием, стараясь не потерять при этом ни частицы осадка;

б) гидролиз и цветная реакция. Осадок растворяют в 1 мл дистиллированной воды и быстро приливают в пробирку 7 мл борно-серного раствора, после чего пробирку немедленно погружают в ледяную воду (или охлаждают водопроводной водой). Через 5 мин в нее прибавляют 1 мл раствора триптофана.

Чтобы избежать появления побочного желтого цвета реактива, важно тотчас после приливания 1 мл раствора триптофана перемешать жидкости. Для этого рекомендуют пропустить несколько пузырьков воздуха у дна пробирки (через капиллярную трубочку).

После охлаждения смеси в ледяной воде пробирки переносят в кипящую водяную баню точно на 20 мин, причем через 10 мин необходимо еще раз перемешать реактивы продуванием нескольких пузырьков воздуха у дна пробирки. Сразу после извлечения пробирки из кипящей водяной бани ее помещают на 5 мин в ледяную (или холодную водопроводную) воду, а затем на 30 мин оставляют при комнатной температуре.

Параллельно опытной ставят контрольную пробу путем прибавле-

ния к 1 мл дистиллированной воды 7 мл борно-серного раствора. В дальнейшем ход определения тот же, что и при проведении опытных проб;

в) фотометрирование. Оптическую плотность измеряют на ФЭКе с зеленым светофильтром (максимум абсорбции составляет 520 нм) в кювете с толщиной слоя 5 мм. Из величины экстинкции опытной пробы вычитают величину оптической плотности контрольной пробы. Полученные значения экстинкций переводят по калибровочной кривой в соответствующие количества маннозы.

Для получения данных к построению калибровочной кривой готовят раствор маннозы растворением 100 мг ее в 100 мл дистиллированной воды. 1 мл такого раствора содержит 1 мг или 1000 мкг маннозы, а 2 мл — 2000 мкг.

2 мл раствора маннозы доводят дистиллированной водой до объема 20 мл. 10 мл этого рабочего раствора содержит 1000 мкг маннозы, а 1 мл — 100 мкг.

К 1 мл каждого рабочего разведения стандартного раствора добавляют 7 мл борно-серного реактива, 1 мл раствора триптофана, смесь прогревают 20 мин в кипящей водяной бане, после чего пробу колориметрируют. Ответ выражают в г/л.

Концентрацию маннозы рассчитывают по формуле:

$$z \cdot 0,02 = a \text{ г/л,}$$

где  $z$  — количество маннозы (мкг), найденное по калибровочной кривой; 0,02 — коэффициент пересчета показателя калибровочной кривой в концентрацию маннозы (г/л).

Поскольку для определения используют 0,05 мл сыворотки, а ответ дают в г/л, для расчета содержания гликопротеидов в 1000 мл сыворотки вычисленную по калибровочной кривой величину умножают на  $2 \cdot 10^4$  и делят на  $1 \cdot 10^6$  (для перевода мкг в г). Полученный коэффициент составляет 0,02.

Например:  $50 \text{ мкг} \cdot 0,02 = 1 \text{ г/л.}$   
 $70 \text{ мкг} \cdot 0,02 = 1,4 \text{ г/л.}$

Примечания: Возможные причины ошибок: 1.  $\text{H}_2\text{SO}_4$  должна быть чистой. Нельзя использовать серную кислоту, дающую при нагревании с триптофаном желтое окрашивание.

2. Растворы триптофана годны к работе в течение 8—10 дней. Цвет, появляющийся от применения старых растворов, слабее окраски, возникающей при использовании свежих реактивов, особенно при высоком содержании гликопротеидов в крови обследуемого.

При работе с DL-триптофаном раствор должен употребляться сразу же после его приготовления.

Нормальное содержание гликопротеидов в сыворотке крови колеблется от 1,2 до 1,6 г/л (в среднем 1,4 г/л).

### Определение гексоз в сыворотке крови орциновым методом после гидролиза серной кислотой

**Принцип.** Гликопротеиды, содержащие гексозы, выделяют из сыворотки крови  $96^\circ$  этанолом. Освобожденные в результате гидролиза гексозы, взаимодействуя с орциновым реактивом, окрашивают раствор в розовый цвет, интенсивность окраски пропорциональна содержанию гексоз.



Реактивы. 1. 96° этиловый спирт.

2. 0,1 н раствор едкого натра.

3. Концентрированная серная кислота (для пробы Савалья).

4. Орциновый реактив. Смешивают 7,5 объемных частей реактива серной кислоты (60 мл концентрированной серной кислоты и 40 мл воды) с 1 объемом раствора орцина (1,6 г кристаллического орцина в 100 мл воды). Смесь готовят перед употреблением. Реактив кислоты стоек, раствор орцина можно хранить в темноте 1 мес.

5. Стандартный раствор гексоз (1 г/л), состоящий из галактозы и маннозы. 50 мг галактозы и 50 мг маннозы растворяют в мерной колбе на 100 мл в небольшом количестве дистиллированной воды и доводят объем водой до метки.

Ход определения. К 0,1 мл сыворотки добавляют 5,0 мл 96° этанола, содержимое пробирок перемешивают и центрифугируют в течение 15 мин. Затем центрифугат сливают, пробирки опрокидывают на фильтровальную бумагу (30—60 с), повторно растворяют осадок в 5 мл 96° этилового спирта, смесь центрифугируют, надосадочную жидкость вновь сливают. Белковый осадок растворяют в 1 мл 0,1 н раствора едкого натра, доливают 8,5 мл орцинового реактива, содержимое пробирок хорошо перемешивают путем их переворачивания и помещают в водяную баню при +80°С точно на 15 мин. Следует избегать попадания на пробирки дневного света. Затем пробирки охлаждают в воде со льдом (или в проточной воде из водопроводного крана) в течение 5 мин, пробы колориметрируют на ФЭКе с зеленым светофильтром (при длине волны 500—560 нм) в кювете с толщиной слоя 10 мм. Результаты сравнивают с аналогичными данными контрольной пробы.

Контрольную пробу готовят добавлением в 1 мл 0,1 н раствора едкого натра 8,5 мл орцинового реактива. Далее ее обрабатывают так же, как опытную.

Расчет производят по калибровочному графику или по формуле:

$$C_x = E_{\text{оп.}} / E_{\text{ст.}} \cdot 1 \text{ (г/л)}.$$

Для построения калибровочного графика из основного стандартного раствора делают разведения (табл. 26). Стандартные пробы обрабатывают так же, как опытные. Калибровочную кривую получают, руководствуясь общеизвестными принципами.

Табл. 26. Данные к построению калибровочной кривой для определения гликопротеидов по содержанию гексоз

№ пробирок	Стандартный раствор галактозы и маннозы (мг)	0,1 н раствор едкого натра (мл)	Орциновый реактив (мл)	Концентрация гексоз (мг/100 мл, г/л)	
1	0,05	0,95	8,5	50	0,5
2	0,10	0,90	8,5	100	1,0
3	0,15	0,85	8,5	150	1,5
4	0,20	0,80	8,5	200	2,0
5	0,25	0,75	8,5	250	2,5
6	0,30	0,70	8,5	300	3,0

При расчете данных по формуле пользуются стандартным раствором 2 с концентрацией 1 г/л.

**Примечание.** Для получения хорошо воспроизводимых результатов необходимо точное соблюдение времени и условий гидролиза белков. Например, температура в водяной бане должна быть строго постоянной в течение всего периода прогрева пробы. Кроме того, определенное значение имеет качество серной кислоты и орцина. Последний очищают перекристаллизацией. Для этого орцин расплавляют, нагревая на водяной бане до  $+60-65^{\circ}\text{C}$ . При этом вода, присутствующая в препарате, выпаривается. Остаток перекристаллизовывают из бензола с добавлением активированного угля.

В связи с изложенным более целесообразно осуществлять расчет не по калибровочному графику, а по формуле.

Концентрация гексоз, связанных с белком, составляет в сыворотке крови 1,05—1,15 г/л.

Для разделения гликопротеидов сыворотки крови мы применяли метод диск-электрофореза в полиакриламидном геле. Описание методики диск-электрофоретического фракционирования гликопротеидов приведено в подразделах («Диск-электрофорез — выявление гликопротеидов в столбиках ПЛАГ», «Методика диск-электрофоретического фракционирования белков сыворотки крови»). Учет результатов производят аналогично таковому для белковых фракций сыворотки крови (см. подраздел «Методика диск-электрофоретического фракционирования белков сыворотки крови»).

#### ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОБЩЕГО КОЛИЧЕСТВА ГЕКСОЗ, ГЕКСОЗ ГЛИКОПРОТЕИДОВ И ГЛИКОЗАМИНОГЛИКАНОВ СЫВОРОТКИ КРОВИ

Исследование в сыворотке крови общего количества углеводно-белковых соединений не может служить основанием для суждения о выраженности деструктивных и дезорганизационных процессов в соединительной ткани. Увеличение уровня общих гликопротеидов в большей степени свидетельствует о развитии репаративных процессов.

Считают, что индикатором деструктивных процессов могут служить лишь изменения гликозаминогликанов, составляющих основу соединительной ткани.

И. В. Неверов, Н. И. Титоренко (1979) разработали способ фракционного определения гексоз, который позволяет получать данные о содержании общего количества гексоз в сыворотке крови, а также гексоз, входящих в состав гликозаминогликанов (Г-ГАГ), и гексоз гликопротеидов (Г-ГП).

**Принцип.** Метод основан на раздельном исследовании гексоз гликозаминогликанов, осаждаемых цетилпиридинхлоридом, и гексоз, связанных с белком, по реакции с орциновым реактивом.

**Реактивы.** 1. Орциновый реактив (его приготовление описано в предыдущем, унифицированном методе).

2. Раствор цетилпиридинхлорида (ЦПХ). 1 г реактива растворяют в 100 мл подогретой дистиллированной воды.

3. Этиловый спирт 96°.

4. Раствор NaOH — 0,1 г/100 мл.

**Ход определения.** В две пробирки помещают по 0,1 мл сыворотки крови. Первую пробирку используют для установления содержания гексоз, связанных с белками, унифицированным методом (см. предыдущую методику). Вторую пробирку применяют для определения гек-

соз гликозаминогликанов. Для этого к 0,1 мл сыворотки добавляют 0,1 мл раствора ЦПХ, а затем — 0,8 мл дистиллированной воды. Пробы тщательно перемешивают и центрифугируют 15 мин при 3000 об/мин, затем надосадочную жидкость сливают. Осадок дважды промывают раствором ЦПХ, центрифугируя и сливая надосадочную жидкость. Пробирки опрокидывают на фильтровальную бумагу, оставляя их в таком положении на 30—60 с, и осадок дополняют 1,0 мл раствора NaOH, выдерживая пробы до полного растворения. К содержанию пробирки доливают 8,5 мл орцинового реактива, и после тщательного перемешивания все пробы помещают в водяную баню при температуре +80 °С на 15 мин. Пробирки охлаждают в проточной воде и фотометрируют при условиях, описанных в предыдущем методе.

Контрольной является проба, содержащая 1 мл раствора едкого натра и 8,5 мл орцинового реактива.

Рассчитывают результаты по калибровочному графику (см. его построение в предыдущем методе). Для более точного установления Г-ГАГ желательно получать калибровочную кривую, пользуясь данными колориметрирования основного стандартного раствора, разбавленного в 10 раз (0,1 г/л).

Фракцию Г-ГП находят по разнице показателей общих гексоз и Г-ГАГ.

В норме при общем содержании гексоз, связанных с белком ( $0,72 \pm 0,14$  г/л), на долю Г-ГАГ приходится  $0,06 \pm 0,03$  г/л, Г-ГП —  $0,65 \pm 0,12$  г/л. Индекс отношения Г-ГАГ к Г-ГП равен 0,1.

*Клинико-диагностическое значение определения  
общего количества гексоз,  
гексоз гликопротеидов и гликозаминогликанов  
в сыворотке крови*

Количество гликопротеидов возрастает при туберкулезе, плеврите, пневмонии, остром ревматизме, гломерулонефрите, диабете, инфаркте миокарда, подагре, раке, а также при остром и хроническом лейкозе, миеломе, лимфосаркоме и некоторых других заболеваниях.

Исследование в динамике позволяет судить о течении болезни и терапевтическом эффекте.

Использование методики определения фракционного содержания гексоз показало, что у больных крупноочаговым инфарктом миокарда содержание в сыворотке крови гексоз, связанных с белком, уже с первых дней болезни обусловлено увеличением фракции Г-ГАГ, отражающей преимущественно деструктивные изменения в миокарде. Так, в первые дни заболевания индекс Г-ГАГ/Г-ГП возрастает в 6—7 раз, оставаясь повышенным (вдвое по сравнению с нормой) и конце четвертой недели заболевания.

У больных стенокардией в отличие от больных инфарктом миокарда после болевого приступа наблюдается кратковременное увеличение гексоз, связанных с белком. Возрастание уровня Г-ГАГ очень незначительно и в течение 2—3 дней возвращается к исходному.

Таким образом, фракционный способ определения уровня гексоз сыворотки крови дает возможность дифференцировать метаболические сдвиги, обусловленные деструктивными и дезорганизационными процессами в соединительнотканых структурах, от изменений, вы-

ванных реакцией организма на очаг повреждения. При этом появляется возможность следить за динамикой инфаркта миокарда, устанавливать начало репаративных процессов в миокарде.

## ИССЛЕДОВАНИЕ СЕРОГЛИКОИДОВ В КРОВИ

Под этим названием объединена группа гликопротеидов, которые не осаждаются хлорной, трихлоруксусной и сульфосалициловой кислотами. Указанное свойство серогликоидов и положено в основу их количественного определения.

Поскольку фракция серогликоидов, составляя около 1 % от содержания белка сыворотки крови, включает в себе 12 % от общего содержания углеводов плазмы, часто выявляются однотипные изменения в спектрах гликопротеидов и серогликоидов (в последнем случае они могут быть более выраженными).

Для исследования содержания этой фракции гликопротеидов в сыворотке крови в качестве унифицированного предложен орциновый метод установления концентрации серогликоидов. Однако о количестве серогликоидов можно судить не только по углеводному, но и белковому компонентам. С этой целью проводят реакцию на общий белок выделенных серогликоидов (биуретовую, с реактивом Фоллина) или на отдельные его компоненты (тирозин и другие). В качестве стандартного раствора используют белок казеин или выделенный по методике М. А. Осадчук хлорнорастворимый мукопротеин. Из других методов привлекает своей простотой нефелометрический способ определения суммарных серогликоидов в сыворотке крови по Хуэргу, который, правда, по точности исследования уступает орциновому методу установления концентрации гексоз (содержание последних в серогликоидах отличается наибольшим постоянством).

### Определение серогликоидов в сыворотке крови по содержанию в них гексоз

Принцип метода основан на выделении серогликоидов фосфорновольфрамовой кислотой из хлорного фильтрата сыворотки крови и количественном определении в них гексоз орциновым методом (по описанному унифицированному способу).

Реактивы те же, что и в орциновом методе исследования гексоз, связанных с белком.

Дополнительно используют: 1. Раствор хлорной кислоты ( $\text{HClO}_4$ ) — 6 г / 100 мл.

Способ расчета количества концентрированной хлорной кислоты, необходимого для приготовления раствора любой другой (меньшей) концентрации, приведен при описании турбидиметрического метода установления содержания серогликоидов в сыворотке крови (см. следующую методику).

2. Раствор фосфорновольфрамовой кислоты (5 г/100 мл) на 2 н растворе соляной кислоты.

Ход определения. В центрифужную пробирку вносят 1,0 мл сыворотки крови и 1,0 мл дистиллированной воды, после перемешивания в нее приливают 2,0 мл раствора хлорной кислоты (по стенке пробирки), смесь взбалтывают стеклянной палочкой. Через 10 мин пробу центрифугируют на протяжении 10 мин при 3000—4000 об/мин.

Надосадочную жидкость полностью сливают в другую центрифужную пробирку, в которую добавляют 2,0 мл раствора фосфорновольфрамовой кислоты. После встряхивания осадок серогликоидов отделяют центрифугированием (в течение 5 мин). Надосадочную жидкость убирают, к осадку доливают 2,0 мл 96° этилового спирта, содержащее пробирки хорошо взбалтывают и центрифугируют 10 мин. Центрифугат вновь сливают, осадок растворяют в 1,0 мл 0,1 н едкого натра, добавляют 8,5 мл орцинового реактива, все содержимое перемешивают и ставят пробирку в водяную баню при +80°С точно на 15 мин. Нужно избегать попадания прямого дневного света на пробирку. Затем ее охлаждают в течение 5 мин в холодной водопроводной воде (или в воде со льдом), после чего измеряют экстинкцию пробы на ФЭКе с зеленым светофильтром (длина волны 500—560 нм) в кювете с толщиной слоя 10 мм. Результаты сравнивают с аналогичными данными контрольной пробы.

Для приготовления контрольной пробы к 1,0 мл 0,1 н едкого натра добавляют 8,5 мл орцинового реактива, раствор перемешивают и далее обрабатывают так же, как опытную пробу.

Расчет производят по калибровочному графику или по формуле.

Для получения данных к построению калибровочного графика из основного раствора делают разведения (табл. 27). Стандартные пробы обрабатывают так же, как опытные.

Табл. 27. Данные к построению калибровочного графика для определения серогликоидов по содержанию гексоз

№ пробирок	Стандартный раствор галактозы и маннозы (мл)	0,1 н раствор едкого натра (мл)	Орциновый реактив (мл)	Концентрация гексоз (мг/100 мл, г/л)	
1	0,10	0,90	8,5	10	0,1
2	0,20	0,80	8,5	20	0,2
3	0,25	0,75	8,5	25	0,25
4	0,30	0,70	8,5	30	0,3
5	0,40	0,60	8,5	40	0,4
6	0,50	0,50	8,5	50	0,5

При расчете по формуле:  $C_x = \frac{E_{оп.}}{E_{ст.}} \cdot 0,2 = a$  (г/л) используют стандартный раствор 2 (0,2—фактор пересчета концентрации гексоз в г/л).

Концентрация серогликоида в крови, определенная по гексозам, составляет в норме 0,22—0,28 г/л.

#### Турбидиметрический метод определения серогликоидов в сыворотке крови

Принцип. При добавлении к сыворотке крови раствора хлорной кислоты белки выпадают в осадок, а серогликоиды остаются в реактиве, из которого они могут быть выделены путем их осаждения фос-

форновольфрамовой кислотой. По степени помутнения раствора и судят о содержании серогликондов в исследуемом материале.

**Реактивы.** 1. Раствор хлористого натрия — 0,85 г/100 мл.

2. 1,8 моль/л раствора хлорной кислоты ( $\text{HClO}_4$ ). Указанная концентрация хлорной кислоты соответствует содержанию 180,84 г ее в 1 л или 18,084 г в 100 мл раствора. На основании этого рассуждения и строится расчет.

Допустим, что концентрация хлорной кислоты — 57,81 г/100 мл. Это значит, что в 100 г раствора содержится 57,81 г чистой кислоты. Решаем пропорцию:

$$57,81—100; 18,084—x, \text{ тогда } x = (18,084 \cdot 100) / 57,81 = 31,28 \text{ (г)},$$

то есть 18,084 г чистой кислоты находится в 31,28 г ее раствора. Чтобы перевести весовые единицы массы в соответствующие значения объема, нужно 31,28 г разделить на плотность кислоты (массу 1 мл раствора), которую находят по соответствующей таблице справочника или с помощью ареометра. В данном случае плотность раствора равна 1,51 кг/л.  $31,28 / 1,51 = 20,7$  (мл).

Итак, для приготовления 1,8 моль/л раствора хлорной кислоты из раствора с концентрацией 57,81 г/100 мл необходимо взять 20,7 мл  $\text{HClO}_4$  и довести объем смеси дистиллированной водой до 100 мл.

3. Раствор фосфорновольфрамовой кислоты (5 г/100 мл) на 2 и соляной кислоте.

**Ход определения.** 0,5 мл сыворотки смешивают с 4,5 мл физиологического раствора (реактив 1) и добавляют по каплям 2,5 мл раствора  $\text{HClO}_4$ , содержаемое пробирки хорошо перемешивают стеклянной палочкой, оставляют на 10 мин при комнатной температуре, центрифугируют 15 мин при 2000—2500 об/мин или при отсутствии надлежащей центрифуги фильтруют через обеззоленный фильтр (сняя полоска).

Отмеривают 5,0 мл фильтрата (центрифугата), соединяют с 1,0 мл фосфорновольфрамовой кислоты и через 15 мин измеряют мутность пробы на ФЭКе в кювете с толщиной слоя 10 мм, руководствуясь в выборе светофильтра (обычно это красный фильтр) инструкцией к прибору. Результаты сравнивают с аналогичными данными контрольной пробы, которую готовят смешиванием 3,3 мл физиологического раствора с 1,7 мл раствора  $\text{HClO}_4$  и с 1,0 мл фосфорновольфрамовой кислоты. Результаты выражают в условных единицах — значениях оптической плотности.

Норма содержания серогликондов в сыворотке крови — 0,130 — 0,200 усл. ед.

**Примечание.** Ваймер, Квинн (1958), изучив влияние на депротенизацию белков сыворотки крови (при определении серогликондов) хлорной кислоты различной концентрации, нашли, что наилучшим эффектом обладает 0,6 н раствор  $\text{HClO}_4$ .

Кроме того, установлено, что фильтровальная бумага адсорбирует от 6,5 до 19% сывороточных серогликондов (в зависимости от сорта бумаги). Это делает необходимым замену фильтрации при определении сывороточных серогликондов центрифугированием.

## *Клинико-диагностическое значение определения серогликоидов и фракций гликопротеидов в сыворотке крови*

В практике клинической лабораторной диагностики большое место занимает исследование серогликоидов сыворотки крови. Увеличение общего содержания серогликоидов наблюдается при всех воспалительных и некробактериальных процессах: у больных с инфарктом миокарда, желтушным синдромом (особенно на почве новообразования), злокачественной опухоли, обостренном хроническом холецистите, с деструктивной формой туберкулеза легких, ревматизмом, мозговым инсультом и другими видами патологических состояний. Снижается оно при инфекционном гепатите, гепатоцеллюлярной дистрофии, рассеянном склерозе.

При некоторых заболеваниях обнаруживается различная выраженность количественных изменений отдельных компонентов фракций серогликоидов. При этом могут нарушаться как соотношение между отдельными углеводными компонентами серогликоидов и их белковой частью, так и спектр белковых компонентов серогликоидов.

С помощью хроматографии на ДЭАЭ-целлюлозе, электрофореза в полиакриламидном геле и на других носителях выявляется от 10 до 15 фракций серогликоидов, в том числе: 1) преальбумин, 2) хлорнорастворимый альбумин, 3) орозомукоид ( $\alpha_1$ -кислый гликопротеин), 4)  $\alpha_1$ -антитрипсин, 5)  $\alpha_1$ -х-гликопротеин, 6)  $\alpha_2$ -кислый гликопротеин, 7) Gc (группоспецифические)-компоненты, 8) гаптоглобин, 9)  $\alpha$ -HS-гликопротеин, 10) Zn- $\alpha_2$ -гликопротеин, 11)  $\beta_1$ -гликопротеин, 12)  $\beta_1$ -гликопротеин, не содержащий сиаловой кислоты, 13)  $\beta_2$ -гликопротеин, 14) эритропоэтин, 15) гонадотропный гормон хориона.

У больных с опухолями отмечается увеличение содержания практически всех химических компонентов серомукоида. Однако в то время как коэффициенты тирозин / гексозы и тирозин / фукоза значительно возрастали в динамике опухолевого роста, коэффициент тирозин / сиаловые кислоты не изменялся. При экспериментальном воспалении также наблюдалось увеличение всех компонентов серогликоидов, но если содержание тирозина повышалось так же, как и при опухолях, то содержание гексоз в серомукоиде, а также коэффициент тирозин / фукоза были значительно снижены.

В 1978 г. Т. Ф. Пирогова, Г. И. Эпшина, Л. Ф. Воробьева предложили способ дифференциальной диагностики опухолей головного мозга и церебральных арахноидитов по определению количества белка и сиаловых кислот серогликоидов. Оказалось, что содержание сиаловых кислот выше 0,37 ммоль/л и белка выше 1,1 г/л, а также показатель сиаловые кислоты / белок ниже 12,5 % (достаточно комбинации любых из двух перечисленных признаков) свидетельствуют в пользу диагноза опухоли мозга. Отсутствие перечисленных критериев расценивается как признаки церебрального арахноидита.

Показано, что при крупноочаговом инфаркте миокарда, наряду с увеличением концентрации суммарных серогликоидов в 1,5—3,0 раза со 2—3-го дня от начала заболевания, имеет место изменение фракционного соотношения между перечисленными компонентами, разделяемыми методом электрофореза в агарозе и полиакриламидном геле. Наиболее значительным оказывается возрастание фракции орозомукоида и гаптоглобина. Нормализация же фракционного соотношения серогликоидов наступает позже, чем нормализация содержания их суммарного количества.



В остром периоде мозгового инсульта увеличение содержания общих серогликоидов сопровождается резким возрастанием уровня орозомукоида, гаптоглобина при незначительном изменении выраженности фракций преальбумина, хлорнорастворимого альбумина и  $\beta_1$ -глобулина.

В случае гепатоцеребральной дистрофии и рассеянного склероза снижение общей концентрации серогликоидов соответствует преимущественному уменьшению содержания хлорнорастворимого альбумина, гаптоглобина и  $\beta_1$ -гликопротеида. Однако если при гепатоцеллюлярной дистрофии отмечается значительное снижение содержания орозомукоида, то при рассеянном склерозе уровень этой фракции остается в прежнем состоянии.

У больных с ревмокардитом при незначительном изменении содержания общих серогликоидов наблюдается заметное увеличение фракции орозомукоида и  $\alpha_2$ -гликопротеида.

При инфаркте миокарда повышение уровня серогликоидов происходит за счет возрастания уровня всех фракций, прежде всего за счет увеличения содержания орозомукоида (В. П. Тихонов, 1972). При ревматизме и инфектартрите можно наблюдать появление новых белковых фракций. При инфектартрите превалирует возрастание концентрации макроглобулина, располагающегося в катодной области. Ценным диагностическим признаком воспалительного процесса при нормальном общем содержании серогликоидов является увеличение выраженности слабо представленной у здоровых людей фракции, следующей за орозомукоидом.

Для резкого нарушения функции печени характерно снижение интенсивности фракции преальбумина; в связи с этим фракционирование серогликоидов считается целесообразным для выявления воспалительного процесса у больных хроническим гепатитом и циррозом печени.

Полагают, что наиболее реактивные компоненты серогликоидов — это орозомукоид и гаптоглобин.

Показано, что под влиянием стрессового раздражителя происходит увеличение содержания фракции серогликоидов. Л. Н. Черкащенко установил, что решающим фактором в механизме гипергликопротеидемии является активация симпатно-адреналовой системы.

Исследование закономерностей изменения белков, в том числе серогликоидов и их компонентов, при различных заболеваниях в острый период раскрывает новые аспекты механизмов возникновения диспротеинемий и имеет большое значение для клинической химии.

## МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СИАЛОВЫХ КИСЛОТ

N-ацетил и N-глицилпроизводные пейраминовой кислоты (так называемые сиаловые кислоты) — обычные компоненты тканей и биологических жидкостей организма и животных.

В литературе описаны различные способы определения сиаловых кислот в крови. Получивший широкое распространение в клинико-диагностических лабораториях дифениламинный метод является малоспецифичным и часто дает завышенные результаты. Метод Гесса, в котором в качестве реактива используют смесь концентрированных уксусной и серной кислот, более специфичен, но менее чувствителен. Способы Аминова и Уоррена с тиобарбитуровой кислотой в настоя-

щее время самые специфичные и чувствительные, однако для выполнения серийных анализов в клинико-диагностических лабораториях они мало пригодны из-за своей трудоемкости. Наиболее приемлемым для клинических исследований производных пепрамниновой кислоты в крови является резорциновый метод Свеннерхольма, отличающийся простотой, достаточной чувствительностью и хорошей воспроизводимостью.

Для определения сиаловых кислот в сыворотке крови в качестве унифицированных предлагаются два метода: 1) резорциновый и 2) метод Гесса, основанный на реакции с уксусно-сернистым реактивом.

### Определение сиаловых кислот по методу Гесса

**Принцип.** Безбелковый фильтрат сыворотки подвергают гидролизу. В результате гидролиза из состава сиалогликопротеидов выделяются сиаловые кислоты, которые с раствором кислот в кипящей водяной бане дают цветную реакцию.

**Реактивы.** 1. Раствор трихлоруксусной кислоты — 10 г / 100 мл.

2. Раствор серной кислоты в ледяной уксусной кислоте, приготовленный добавлением к 95 частям ледяной уксусной кислоты 5 частей концентрированной серной кислоты.

3. Основной водный раствор стандартной пробы — N-ацетилнейраминаковой кислоты (50 мг / 100 мл).

**Ход определения.** В центрифужную пробирку наливают 1,0 мл сыворотки крови и при осторожном ее встряхивании добавляют 1,0 мл раствора трихлоруксусной кислоты. Пробирку ставят точно на 5 мин в кипящую водяную баню, затем охлаждают (обычно путем помещения пробирки на 5 мин в ледяную баню или в холодную водопроводную воду), центрифугируют 5 мин при 1000—2000 об/мин. К 0,4 мл отобранной надосадочной жидкости доливают 5,0 мл уксусно-сернистой смеси, и пробы повторно прогревают в кипящей водяной бане в течение 30 мин. При этом бесцветный раствор постепенно переходит в красно-фиолетовый. После охлаждения в ледяной воде (5 мин) или под крапом в струе холодной водопроводной воды пробы колориметрируют. Определение ведут на ФЭКе с зеленым светофильтром в кювете с шириной слоя 10 мм. В качестве контрольной пробы используют раствор серной кислоты в ледяной уксусной кислоте (реактив 2). Отсчет снимают по шкале оптических плотностей. При отсутствии стандартного раствора результат выражают в условных единицах, для чего полученную величину экстинкции умножают на 1000 (иногда ответ дают непосредственно в значениях оптической плотности). Однако следует считать правильным выражение результатов в значениях концентрации N-ацетилнейраминаковой кислоты. В последнем случае расчет ведут по калибровочному графику или по формуле.

Для получения данных к построению калибровочного графика из основного стандартного раствора N-ацетилнейраминаковой кислоты готовят рабочие растворы (табл. 28).

К растворам прибавляют по 5,0 мл уксусно-сернистого реактива и обрабатывают их так же, как опытные пробы.

Норма — 135—200 усл. ед., или 2,00—2,36 ммоль/л (прежние

Табл. 28. Данные к построению калибровочной кривой для определения сиаловых кислот

№ пробирок	Рабочие стандартные растворы		Концентрация N-ацетилпептидаминной кислоты в пробе (мг/100 мл, ммоль/л)	
	Основной стандартный раствор N-ацетилпептидаминной кислоты (мл)	Дистиллированная вода (мл)		
1	0,10	0,30	25,0	0,80
2	0,15	0,25	37,5	1,21
3	0,20	0,20	50,0	1,61
4	0,25	0,15	62,5	2,02
5	0,30	0,10	75,0	2,42
6	0,40	—	100,0	3,23

значения — 62 мг/100 мл — 73 мг/100 мл) N-ацетилпептидаминной кислоты.

Примечание. Кровь для анализа у обследуемого нужно брать натощак, определение вести в тот же день.

**Определение сиаловых кислот в сыворотке крови по реакции с резорцином (по Свеннерхольму)**

**Принцип.** При добавлении трихлоруксусной кислоты к сыворотке крови и последующем нагревании пробы происходит мягкий гидролиз гликопротеидов с отщеплением ацетил- и глицилпроизводных нейраминной кислоты, которые затем вступают в реакцию с раствором резорцина (в солянокислой среде) с образованием хромогена синего цвета.

**Реактивы.** 1. Резорциновый реактив. Готовят в мерной колбе на 100 мл. 200 мг резорцина растворяют в 10 мл дистиллированной воды, добавляют 80 мл концентрированной соляной кислоты ( $\rho = 1,19$  кг/л) и 0,25 мл 0,1 моль/л раствора сернокислой меди (0,399 г безводного  $\text{CuSO}_4$  вносят в 25 мл дистиллированной воды). Полученный объем доводят водой до 100 мл. Реактив годен в течение месяца при хранении его в холодильнике. Его можно использовать не ранее чем через 4 ч после приготовления.

2. Реактив для экстракции окрашенного продукта. 85,0 мл бутилацетата смешивают с 15,0 мл бутилового спирта.

3. Раствор трихлоруксусной кислоты — 5 г/100 мл.

4. Основной водный раствор N-ацетилпептидаминной кислоты — 50 мг/100 мл. 1,0 мл этого стандартного раствора содержит 0,5 мг N-ацетилпептидаминной кислоты.

**Ход определения.** К 0,1 мл сыворотки прибавляют 1,9 мл раствора трихлоруксусной кислоты, содержащее пробирки смешивают, гидролизуют в кипящей водяной бане ровно 7 мин. За это время про-

исходит мягкий гидролиз белков сыворотки крови, приводящий к отделению тех сиаловых кислот, которые располагаются преимущественно на концевых участках углеводных простетических групп гликопротеидов. Смесь охлаждают (в проточной воде), фильтруют через бумажный фильтр. К 0,5 мл прозрачного фильтрата (что соответствует 0,025 мл сыворотки) добавляют 0,5 мл дистиллированной воды. Для контроля берут 1,0 мл дистиллированной воды. В каждую пробирку доливают по 1,0 мл резорцинового реактива, и пробы помещают на 15 мин в кипящую водяную баню (пробирки прикрывают пробками для уменьшения испарения), охлаждают, добавляют по 3,0 мл уксусной кислоты (для экстракции). Пробирки встряхивают, оставляют стоять на 15 мин для расслоения водной и органической фаз. Верхний окрашенный слой отсасывают и колориметрируют на ФЭКе с желтым светофильтром (длина волны — 575—590 нм) в кювете с толщиной слоя 5 мм. Результаты сравнивают с аналогичными данными контрольной пробы.

Для построения калибровочного графика из стандартного раствора N-ацетилнейраминной кислоты готовят разведения (табл. 29).

Из каждого рабочего стандартного раствора с указанной в табл. 29 концентрацией берут 0,1 мл, вносят в пробирки, содержащие 0,9 мл дистиллированной воды, в которые затем добавляют по 1,0 мл резорцинового реактива. Далее стандартные пробы обрабатывают так же, как опытные.

В связи с тем что испытуемого раствора в стандартную пробу берут в четыре раза больше, чем в опытную (0,1 мл — в стандартную, 0,025 мл — в опытную пробу), для расчета концентрации опытной пробы концентрацию рабочего стандартного раствора соответственно умножают на 4 (результаты этого пересчета приведены в табл. 29).

Табл. 29. Данные к построению калибровочной кривой для определения сиаловых кислот

№ пробирок	Основной стандартный раствор N-ацетилнейраминной кислоты (мл)	Дистиллированная вода (мл)	Концентрация N-ацетилнейраминной кислоты	
			в рабочем растворе (мг/100 мл)	в опытной пробе (мг/100 мл, ммоль/л)
1	0,1	0,9	5	20 0,65
2	0,2	0,8	10	40 1,30
3	0,3	0,7	15	60 1,95
4	0,4	0,6	20	80 2,60
5	0,5	0,5	25	100 3,23

В норме концентрация сиаловых кислот в сыворотке крови равна 2,00—2,36 ммоль/л (62—73 мг/100 мл) N-ацетилнейраминной кислоты, составляя в среднем 2,10 ммоль/л (65 мг/100 мл).

Преимущество данного метода перед многими другими в том, что в присутствии резорцина и  $\text{Cu}^{++}$  синюю окраску раствора вызы-

пляют только сиаловые кислоты, тогда как глюкоза, манноза, галактоза и фруктоза образуют продукты желтого цвета, остающиеся в подной среде при экстракции синего хромогена смесью бутилацетата с бутанолом.

Недостатком способа Свеннерхольма является небольшая устойчивость окрашенного комплекса: в течение 1 ч интенсивность окраски снижается на 10 %.

### *Клинико-диагностическое значение исследования сиаловых кислот в сыворотке крови*

Количество сиаловых кислот в крови резко увеличивается при опухоли головного мозга, инфаркте миокарда. Оно возрастает также при туберкулезе, раке, эндокардите, лейкемии, лимфогранулематозе, нефрозе, остеомиелите и других заболеваниях. У больных с активным туберкулезом, например, содержание сиаловых кислот составляет 5,74 ммоль/л, с подострым бактериальным эндокардитом — 3,30 ммоль/л, с далеко зашедшей раковой опухолью — 4,58 ммоль/л. Увеличивается концентрация рассматриваемого показателя также при патологических состояниях, связанных с поражением паренхимы печени, коллагенозах и некоторых других, протекающих с деструкцией соединительной ткани.

Снижение содержания сиаловых кислот отмечается у больных с пернициозной анемией, гемохроматозом, болезнью Вильсона и дегенеративными процессами в центральной нервной системе.

В моче сиаловые кислоты обнаруживаются лишь при протеинурии.

### **МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ МЕТАБОЛИТОВ УГЛЕВОДНОГО ОБМЕНА**

К наиболее важным в диагностическом отношении метаболитам углеводного обмена следует отнести пировиноградную и молочную кислоты.

Пировиноградная кислота (ПВК) образуется в тканях в процессе распада углеводов (глюкозы и гликогена), ряда аминокислот (аланина, серина, цистеина и других), а также при дегидрировании молочной кислоты. Пировиноградная кислота может превращаться в ацетилкоэзим А, окисление которого в цикле трикарбоновых кислот обеспечивает синтез АТФ.

Она принимает участие в биосинтезе ацетилнейраминавой кислоты, глюкозы, гликогена. Пировиноградная кислота имеет большое значение для обмена веществ в центральной нервной системе.

Наиболее чувствительны и специфичны ферментативные методы определения пировиноградной и молочной кислот. Однако для их проведения требуется кристаллический фермент лактатдегидрогеназа, а также сложное оборудование (спектрофотометр). Поэтому в некоторых случаях наряду с энзимными могут быть рекомендованы и менее сложные неферментативные способы исследования пировиноградной или молочной кислот.

Учитывая это, мы наряду с простым (по П. М. Бабаскину, 1976) методом определения ПВК предлагаем и ферментативные способы

установления пировиноградной и молочной кислот. Последние можно выполнять с применением наборов реактивов фирмы ГДР — пируват-тест, «Ferrognost» и ФРГ — «Берингер».

### Определение пировиноградной кислоты в крови модифицированным методом Умбрайт

**Принцип.** Пировиноградная кислота крови конденсируется с 2,4-динитрофенилгидразином с образованием гидразона, который в щелочной среде дает коричнево-красный цвет раствора. По интенсивности его окраски судят о содержании пировиноградной кислоты.

Основные отличия предлагаемого метода от оригинального заключаются в том, что пировиноградную кислоту исследуют непосредственно в безбелковом центрифугате крови, а не в толуоловом экстракте.

**Реактивы.** 1. Раствор трихлоруксусной кислоты (ТХУ) — 10 г / 100 мл.

2. Раствор 2,4-динитрофенилгидразина (ДНФГ). 50 мг реактива растворяют в 10 мл концентрированной соляной кислоты при слабом подогревании смеси. Объем раствора доводят дистиллированной водой до 50 мл. Хранят в холодильнике.

3. Раствор едкого натра — 12 г / 100 мл.

4. Пировинограднокислый натрий (пируват натрия).

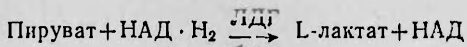
**Ход определения.** Из пальца берут 0,3 мл крови и смешивают в центрифужной пробирке с 0,7 мл дистиллированной воды. К гемолизату приливают 1 мл раствора ТХУ, перемешивают стеклянной палочкой и через 2—3 мин центрифугируют при 1500 об в течение 15 мин. Надосадочную жидкость полностью сливают в пробирку, к ней прибавляют 0,4 мл раствора ДНФГ, содержимое пробирки смешивают и на 20 мин помещают в темное место при комнатной температуре. По истечении этого срока в пробирку приливают 1 мл раствора едкого натра и через 5 мин определяют на ФЭКе оптическую плотность окрашенного реактива. В качестве компенсационной жидкости берут контрольный раствор, который готовят так же, как опытный, только вместо крови используют воду. Колориметрируют пробы на ФЭКе с синим светофильтром в кюветах с шириной слоя 5 мм. Количество пировиноградной кислоты в исследуемой пробе рассчитывают по калибровочной кривой.

Калибровочную кривую строят исходя из того, что 1 ммоль ПВК соответствует 88 мг, а в норме в крови содержится до 0,114 ммоль/л (114 мкмоль/л, 1 мг/100 мл), а именно: 0,0456 ммоль/л (45,6 мкмоль/л, 0,4 мг/100 мл) — 0,0912 ммоль/л (91,2 мкмоль/л, 0,8 мг/100 мл).

Концентрация пировиноградной кислоты в крови новорожденных втрое превышает таковую в крови здоровых людей.

### Определение пировиноградной кислоты энзимным методом

**Принцип метода.** Пировиноградная кислота под влиянием лактатдегидрогеназы (ЛДГ) восстанавливается в молочную. При этом происходит окисление восстановленного никотинамидадениндинуклеотида (НАД · Н<sub>2</sub>):



Равновесие этой реакции сильно сдвинуто вправо. При рН 6,9 превращение НАД · H<sub>2</sub> в НАД практически протекает до конца реакции и эквимолекулярно превращению пирувата в лактат. Так как для восстановления 1 моль пирувиноградной кислоты расходуется 1 моль НАД · H<sub>2</sub>, то по изменению оптической плотности реакционной смеси при длине волны 340, 334 или 366 нм можно судить об убыли НАД · H<sub>2</sub>, следовательно, и о концентрации пирувиноградной кислоты.

**Реактивы.** 1. 1,1 моль/л раствора K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.

2. 3 · 10<sup>-3</sup> моль/л раствора НАД · H<sub>2</sub>.

3. Лактатдегидрогеназа — 0,75 мг/мл.

4. 0,6 моль/л раствора HClO<sub>4</sub>.

**Ход определения.** 0,5 мл венозной крови, взятой без наложения жгута, вносят в центрифужную пробирку, в которой находится 1 мл охлажденного до 0°С раствора HClO<sub>4</sub>. Через 5 мин смесь центрифугируют при 3000 об/мин в течение 10 мин. Затем 0,6 мл центрифугата смешивают с 0,4 мл реактива 1, на протяжении 10 мин пробирка должна находиться в ледяной бане. Выпавший осадок KClO<sub>4</sub> отделяют центрифугированием. Нейтрализованный центрифугат доводят до температуры +25°С, после чего в прямоугольную кварцевую кювету спектрофотометра с шириной слоя 10 мм доливают последовательно 0,7 мл нейтрализованного центрифугата, 0,02 мл раствора НАД · H<sub>2</sub> (реактив 2) и измеряют оптическую плотность реактива при 366 нм (E<sub>1</sub>). Затем в кювету добавляют 0,02 мл раствора ЛДГ (реактив 3), содержимое ее тщательно перемешивают стеклянной палочкой и через 2 мин снова измеряют оптическую плотность (E<sub>2</sub>).

Количество пирувиноградной кислоты в крови (мкмоль пирувата/л) рассчитывают по разнице экстинкций, умноженной на коэффициент 1525:

$$(E_1 - E_2) \cdot 1525 = \text{мкмоль пирувата/л.}$$

Коэффициент 1525 получают исходя из следующего: 6,8 — пересчет 0,147 мл крови на 1 мл; 0,74 — пересчет объема раствора, имеющегося в кювете (0,74 мл), на 1 мл; 303,0 — коэффициент молярной экстинкции для НАД · H<sub>2</sub> при 366 нм. В случае, если оптическая плотность замеряется при других длинах волн (334 или 340 нм), используют иные значения коэффициента молярной экстинкции.

Норма — 89,1 ± 6,29 мкмоль пирувата/л крови, или (что то же) около 0,089 ммоль/л.

#### *Клинико-диагностическое значение исследования пирувиноградной кислоты в крови*

Содержание пирувиноградной кислоты в крови увеличивается при недостатке тиаминна в организме, при болезни печени, сахарном диабете, гиперфункции гипофизарно-адреналовой системы. Количество пирувиноградной кислоты возрастает после введения больным некоторых лекарственных веществ — камфоры, стрихнина, адреналина.

При больших физических нагрузках концентрация пирувиноградной кислоты увеличивается до 0,570 ммоль/л.

В спинномозговой жидкости содержание пирувиноградной кислоты резко повышается после травматических заболеваний, при воспа-



лительных процессах — менингите, абсцессе мозга. При паркозе содержание пировиноградной кислоты в крови несколько снижается.

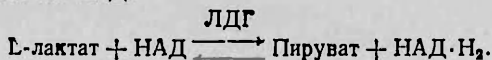
Все факторы, обуславливающие увеличение концентрации ПВК, обычно приводят к возрастанию уровня молочной кислоты.

#### Определение молочной кислоты энзимным методом

Молочная кислота, будучи конечным продуктом гликолиза и гликогенолиза, образуется в организме в результате восстановления пировиноградной кислоты в анаэробных условиях.

С током крови она поступает в печень, где снова может быть превращена в глюкозу или гликоген.

**Принцип метода.** Принцип энзиматического установления молочной кислоты основан на дегидрировании лактата лактатдегидрогеназой в присутствии НАД:



По количеству образовавшегося  $\text{НАД} \cdot \text{H}_2$ , определенного спектрофотометрически, судят о содержании молочной кислоты, так как реакция протекает стехиометрически — 1 моль НАД на 1 моль молочной кислоты дает 1 моль  $\text{НАД} \cdot \text{H}_2$ .

**Реактивы.** 1. 0,5 моль/л глицин-гидразинового буфера, рН 9,0.

2. 0,027 моль/л раствора НАД.

3. Лактатдегидрогеназа — 2 мг/мл.

4. 0,6 моль/л раствора  $\text{HClO}_4$ .

**Ход определения.** 0,5 мл венозной крови, взятой без жгута, вносят в центрифужную пробирку, в которой находится 1 мл охлажденного до  $0^\circ\text{C}$  раствора  $\text{HClO}_4$ . Через 5 мин смесь центрифугируют при 3000 об/мин в течение 10 мин. Затем 0,1 мл безбелкового центрифугата смешивают с 1 мл глицин-гидразинового буфера (реактив 1), 0,02 мл раствора ЛДГ (реактив 3) и 0,1 мл раствора НАД (реактив 2). Инкубация — 1 ч при  $+25^\circ\text{C}$ . Оптическую плотность измеряют с помощью спектрофотометра в кювете с толщиной слоя 10 мм (длина волны 366 нм). Компенсационной жидкостью служит бидистиллированная вода.

Для каждой серии определений ставят контрольную пробу, в которой исследуемую жидкость (0,1 мл центрифугата) заменяют 0,1 мл раствора разведенной  $\text{HClO}_4$  (1 объем 0,6 моль/л  $\text{HClO}_4$  и 1 объем бидистиллированной воды).

Разница оптической плотности между опытной ( $E_{\text{оп}}$ ) и контрольной ( $E_{\text{к}}$ ) пробамы дает  $\Delta E$ . Количество молочной кислоты в крови устанавливают по формуле:

$$\frac{\Delta E \cdot 10535}{1000} = \Delta E \cdot 10,535 = \text{ммоль/л крови.}$$

Коэффициент 10 535 рассчитывают исходя из следующего: 28,5 — пересчет на 1 мл крови; 1,22 — пересчет объема раствора, имеющегося в кювете (1,22 мл), на 1 мл; 303,0 — коэффициент молярной экстинкции для  $\text{НАД} \cdot \text{H}_2$  при 366 нм; 1000 — коэффициент пересчета мкмоль в ммоль.

Норма —  $1,035 \pm 0,072$  ммоль лактата/л крови.

## *Клинико-диагностическое значение определения молочной кислоты в крови*

Интенсивные и продолжительные мышечные нагрузки как при физиологических, так и при патологических состояниях (эпилепсия, тетания, столбняк, другие судорожные состояния) приводят к резкому увеличению концентрации молочной кислоты. Возрастание уровня молочной кислоты наблюдается также при острых гепатитах (особенно в терминальных стадиях цирроза печени), злокачественных новообразованиях, гипоксиях, связанных с сердечной и легочной недостаточностью, анемиях и прочих заболеваниях.

## Глава IX

### МЕТОДЫ ИЗУЧЕНИЯ ОБМЕНА ЛИПИДОВ

Основным биологическим материалом, используемым для осуществления биохимической диагностики заболеваний с нарушением обмена липидов, является кровь больного. Ее главные липидные компоненты: свободный и эстерифицированный холестерин, фосфолипиды, триацилглицерины, неэстерифицированные жирные кислоты. Перечисленные липиды находятся в крови не только в свободном состоянии, но и в форме соединений, связанных с белком, то есть липидно-белковых комплексов (липопротеидов).

Так называемые общие липиды объединяют в себе сумму всех липидов, содержащихся в плазме или сыворотке крови (холестерин, фосфолипиды, триацилглицерины, жирные кислоты и другие).

### ИССЛЕДОВАНИЕ ОБЩИХ ЛИПИДОВ И ИХ ФРАКЦИЙ

Для количественного определения общих липидов в сыворотке крови предложено много способов, среди которых можно выделить следующие группы.

Гравиметрические методы, состоящие в экстракции липидов сыворотки каким-либо растворителем, очистке липидного экстракта, высушивании и взвешивании сухого остатка на аналитических весах. Эти методы точны, однако весьма сложны, требуют определенных навыков, большого количества исходного материала, оборудования, времени. В более простых модификациях гравиметрических методов ошибка достигает 10—20 %.

Окислительные методы, в которых используется окисление липидов бихроматом калия или хромовой кислотой с последующим титрометрическим либо колориметрическим исследованием. Они осуществляются при условии высокой техники исполнения и исключительной чистоты во время проведения исследования.

Методы, основанные на свойстве липидов сыворотки избирательно окрашиваться суданом черным. Они удобны, просты, технически несложны, но отличаются плохой воспроизводимостью.

Методы, базирующиеся на сравнении степени мутности стандартного и исследуемого растворов. В нефелометрических способах (Купкель с соавт., 1948) общие липиды определяют при взаимодействии сыворотки и реактива, состоящего из фенола и хлорида натрия. По точности метод приближается к гравиметрическому.

Методы, в которых используется описанная в 1937 г. Чабролом и Чаронатом цветная реакция продуктов распада ненасыщенных липидов с реактивом (включающим в себя ванилин, фосфорную и серную кислоты).

Механизм реакции заключается в следующем: ненасыщенные липиды реагируют с серной кислотой при нагревании смеси с образовавшимся карбониевого аниона; фосфорная кислота эстерифицирует ОН-группу ванилина; карбониевый ион взаимодействует с активированной карбонильной группой фосфата ванилина, в результате реакции получается стабилизированный окрашенный комплекс. Зольнер и Кирш в 1962 г. предложили основанный на этой реакции метод определения липидов в сыворотке крови, который в дальнейшем был усовершенствован Ю. А. Барышковым с соавт., Кнайтом с соавт. и другими исследователями.

Большинство авторов, применяющих для установления концентрации общих липидов реакцию с сульфософфованилиновым реактивом, отмечает, что рассматриваемая реакция высокочувствительна и технически проста. Метод дает достаточно воспроизводимые результаты. Он наиболее пригоден для использования в широкой лабораторной практике. Поэтому из всех существующих способов определения общих липидов в сыворотке крови в качестве унифицированного принята описанная ниже модификация двух методов: Зольнера и Кирша (1966), Кнайта с соавт. (1972). На реакции с сульфософфованилиновым реактивом базируется метод, который выполняют с применением диагностических наборов реактивов (фирма «Лаксема», ЧССР).

**Определение общих липидов  
в сыворотке крови по цветной реакции  
с сульфософфованилиновым реактивом**

**Принцип.** Продукты распада ненасыщенных липидов образуют с реактивом, состоящим из серной, ортофосфорной кислот и ванилина, соединение, интенсивность окраски которого пропорциональна содержанию общих липидов в сыворотке крови.

**Реактивы.** 1. Серная кислота (концентрированная) для пробы Саваля.

2. Ортофосфорная кислота, концентрированная.

3. 0,6 г/100 мл водный раствор ванилина. 0,6 г ванилина растворяют в небольшом количестве дистиллированной воды при нагревании смеси на водяной бане. После охлаждения объем доводят до 100 мл. Раствор стабилен, если хранить его при комнатной температуре.

4. Фосфорованилиновая смесь. 4 части концентрированной ортофосфорной кислоты смешивают с 1 частью 0,6 г/100 мл раствора ванилина. Смесь хранят в посуде из темного стекла при комнатной температуре.

5. Хлороформ х. ч. или для наркоза.

6. Основной (12,0 г/л) стандартный раствор триолеина. На аналитических весах взвешивают в бюксе 1200 мг триолеина, навеску переносят в мерную колбу на 100 мл и доводят объем хлороформом до метки. Раствор держат в холодильнике в посуде из темного стекла с притертой пробкой.

**Ход определения.** Опытная проба. К 0,05 мл сыворотки прибавляют 2,5 мл концентрированной серной кислоты. Содержимое пробирки тщательно перемешивают и помещают на 10 мин в кипящую водяную баню. Пробирку вынимают и сразу же охлаждают водопроводной водой до комнатной температуры. Из пробирки отбирают 0,2 мл смеси, которую переносят в другую пробирку, содержащую 3 мл фосфориванилиновой смеси. После тщательного перемешивания пробы оставляют на 45 мин в темноте при комнатной температуре. Экстинкцию измеряют на фотоэлектроколориметре с зеленым светофильтром (длина волны 500—560 нм) в кювете с толщиной слоя 5 мм. Результаты сравнивают с аналогичными данными контрольной пробы.

Контрольную пробу ставят так же, как опытную, но вместо сыворотки берут 0,05 мл воды.

Расчет производят по калибровочному графику или по формуле (норма — 4,0—8,0 г/л).

Для получения данных на построение калибровочного графика из основного раствора готовят рабочие стандартные растворы (табл. 30).

**Табл. 30.** Данные к построению калибровочного графика для определения общих липидов в сыворотке крови

№ пробирок	Основной стандартный раствор триолеина (мл)	Хлороформ (мл)	Концентрация общих липидов (г/л)
1	0,17	0,83	2,0
2	0,33	0,67	4,0
3	0,50	0,50	6,0
4	0,67	0,33	8,0
5	0,83	0,17	10,0
6	1,00	—	12,0

**Примечания:** 1. Исследование проводить у больного натощак.

2. Сыворотку можно хранить в холодильнике в течение 3—6 дней (не замораживая ее).

3. При концентрации общих липидов выше 12,0 г/л сыворотку следует развести дистиллированной водой, а полученные по калибровочной кривой или по формуле результат нужно умножить на цифру разведения.

4. Посуду, применяемую для определения общих липидов, нужно мыть отдельно. Необходимо тщательно прополоскать ее дистиллированной водой и спиртом.

Из каждого разведения берут по 0,05 мл рабочего стандартного раствора и далее пробы обрабатывают так же, как опытные. Пользуясь найденными данными, строят калибровочный график. Прямая зависимость между содержанием общих липидов и оптической плотностью сохраняется до 12 г/л.

Расчет по формуле:

$$\text{общие липиды (г/л)} = E_{\text{оп.}} / E_{\text{ст.}} \cdot C_{\text{ст.}},$$

где  $E$  — экстинкция опытных и стандартных проб;  $C$  — концентрация основного стандартного раствора (12,0 г/л).

## *Клинико-диагностическое значение определения общих липидов в сыворотке крови*

Как физиологическое явление увеличение содержания липидов в крови (гиперлипемия) наступает через 1—4 ч после принятия обследуемым пищи. Оно выражено тем сильнее, чем ниже уровень липидов в крови больного натошак.

Концентрация липидов в крови изменяется при целом ряде патологических состояний. Так, у больных с диабетом наряду с гипергликемией отмечается резко выраженная гиперлипемия (нередко до 10,0—20,0 г/л). При липоидном нефрозе содержание липидов в крови достигает еще более высоких цифр — до 10,0—50,0 г/л. Гиперлипемия — постоянное явление у больных с билиарным циррозом печени и у больных с острым гепатитом (особенно в период желтухи). Повышенное содержание липидов в крови, как правило, обнаруживается у лиц, страдающих острым или хроническим нефритом, в случае, если заболевание сопровождается отеками.

Содержание общих липидов в сыворотке крови увеличивается при эссенциальной гиперлипемии, ожирении, атеросклерозе, часто у больных ишемической болезнью сердца, а также при гипотиреозе, панкреатите, злоупотреблении алкоголем.

Для разделения общих липидов на составляющие их компоненты весьма удобно использование методов тонкослойной хроматографии. Однако необходимость в приготовлении пластики с тонким слоем силикагеля и сложность учета выделяемых фракций сдерживают их широкое применение в клинико-диагностических лабораториях. Поэтому для определения фракций липидов большое распространение получили различные химические методы.

Из всех компонентов липидного спектра сыворотки крови наибольший интерес представляет исследование содержания общего холестерина и его эстрифицированной формы.

### **ХОЛЕСТЕРИН**

Холестерин представляет собой вторичный одноатомный ароматический спирт (3-окси-5-холестенен), в молекуле которого имеется общее всем стеринам полициклическое ядро циклопентапергидрофенантрена.

Он обнаруживается во всех тканях и жидкостях человеческого организма как в свободном состоянии, так и в виде сложных его эфиров — соединений спиртовой группы холестерина с жирными кислотами (преимущественно ненасыщенными, например, линолевой).

В сыворотке он находится главным образом в  $\beta$ - и пре- $\beta$ -липопротеидах, причем 60—70 % его представлено в форме сложных эфиров; 30—40 % холестерина неэстрифицировано.

Свободный и эстрифицированный холестерин составляет фракцию общего холестерина.

Методы определения общего холестерина подразделяются на:

I. Колориметрические. Насчитывается около 150 колориметрических способов, в основе которых лежат следующие реакции образования цветных комплексов:

1) реакция Либермана—Бурхарда (Либерман, 1885; Бурхард, 1890), при которой холестерин, взаимодействуя с уксусным ангид-

ридом, уксусной и концентрированной серной кислотами, дает изумрудно-зеленое окрашивание раствора;

2) реакция Калиани—Златкиса—Зака, заключающаяся в появлении фиолетового окрашивания раствора при реакции холестерина с хлорным железом, уксусной и серной кислотами;

3) реакция Чугаева (Л. Чугаев, 1900), для которой характерно возникновение красного окрашивания в ходе взаимодействия холестерина с ацетилхлоридом и хлористым цинком;

4) реакция Биоля и Крофта — появление красного окрашивания раствора при реакции холестерина с персульфатом калия, уксусной и серной кислотами.

5) реакция Ригли (1964) — образование комплекса фиолетового цвета в ходе взаимодействия холестерина с реактивом, состоящим из серной кислоты и метилового спирта.

II. Нефелометрические методы, основанные на сравнении степени мутности стандартного и исследуемого растворов.

III. Титрометрические методы.

IV. Гравиметрические методы.

V. Флюориметрические методы (по реакции с о-фтальевым альдегидом и другими реактивами). Часто используются как конечный этап ферментативного (каталазного) способа определения общего холестерина.

VI. Хроматографические методы, в том числе способ газожидкостной хроматографии. Последний был предложен как референтный (Amberl с соавт., 1976) для исследования общего и свободного холестерина в плазме. Характеризуясь специфичностью, простотой исполнения и требуя небольшого количества биологической жидкости, он с успехом может применяться в педиатрической практике.

VII. Полярографические методы, позволяющие определять общий и свободный холестерин в присутствии ферментов холестеролоксидаз и холестеролэстераз. Они могут использоваться для специальных исследований и в педиатрической практике.

VIII. Ферментативные методы, в которых в качестве основных реактивов применяются энзимы холестеролоксидазы, холестеролэстеразы, пероксидазы и индикаторы протекания реакции (4-гидроксibenзоат, 4-аминофеназон и другие). Наряду с пероксидазными используются и каталазные способы. Ферментные методы, будучи наиболее специфичными, отличаются хорошей воспроизводимостью результатов, быстротой и простотой проведения анализа, но требуют для исполнения дорогостоящих реактивов. Большим их достоинством является возможность применения для реакции всего лишь 5 мкл сыворотки, а также то, что для реакции не нужны агрессивные жидкости ( $H_2SO_4$ , уксусная кислота, уксусный ангидрид и другие). В последние годы ферментативный метод исследования общего холестерина, как и экстракционный колориметрический, используется для автоматизированного его определения на центрифужном анализаторе. Фирма «Берингер» поставляет соответствующие наборы реактивов. Röschlau с соавт. (1974) предложили простой ферментный способ установления концентрации общего холестерина, основанный на следующем принципе. Под влиянием холестеролэстеразы общий холестерин превращается в свободный. При этом выделяются жирные кислоты. Под действием холестеролоксидазы свободный холестерин окисляется в холестерон. При добавлении каталазы или пероксидазы образуется формальдегид, который реагирует с ионами аммония и аце-

тилацетоном с образованием соединения, оптическую плотность которого измеряют при 450 нм.

Для определения общего холестерина в клинико-диагностических лабораториях применяются главным образом колориметрические методы, базирующиеся на реакциях Либермана—Бурхарда и Калиани—Златкиса—Зака.

Методы, состоящие в использовании предложенной около 80 лет тому назад реакции Либермана—Бурхарда, условно можно разделить на прямые и косвенные. Непрямые способы (Энгельгардта—Смирновой, Раппопорта—Энгельберга) получили такое название потому, что исследование холестерина по ним проводится лишь после извлечения из сыворотки холестеринового экстракта.

Методы с предварительной экстракцией общего холестерина изопропанолом и последующим проведением цветной реакции в ряде стран применяются как референтные (ручной метод Abell и автоматизированный способ определения холестерина на автоанализаторе фирмы «Technicon A. A. II»).

В прямых же методах холестерин предварительно не экстрагируется, а цветная реакция осуществляется непосредственно с сывороткой крови. Из них заслуживают внимания методы Илька, Мрскоса—Товарска и Златкиса—Зака. Из химических способов более надежны методы, базирующиеся на реакции Зака, так как окрашивание, образующееся в реакции Либермана—Бурхарда, нестабильно.

Методы Илька и Мрскоса—Товарека равнозначны по точности результатов и техническому исполнению для применения в клинико-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений. В качестве основного унифицированного (наряду с методом, в котором используется реакция Златкиса—Зака) утвержден способ определения холестерина по Ильку.

За рубежом большее распространение получил способ исследования холестерина по Abell с соавт. (1958). Данный метод предложен американским обществом клинических химиков ВОЗ для всех стран в качестве стандартного метода определения содержания холестерина. Он, наряду с автоматизированным установлением концентрации холестерина на автоанализаторе «Technicon A. A. II», используется для выполнения эпидемиологических исследований в кардиологических центрах нашей страны. Этот колориметрический метод по сравнению со способом Илька дает более точные результаты. Так, по данным К. И. Розенцвейга, при исследовании холестерина по Ильку получаются завышенные на 10—15% результаты. В. В. Белов (1979) показал, что при определении холестерина по Ильку результаты оказываются на 6,5% выше по сравнению с данными исследования холестерина по Abell. Это обстоятельство важно учитывать при фенотипировании гиперлиппротеидемий.

**Метод определения общего холестерина  
в сыворотке крови, основанный  
на реакции Либермана—Бурхарда (метод Илька)**

**Принцип.** Холестерин в присутствии уксусного ангидрида и смеси уксусной и серной кислот дает зеленое окрашивание раствора.

**Реактивы.** 1. Реактив Либермана—Бурхарда, представляющий смесь одной части ледяной уксусной кислоты, пяти частей уксусного



ангидрида и одной части концентрированной серной кислоты, выдерживающей пробу Савая. Ввиду того что реакция протекает с выделением тепла, колбу постоянно охлаждают, а серную кислоту добавляют в нее в последнюю очередь, очень медленно, при постоянном помешивании содержимого. Полученная смесь должна быть прозрачной, бесцветной или слегка желтоватой. Ее переливают в склянку из темного стекла с притертой пробкой и хранят в холодильнике. При несоблюдении последовательности добавления реактивов и без охлаждения колбы смесь получается темно-желтой и, следовательно, непригодна к употреблению.

2. Стандартный раствор холестерина (4,7 ммоль/л). На аналитических весах отвешивают 180 мг холестерина, навеску растворяют в 2,5 мл хлороформа, количественно полностью переносят в мерную колбу емкостью 100 мл, объем которой доводят до метки абсолютным этиловым спиртом. Приготовленный раствор хранят в склянке из темного стекла с притертой пробкой (с дополнительной герметизацией парафином) в холодильнике. 1 мл его содержит 1,8 мг холестерина. Раствор нестойкий.

3. Абсолютный этиловый спирт. Для абсолютирования этанола используют безводный сульфат меди, который получают прокаливанием кристаллической соли (медного купороса) при  $+120^{\circ}\text{C}$  в сушильном шкафу при периодическом ее перемешивании. Безводный сульфат меди хранят в герметически закрытых банках. Порошок сульфидной меди заливают  $96^{\circ}$  этиловым спиртом и оставляют на 3—4 дня. Ежедневно раствор перемешивают. Находящиеся в осадке частицы со временем приобретают синий цвет (за счет образования кристаллогидратов). Затем спирт сливают и засыпают новой порцией безводного сульфата меди. Это все продолжают до тех пор, пока цвет осадка не будет изменяться. Спирт сливают и фильтруют.

4. Хлороформ х. ч. или для наркоза.

Ход определения. К 2,1 мл реактива Либермана — Бурхарда (1) осторожно, очень медленно добавляют 0,1 мл исгемолизованной сыворотки так, чтобы она стекала по стенке пробирки. Пробирку при этом энергично встряхивают 10—12 раз, после чего термостатируют 20 мин при  $+37^{\circ}\text{C}$ . Затем смесь колориметрируют на ФЭКе с красным светофильтром (длина волны 630—690 нм) в кювете с шириной слоя 5 мм. Показатели экстинкции учитывают в сравнении с таковыми контрольной пробы (реактива 1).

Для построения калибровочного графика из стандартного раствора холестерина готовят ряд разведений (табл. 31).

Полученные стандартные пробы обрабатывают так же, как и опытные, то есть энергично встряхивают, помещают в термостат, после чего колориметрируют. Калибровочный график строят по цифрам экстинкций, найденным в результате колориметрии стандартных растворов.

Для перевода величины содержания холестерина в стандартной пробе, выраженной в мг, в прежние значения концентрации (мг/100 мл) общее количество холестерина, заключенное в каждой из стандартных проб, умножают на 1000, так как берут сыворотку в опыт в объеме 0,1 мл, а расчет ведут на 100 мл указанной сыворотки. Для представления значений концентрации в размерности ммоль/л полученный результат (в мг/100 мл) умножают на коэффициент 0,026. Содержание холестерина выражают также в г/л, что менее предпочтительно.

**Табл. 31.** Данные к построению калибровочного графика для определения холестерина

№ пробирок	Объем стандартного раствора холестерина (мл)	Объем реактива 1 (мл)	Количество холестерина в пробе (мг)	Концентрация холестерина (мг/100 мл, ммоль/л)	
1	0,05	2,15	0,09	90	2,3
2	0,10	2,10	0,18	180	4,7
3	0,15	2,05	0,27	270	7,0
4	0,20	2,00	0,36	360	9,3
5	0,25	1,95	0,45	450	11,6

- Примечания:** 1. Все пробирки и пипетки следует содержать сухими.  
 2. Сыворотка крови не должна иметь следов гемолиза.  
 3. Появление мути может быть вызвано только наличием воды в реактиве или в посуде.  
 4. Сыворотку нужно добавлять очень медленно, по стенке пробирки — только тогда получается чистое изумрудное окрашивание раствора. При быстром прилипании сыворотки появляется примесь желтого цвета и в связи с этим возникают более высокие значения экстинкции.  
 5. Смесь необходимо термостатировать (как это рекомендует Ильк), а не оставлять при комнатной температуре на 20 мин, в противном случае могут получиться более низкие показатели оптической плотности.

Содержание холестерина в сыворотке крови, определяемое этим методом, в норме составляет 3,0—6,2 ммоль/л (в среднем — 4,3 ммоль/л). Более подробно эти сведения изложены в подразделе «Клинико-диагностическое значение исследования холестерина в сыворотке (плазме) крови».

### Метод определения холестерина по Abell

**Принцип метода.** Холестерин, как свободный, так и эфирносвязанный, экстрагируется петролейным эфиром. При взаимодействии с уксусным ангидридом, уксусной и серной кислотами (реактив Либермана — Бурхарда) холестерин в результате дегидрирования, сульфирования и полимеризации превращается в окрашенный комплекс. Концентрацию полученного таким образом хромогена устанавливают по величине его оптической плотности. Поскольку развитие окраски со свободным холестерином идет более последовательно, чем с его эфирами, для повышения точности анализа применяют предварительный гидролиз эфиров холестерина до холестерина.

**Реактивы.** 1. Абсолютный этиловый спирт. Получают способом, описанным для определения холестерина по Ильку (см. предыдущий метод) и перегоняют.

2. Петролейный эфир после перегонки (фракция с температурой кипения +65—68 °С), можно также использовать фракции с более низкой температурой кипения (+40—60 °С). Вместо петролейного эфира допустимо применение гексана.

3. Ледяная уксусная кислота.

4. Серная кислота для пробы Саваяля или х. ч.
5. Уксусный ангидрид.
6. Раствор КОН (10 г КОН растворяют в 20 мл дистиллированной воды).

7. Раствор спиртовой щелочи. Готовят непосредственно перед определением путем смешивания 6 мл раствора КОН (реактив 6) и 94 мл абсолютного этанола.

8. Стандартный раствор холестерина (40 мг/100 мл; 1,03 ммоль/л). Перед его приготовлением холестерин перекристаллизовывают 4 раза из абсолютного этилового спирта и высушивают до постоянного веса. 100 мг холестерина растворяют в 250 мл абсолютного этанола. Хранят при  $+4^{\circ}\text{C}$  несколько месяцев.

9. Модифицированный реактив Либермана — Бурхарда. 20 объемных частей уксусного ангидрида, помещенного в стеклянную колбу, охлаждаются в ледяной бане до температуры ниже  $+10^{\circ}\text{C}$ . Затем в колбу добавляют по каплям 1 объем концентрированной серной кислоты, смесь хорошо перемешивают и оставляют в ледяной бане на 10 мин. После этого в колбу доливают 10 объемных частей ледяной уксусной кислоты, содержимое опять хорошо перемешивают и нагревают до комнатной температуры. Реактив следует использовать в течение часа.

Ход определения состоит из следующих этапов: 1) гидролиз. 0,5 мл плазмы крови помещают в пробирку с хорошо притертой пробкой и туда же добавляют 5 мл раствора спиртовой щелочи. Смесь встряхивают и ставят в водяную баню с температурой  $+37-40^{\circ}$  на 55 мин;

2) экстракция. По окончании гидролиза пробу охлаждают до комнатной температуры, доливают 5 мл дистиллированной воды, снова охлаждают до комнатной температуры и добавляют 10 мл петролейного эфира. Пробу интенсивно встряхивают в течение 5 мин, а затем либо центрифугируют, либо оставляют стоять 10—15 мин для разделения фаз (на верхнюю, состоящую из петролейного эфира и содержащую ХС, и на нижнюю с водорастворимыми соединениями).

Из 10 мл петролейного экстракта для определения ХС берут 4 мл, а при использовании гиперхолестеринемической сыворотки — 2 мл. Эфир из взятых проб отгоняют на водяной бане при температуре  $+60-70^{\circ}\text{C}$ ;

3) цветная реакция. К полученному сухому остатку доливают 5 мл реактива Либермана — Бурхарда, пробирку с пробой тщательно встряхивают и оставляют на 30—35 мин, после чего раствор колориметрируют или на спектрофотометре при длине волны 620 нм или на ФЭКе с красным светофильтром;

4) расчет. При проведении каждой серии определений используют стандартный раствор холестерина. К 5 мл его добавляют 0,3 мл водного раствора КОН (реактив 6), затем проводят гидролиз и последующие процедуры так же, как для сыворотки крови.

Из 10 мл петролейного экстракта отбирают 1, 2, 3 мл (0,2, 0,4 и 0,6 мг ХС) для определения. Расчет производят следующим образом. Сначала находят оптическую плотность, соответствующую 1 мг холестерина ( $\Phi$ ):

$$\Phi = \frac{\text{Опт. плот. станд. раств.}}{\text{Колич. ХС в пробе в мг}}$$

Ошибка в величине  $\Phi$  при исследовании трех стандартных проб не должна превышать 4 %. Дальнейший расчет содержания ХС осуществляют по формуле:

$$a \text{ ммоль/л} = \frac{\text{Опт. плот. пробы}}{\Phi} \cdot \frac{10}{4} \cdot \frac{2,6}{0,5},$$

где 10 — общий объем петролейного экстракта (мл); 4 — объем петролейного экстракта (мл), взятый для определения; 0,5 — объем плазмы (мл), взятый для исследования; 2,6 — фактор пересчета на значение концентрации холестерина (ммоль/л).

Пример. Оптическая плотность стандартных проб, содержащих 0,2; 0,4 и 0,6 мг холестерина, равна 0,172; 0,337 и 0,509. Оптическая плотность, соответствующая 1 мг холестерина ( $\Phi$ ), составляет в среднем 0,850. Оптическая плотность пробы равна 0,425. Содержание холестерина в пробе будет составлять:

$$\frac{0,425}{0,850} \cdot \frac{10}{4} \cdot \frac{2,6}{0,5} = 6,5 \text{ (ммоль/л)}.$$

Примечание. При исследовании автоматизированным (на «Technicon А. А. II») методом парных проб сыворотка/плазма крови (антикоагулянт ЭДТА, добавляемый из расчета 1 г на 1 л крови) найдено, что концентрация холестерина (и триацилглицеридов) в сыворотке в среднем на 3 % выше, чем в плазме. Обнаруженные различия не имеют большой клинической значимости и важны только в случаях, когда сравнивают данные определения холестерина при различных клинических испытаниях или эпидемиологических исследованиях.

При использовании ферментного метода мутная, богатая хиломикронами сыворотка дает более низкие, чем действительные, значения общего холестерина; присутствие билирубина в концентрации до 7,5 мг/100 мл на определение не влияет.

При применении же прямого колориметрического метода, основанного на реакции Либермана—Бурхарда, 1 мг/100 мл билирубина имеет такую же оптическую плотность, как 8 мг/100 мл холестерина. Поэтому, установив содержание билирубина у больных желтухой, полученные результаты умножают на 8 и найденную величину вычитают из результатов определения холестерина.

## МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СВОБОДНОГО И ЭСТЕРИФИЦИРОВАННОГО ХОЛЕСТЕРИНА В СЫВОРОТКЕ КРОВИ

Как для определения общего холестерина, так и для исследования его фракций используют экстракционные способы (непрямые) и методы без экстракции холестерина (прямые).

Непрямые способы включают в себя экстракцию общего холестерина, осаждение свободного холестерина и колориметрическое исследование свободного холестерина в осадке или эфиров холестерина в надосадочной жидкости.

Для экстракции холестерина из сыворотки крови рекомендуют различные органические жидкости и их смеси: этиловый спирт — диэтиловый эфир, ацетон — этиловый спирт, хлороформ, изопропиловый спирт и другие. В последнее время чаще применяют изопропиловый спирт (изопропанол), так как он в течение короткого времени и без нагревания полностью осаждает белки и разрушает связи липидов с белками. Кроме того, изопропиловый спирт является хорошим растворителем стандартного холестерина. Поэтому изопропиловый спирт наиболее часто используют для экстракции холестерина из сыворотки крови.

Свободный холестерин способен образовывать с дигитонином, томатином, пиридинсульфатом и другими веществами труднорастворимые соединения. Большинство авторов применяют для осаждения свободного холестерина водно-спиртовой или изопропаноловый раствор дигитонина.

К прямым относят кинетические и энзиматические методы. Принцип кинетических способов основан на том, что при температуре  $+55-65^{\circ}\text{C}$  хлорное железо вступает в реакцию и со свободным и с эстерифицированным холестерином, в то время как при  $+20^{\circ}\text{C}$  хлорное железо в течение первых 2 ч реагирует только со свободным холестерином. Методы этой группы могут давать завышенные результаты вследствие появления мутности в окрашенном растворе, поэтому они не нашли широкого применения.

Энзиматические способы базируются на окислении свободного холестерина до холестенона и перекиси водорода. Реакция катализируется ферментом холестериноксидазой. О содержании холестерина судят по интенсивности поглощения холестенона (при 240 нм) или перекиси водорода. Чаще определяют перекись водорода, которая под влиянием каталазы окисляет метанол до формальдегида, последний же дает цветную реакцию с ацетилацетоном. Методы этой группы характеризуются высокой специфичностью и чувствительностью, они технически просты, но требуют применения дефицитных и дорогостоящих реактивов.

Для колориметрического исследования фракций холестерина используют рассмотренные цветные реакции.

В настоящее время в лабораторной практике распространены непрямые способы определения свободного и эстерифицированного холестерина. Из них наиболее приемлемы те, в которых общий холестерин экстрагируют изопропиловым спиртом, а свободный холестерин осаждают дигитонином. Указанные методы более точны, но вместе с тем более трудоемки и менее воспроизводимы, чем прямые.

Сотрудники Всесоюзного научно-методического и контрольного центра по лабораторному делу (Н. А. Сентебова, 1977) предложили в качестве унифицированных способы установления фракционного состава холестерина, основанные на реакции Златкиса — Зака и Либермана — Бурхарда.

**Непрямой метод определения свободного  
и эстерифицированного холестерина  
в сыворотке крови по реакции Златкиса — Зака**

**Принцип.** Общий холестерин экстрагируют изопропиловым спиртом. Свободный холестерин осаждают дигитонином и устанавливают в осадке по реакции Златкиса — Зака. Содержание эстерифицированного холестерина находят по разности уровней общего и свободного холестерина.

**Реактивы.** 1. Изопропиловый спирт.  
2. Уксусная кислота ледяная.  
3. Серная кислота концентрированная.  
4. Ортофосфорная кислота концентрированная.  
5. Основной раствор хлорного железа. 2,5 г хлорного железа ( $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) растворяют при нагревании на водяной бане в 80 мл

ортофосфорной кислоты, охлаждают, объем доводят до 100 мл ортофосфорной кислотой.

6. Рабочий раствор хлорного железа. 8 мл основного раствора хлорного железа осторожно смешивают с 80 мл серной кислоты, охлажденную смесь дополняют серной кислотой до объема 100 мл. Реактив стабилен, если хранить его в посуде из темного стекла при комнатной температуре в течение месяца.

7. Раствор дигитонина. 1 г дигитонина растворяют при нагревании на водяной бане в 50 мл этилового спирта, охлажденный раствор доливают дистиллированной водой до 100 мл и фильтруют.

8. Ацетон.

9. Основной стандартный раствор холестерина. 40 мг холестерина растворяют в 100 мл изопропилового спирта, 1 мл раствора содержит 0,4 мг холестерина.

10. Рабочий стандартный раствор холестерина. К 20 мл основного раствора добавляют изопропиловый спирт до объема 100 мл. 1 мл рабочего раствора содержит 0,08 мг холестерина. Хранят в посуде из темного стекла в холодильнике.

Ход определения. К 0,2 мл сыворотки доливают при постоянном встряхивании 4,8 мл изопропилового спирта. Содержимое пробирок тщательно перемешивают и оставляют стоять на 10 мин при комнатной температуре. Затем пробирки центрифугируют 5 мин и осторожно отсасывают надосадочную жидкость (экстракт). В экстракте определяют общий и свободный холестерин.

Для исследования общего холестерина проводят опытную пробу. К 1,0 мл экстракта добавляют 2,0 мл ледяной уксусной кислоты, содержимое пробирки перемешивают, затем приливают 2,0 мл раствора хлорного железа, смесь энергично встряхивают и оставляют стоять на 10—15 мин, после чего измеряют оптическую плотность пробы на ФЭКе в кювете с толщиной слоя 5 мм (длина волны 560 нм). Результаты сравнивают с аналогичными данными контрольной пробы. Контрольную пробу ставят так же, как опытную, но вместо экстракта берут 1,0 мл изопропилового спирта.

Для определения свободного холестерина также проводят опытную пробу. К 2,0 мл экстракта добавляют 1,0 мл раствора дигитонина, смесь оставляют в пробирках, закрытых пробками, на 30 мин, после чего центрифугируют 10 мин. Надосадочную жидкость осторожно отсасывают и убирают, к осадку приливают 3,0 мл ацетона и смесь вновь центрифугируют 5 мин. Надосадочную жидкость осторожно удаляют, а пробирки оставляют стоять открытыми в течение 5—10 мин для испарения остатков паров ацетона. В пробирку с осадком свободного холестерина добавляют 1,0 мл изопропилового спирта и 2,0 мл ледяной уксусной кислоты, все перемешивают и доливают 2,0 мл рабочего раствора хлорного железа, содержимое пробирок вновь энергично встряхивают (осадок полностью растворяется из-за выделения тепла). Через 10—15 мин измеряют плотность опытных проб на ФЭКе при длине волны 560 нм. Результаты сравнивают с аналогичными данными контрольной пробы.

Контрольную пробу готовят следующим образом. Смешивают 1,0 мл изопропилового спирта и 2,0 мл ледяной уксусной кислоты. Добавляют 2,0 мл рабочего раствора хлорного железа, смесь энергично встряхивают и оставляют стоять на 10—15 мин.

Для приготовления стандартной пробы к 1,0 мл рабочего стандартного раствора доливают 2,0 мл ледяной уксусной кислоты, все

перемешивают, добавляют 2,0 мл рабочего раствора хлорного железа, содержимое пробирки встряхивают и через 10—15 мин измеряют оптическую плотность раствора. Результаты сравнивают с аналогичными данными контрольной пробы.

Экстинкция стандартной пробы соответствует концентрации общего холестерина 200 мг/100 мл, свободного холестерина — 100 мг/100 мл (для установления уровня свободного холестерина берут в 2 раза больше экстракта).

Содержание общего холестерина рассчитывают по формуле:

$$\frac{E_{\text{оп.}}}{E_{\text{ст.}}} \cdot 200 = a \text{ мг/100 мл}, \quad \frac{E_{\text{оп.}}}{E_{\text{ст.}}} \cdot 5,18 = a \text{ ммоль/л},$$

где  $a$  — концентрация общего холестерина в исследуемой пробе; 200 — коэффициент пересчета в размерность мг/100 мл; 5,18 — коэффициент перевода в единицы СИ.

Содержание свободного холестерина:

$$\frac{E_{\text{оп.}}}{E_{\text{ст.}}} \cdot 100 = a \text{ мг/100 мл}, \quad \frac{E_{\text{оп.}}}{E_{\text{ст.}}} \cdot 2,59 = a \text{ ммоль/л},$$

где 100 — коэффициент пересчета в размерность мг/100 мл;  $a$  — концентрация свободного холестерина в исследуемой пробе; 2,59 — коэффициент перевода в единицы СИ.

Примечания: 1. Сыворотка должна быть свободной от гемолиза.

2. Повышенное содержание билирубина не влияет на результаты определения.

### Определение свободного и эстерифицированного холестерина в сыворотке крови прямым методом, основанным на реакции Либермана — Бурхарда

**Принцип.** Свободный холестерин осаждают дигитонином и удерживают в осадке по реакции Либермана — Бурхарда.

**Реактивы.** 1. Холестериновый реактив. 5,55 г 2,5-диметилбензолсульфокислоты растворяют в 100 мл ледяной уксусной кислоты. Смешивают 3 объема уксусного ангидрида, 1 объем раствора 2,5-диметилбензолсульфокислоты и 1 объем ледяной уксусной кислоты.

2. Раствор дигитонина в изопропиловом спирте. 250 мг дигитонина вносят в 50 мл изопропанола при подогревании содержимого колбы на водяной бане и после охлаждения доливают раствор изопропиловым спиртом до 100 мл.

3. Изопропиловый спирт.

4. Серная кислота концентрированная.

5. Стандартный раствор холестерин-дигитонина. 200 мг холестерина и 888 мг дигитонина растворяют в 80 мл уксусной кислоты в мерной колбе на 100 мл при нагревании ее на водяной бане. После охлаждения дополняют до метки уксусной кислотой.

6. Стандартный раствор для определения общего холестерина. 200 мг холестерина на 100 мл раствора уксусной кислоты. Стабилен, если содержать при комнатной температуре 6—7 дней.

Для исследования общего холестерина готовят опытную пробу. К 0,05 мл сыворотки добавляют 2,5 мл холестеринового реактива, пробирку помещают в водяную баню при температуре +25 °C на 5—



10 мин. Затем в нее доливают 0,5 мл концентрированной серной кислоты и вновь ставят в водяную баню на 10 мин. Оптическую плотность пробы измеряют на ФЭКе в кювете с толщиной слоя 5 мм (длина волны 560—590 нм). Результаты сравнивают с аналогичными данными контрольной пробы. Контрольную пробу ставят так же, как опытную, но вместо сыворотки берут 0,05 мл дистиллированной воды.

Стандартную пробу обрабатывают как опытную, но вместо сыворотки используют 0,05 мл стандартного раствора для общего холестерина.

Опытная проба для определения свободного холестерина. К 0,05 мл сыворотки добавляют 1,0 мл раствора дигитонина, смесь оставляют на 10 мин, затем центрифугируют 10 мин. Надосадочную жидкость тщательно отсасывают и выливают. К осадку прибавляют 3 мл холестеринового реактива, содержимое пробирки перемешивают и центрифугируют. К 2,5 мл надосадочной жидкости приливают 0,5 мл концентрированной серной кислоты, раствор помещают в водяную баню при +25 °С на 10 мин, после чего измеряют его плотность на ФЭКе в кювете с толщиной слоя 5 мм (длина волны 560—590 нм). Результаты сравнивают с аналогичными данными контрольной пробы.

Для приготовления контрольной пробы на сыворотку к 0,05 мл сыворотки добавляют 1,0 мл изопропилового спирта, смесь оставляют на 10 мин, затем центрифугируют 10 мин. Надосадочную жидкость сливают, а осадок обрабатывают так же, как опытную пробу.

Для получения стандартной пробы к 0,05 мл дигитонин-холестеринового стандартного раствора приливают 3,0 мл холестеринового реактива, все тщательно перемешивают. К 2,5 мл смеси добавляют 0,5 мл концентрированной серной кислоты и обрабатывают так же, как опытную пробу. Контрольную пробу проводят аналогично стандартной, но вместо стандартного раствора берут 0,05 мл изопропилового спирта.

Расчет концентрации свободного холестерина (в мг на 100 мл) производят по формуле:

$$\frac{E_{\text{оп.}} - E_{\text{к. пр. сыв.}}}{E_{\text{ст.}}} \cdot 200,$$

где  $E_{\text{к. пр. сыв.}}$  — экстинкция контрольной пробы на сыворотку; 200 — показатель концентрации холестерина стандартного раствора.

В литературе нет общего мнения о колебании уровня свободного холестерина (даже в процентах от общего холестерина). По данным большинства авторов, свободный холестерин составляет в среднем 30 %, а эстерифицированный — 70 % от общего холестерина.

#### *Клинико-диагностическое значение исследования холестерина в сыворотке (плазме) крови*

Холестерин может накапливаться в крови в больших количествах у больных при нарушении жирового обмена. Длительная гиперхолестеринемия при измененных условиях растворимости холестерина приводит к развитию атеросклероза вследствие отложения в стенках артерий преимущественно связанного холестерина с последующим

образованием атероматозных бляшек. Резко увеличивается содержание холестерина и в органах, подвергающихся жировому перерождению.

Возрастание концентрации холестерина отмечается также у больных механической желтухой, нефритом, сифилисом, гипотиреозом, авитаминозом группы В и т. д. Очень высокое содержание холестерина в крови наблюдается при сахарном диабете и липоидном нефрозе (26 ммоль/л и выше).

Уменьшение концентрации холестерина (гипохолестеринемия) обнаружено при анемии, туберкулезе, лихорадочном состоянии, сыпном тифе, гипертиреозе, голодании, раковой кахексии, паренхиматозной желтухе, поражении центральной нервной системы, хронической пневмонии.

Состояние эндокринного баланса в организме оказывает существенное влияние на уровень холестерина в крови. Так, введение инсулина снижает содержание холестерина. Аналогичное действие оказывают и гормоны щитовидной железы: при недостаточности функции щитовидной железы имеет место гиперхолестеринемия. Лечение же больных с микседемой гормональными препаратами щитовидной железы ведет к уменьшению концентрации холестерина в крови. Кастрация вызывает гиперхолестеринемия, при этом введение половых гормонов понижает уровень холестерина в крови.

Определение различных фракций холестерина (общего, свободного, связанного) значительно расширяет диагностические возможности исследования липидного обмена. Считают, что установление коэффициента эстерификации (то есть отношения эфирносвязанного к общему холестерину, норма 0,6—0,8, или 60—80 %) служит важной функциональной пробой печени, в которой происходит образование эфиров холестерина. При остром гепатите, циррозе печени, обострении хронического гепатита, механической желтухе выявлено снижение фракции эстерифицированного холестерина и коэффициента эстерификации. Понижение содержания эфиров холестерина пропорционально степени нарушения функции печени, резкое же уменьшение их содержания является плохим прогностическим симптомом и говорит о наступлении недостаточности функции печени.

Уровень холестерина увеличивается у больных с ожирением (в 50—80 % случаев) и с хроническим алкоголизмом.

## ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОБЩИХ ФОСФОЛИПИДОВ В КРОВИ

Фосфолипиды (фосфатиды) представляют собой группу липидов, содержащих помимо фосфорной кислоты (в качестве обязательного компонента) также спирт (обычно глицерин), жирные кислоты и азотистые основания. По природе спирта фосфолипиды можно разделить на фосфоглицериды, фосфосфингозины и фосфонозитиды.

В то время, когда не было известно о существовании отдельных фракций фосфолипидов, общие фосфолипиды отождествляли с лецитином. Сейчас доказано, что лецитин составляет хотя и большую (66±9 %), но все-таки часть фосфолипидов, включающих в себя также сфингомиелин (22±5 %), лизолецитин (9±7 %) и кефалин (3±1 %); поэтому в клинической практике правильнее определять не лецитин, а общие фосфолипиды.

Об общей концентрации фосфолипидов обычно судят по содержанию в них липидного фосфора, на долю которого приходится 4 %

молекулярной массы фосфолипидов. Поэтому, умножая найденное в результате исследования количество липидного фосфора на 25, рассчитывают содержание общих фосфолипидов.

Липидный фосфор может быть установлен либо в липидном экстракте, либо после осаждения белков сыворотки крови трихлоруксусной кислотой. В последнем случае вместе с белками осаждаются и фосфолипиды. Полученный осадок используют для определения в нем содержания фосфора (метод Зильверсмита и Дэвиса и различные его модификации).

Обычно результаты исследования липидного фосфора по его содержанию в белковом осадке оказываются ниже, чем при анализе липидного экстракта, поскольку в экстракт переходит и ряд других соединений.

Из органических растворителей для получения липидного экстракта пользуются спирто-эфирной смесью Блора или метанольной смесью Фольча.

В качестве унифицированного предложен метод определения общих фосфолипидов сыворотки по содержанию общего фосфора в липопротендах, осаждаемых трихлоруксусной кислотой (способ Зильверсмита и Дэвиса, 1950), так как он более прост, чем метод Блора, менее трудоемок и выполняется при меньшей затрате времени.

#### Определение общих фосфолипидов в сыворотке крови по содержанию в них фосфора

**Принцип.** Фосфолипиды осаждаются трихлоруксусной кислотой (вместе с белками крови). В полученном осадке колориметрически устанавливают содержание фосфора.

**Реактивы.** 1. Раствор трихлоруксусной кислоты — 100 г/л.

2. Концентрированный (57 г/100 мл) раствор хлорной ( $\text{HClO}_4$ ) кислоты. Можно брать раствор любой другой близкой концентрации  $\text{HClO}_4$ .

3. Раствор молибденовокислого аммония. 4 г измельченного химически чистого молибдата аммония растворяют в 100 мл дистиллированной воды. Раствор сохраняется в холодном месте в течение нескольких недель.

4. Основной раствор аминафтолсульфоновой кислоты (эйконогена). В 100—150 мл дистиллированной воды вносят 30 г гидросульфита натрия ( $\text{NaHSO}_3$ ), после чего в раствор добавляют 0,5 г эйконогена. Содержимое колбы помешивают стеклянной палочкой до полного растворения эйконогена. Отдельно в небольшом количестве воды распределяют 6 г безводного сульфита натрия. Оба раствора смешивают и доводят водой до объема 250 мл. Через 2—3 ч раствор фильтруют. Хранят в холодильнике в посуде из темного стекла. Реактив стоек месяц. Перед определением 10 мл основного раствора разводят дистиллированной водой в 2,5 раза. При отсутствии эйконогена в качестве восстанавливающего реактива можно воспользоваться раствором аскорбиновой кислоты или гидрохинона (см. примечание).

5. Основной стандартный раствор однозамещенного фосфорнокислого калия ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ). 4,39 г  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , высушенного до постоянного веса при температуре  $+120^\circ\text{C}$  (5,75 г  $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ), растворяют в 1 л дистиллированной воды, добавляют 1 каплю хлороформа (в ки-

честве консерванта]. В 1 мл полученного раствора содержится 1 мг фосфора.

6. Рабочий стандартный раствор готовят разведением основного стандартного раствора фосфата в 100 раз. 1 мл его заключает 0,01 мг фосфора.

Оба раствора хранят в холодильнике.

**Ход определения.** 0,2 мл сыворотки помещают в пробирку, в которой находится 3,0 мл воды. Приливают 3,0 мл раствора трихлоруксусной кислоты (первые 1,5 мл — по каплям, встряхивая пробирку, остальные более быстро). Пробирку оставляют на 1—2 мин, затем центрифугируют 3—5 мин до образования осадка. Надосадочную жидкость сливают и переворачивают пробирку, пока не стечет вся жидкость. К осадку добавляют 1,0 мл концентрированного раствора  $\text{HClO}_4$  и для ровного кипения — 1—2 стеклянные бусинки. Пробирку прогревают в песчаной (+180 °С) бане или на прокаленном листе асбеста (положенном на электроплитку) до обесцвечивания смеси. Опыт нашей работы показывает, что лучше всего пробирку ставить в холодную песчаную баню и лишь затем ее нагревать: это, как правило, позволяет исключить «стрельбу» пробирок. Рекомендуется наблюдать за процессом, пока не произойдет образование пены (5 мин). Сразу же после сжигания образца в пробирку доливают 5 мл воды. Параллельно описанной реакции готовят контрольную пробу на реактивы, содержащую 0,8 мл концентрированного раствора  $\text{HClO}_4$ , и три стандартные пробы, содержащие по 0,8 мл концентрированного раствора  $\text{HClO}_4$  и по 2,0 мл рабочего фосфатного стандарта. Объем контрольной и стандартных проб доводят водой до 6 мл.

Пробы располагают в следующем порядке: контрольная, 2 стандартные, затем опытные пробы и еще одна стандартная проба.

В каждую пробирку прибавляют по 1,0 мл раствора молибдата аммония, содержимое перемешивают и приливают по 1,0 мл раствора эйконогена, доводя объем водой до 10,0 мл. Содержимое пробирок вновь перемешивают. Через 20 мин после добавления эйконогена пробы колориметрируют на ФЭКе с красным светофильтром в кювете с шириной слоя 10 мм. Результаты сравнивают с аналогичными данными контрольной пробы.

Расчет липидного фосфора производят по формуле:

$$\frac{E_{\text{оп.}}}{E_{\text{ст.}}} \cdot \frac{0,02 \cdot 100}{0,2} = \frac{E_{\text{оп.}}}{E_{\text{ст.}}} \cdot 10 = a \text{ мг/100 мл,}$$

где 0,02 — количество фосфора (мг), содержащегося в 2 мл стандартного раствора (1 мл рабочего стандартного раствора заключает 0,01 мг фосфора); 0,2 — объем сыворотки или плазмы (мл); 100 — фактор пересчета мг фосфора на 100 мл сыворотки.

Для выражения результата в ммоль/л липидного фосфора пользуются формулой:

$$\frac{E_{\text{оп.}}}{E_{\text{ст.}}} \cdot 3,23,$$

где 3,23 — коэффициент, являющийся произведением 10 и фактора пересчета 0,323.

Умножением содержания липидного фосфора (мг/100 мл) на 25 получают значения концентрации общих фосфолипидов (мг/100 мл).

...ности в ммоль/л вычисленный ре  
(пересчет основан на средней молекулярной массе фосфолипидов —  
774 дальтон). В конечном итоге имеют следующую формулу:

$$E_{\text{оп.}} / E_{\text{ст.}} \cdot 3,23 = a \text{ ммоль/л (общие фосфолипиды).}$$

Для выражения результата исследования общих фосфолипидов в г/л прибегают к расчету по формуле:

$$\frac{E_{\text{оп.}} \cdot 0,02 \cdot 5000 \cdot 25}{E_{\text{ст.}} \cdot 1000} = \frac{E_{\text{оп.}}}{E_{\text{ст.}}} \cdot 2,5 = a \text{ г/л,}$$

где 5000 — коэффициент, используемый для расчета концентрации фосфора (мг/л) (то есть для выражения содержания фосфора в 1000 мл сыворотки); 25 — коэффициент пересчета содержания липидного фосфора в содержание (мг) общих фосфолипидов; 1000 — фактор пересчета мг в г.

**Примечание.** При отсутствии эйконогена установление концентрации фосфора можно проводить с другими восстанавливающими веществами, например с водным раствором аскорбиновой кислоты — 1 г/100 мл (готовят перед употреблением) или с раствором гидрохинона — 1 г/100 мл. Эйконоген может быть заменен и метолом.

У здоровых взрослых людей концентрация липидного фосфора составляет от 1,97 до 4,68 ммоль/л (6,1—14,5 мг/100 мл), среднее значение — 2,97 ммоль/л (9,2 мг/100 мл).

#### *Клинико-диагностическое значение исследования концентрации общих фосфолипидов в сыворотке крови*

Повышение уровня фосфолипидов в сыворотке крови наблюдается при тяжелой форме сахарного диабета, нефрозе, хроническом нефрите, эссенциальной гиперлипемии, застойной желтухе, постгеморрагической анемии, печеночной коме и других патологических состояниях.

Снижение уровня фосфолипидов отмечается при атеросклерозе, малокровии, остром лихорадочном состоянии, алиментарной дистрофии, истощении, при тяжелых формах острого гепатита, портальном циррозе и жировой дегенерации печени.

Для диагностики целого ряда заболеваний еще более информативным является исследование фракционного состава фосфолипидов сыворотки крови. С этой целью в последние годы весьма широко используют методы тонкослойной хроматографии липидов.

#### **Методика разделения фосфолипидов сыворотки крови на пластинах «Силуфол UV-254»**

Принцип метода состоит в хроматографическом разделении фосфолипидов на тонком слое адсорбента (силикагеля), закрепленном на алюминисовой подкладке пластин «Силуфол UV-254» (ЧССР).

Ход определения. 0,15 мл сыворотки крови вносят в 6,0 мл смеси Фольча, пробу интенсивно встряхивают в течение 3 мин, фильтруют в мерную пробирку, добавляют 1,5—2,0 мл дистиллированной воды, содержимое пробирки опять встряхивают и оставляют до следующе-

го утра для разделения фаз (при необходимости пробы центрифугируют). Верхний слой отсасывают (или выбрасывают), 1/3 нижнего слоя отбирают для определения в нем содержания липидного фосфора, оставшиеся же 2/3 объема органической фазы (соответствующие 0,1 мл сыворотки крови) в дальнейшем применяют для анализа состава фосфолипидов. Для этого органическую фазу выпаривают (в водяной бане) при температуре  $+65-70^{\circ}\text{C}$  и к сухому остатку доливают 2—3 капли смеси Фольча.

Фракционирование фосфолипидов осуществляют в смеси хлороформ-метанол-вода (65 : 25 : 4) при однократной прогонке растворителя в хроматографической камере (хроматографические пластинки перед использованием желательнее активировать в сушильном шкафу при температуре  $+100-110^{\circ}\text{C}$  в течение 30 мин).

После высушивания пластины при комнатной температуре (до исчезновения запаха компонентов разделяющей смеси) их окрашивают этанольным раствором фосфорномолибденовой кислоты (5 г/100 мл) путем распыливания раствора на пластины из стеклянного пульверизатора с последующим их прогреванием при  $+100^{\circ}\text{C}$  в течение 5 мин.

Начиная от линии старта, отдельные представители фосфолипидов распределяются в такой последовательности: лизолецитин, сфингомиелин, лецитин, фосфатидилинозитол, кефалин, полифосфатидные кислоты.

Спектр фосфолипидов записывают на соответствующем денситометре (БИАН-170 или другие).

Для выражения результатов распределения фракций фосфолипидов в абсолютных единицах находят содержание липидного фосфора в объеме органической фазы, заключающей в себе липиды 0,05 мл сыворотки крови.

### Определение липидного фосфора

Для исследования липидного фосфора применяют реактивы, приготовление которых описано в подразделе «Определение общих фосфолипидов в сыворотке крови по содержанию общего фосфора». Вместо раствора эйконогена используют его заменитель — раствор аскорбиновой кислоты (1 г/100 мл).

Под определению. Для реакции необходимо количество липидного экстракта, соответствующее 0,05 мл сыворотки крови.

К сухому остатку добавляют 0,25 мл раствора хлорной кислоты и пробу помещают на песчаную баню, где ее выдерживают до обесцвечивания смеси (см. описание хода определения общих фосфолипидов). Сразу же после сжигания в пробирку доливают по 1,25 мл дистиллированной воды. Одновременно готовят контрольную и три стандартные пробы. Контрольная проба состоит из 0,2 мл раствора хлорной кислоты и 1,3 мл воды, каждая из стандартных проб — из 0,5 мл раствора фосфата калия ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ), 0,2 мл  $\text{HClO}_4$  и 0,8 мл воды. Пробы располагают в таком порядке: контрольная, две стандартные, опытные, стандартная. В каждую пробирку прибавляют по 0,25 мл раствора молибдата аммония, содержимое пробирок тщательно перемешивают и приливают 0,25 мл раствора аскорбиновой кислоты. В контрольную и стандартные пробы добавляют по 0,5 мл воды, а объем опытных проб доводят водой до 2,5 мл. Содержимое проб перемешивают и через 20 мин после доливания реактива аскор-

биновой кислоты все пробы фотометрируют на МКМФ-1 с красным светофильтром (615 нм).

Расчет производят по формуле:

$$E_{оп.} / E_{ст.} \cdot 3,23 = a \text{ ммоль/л (липидный фосфор) (1),}$$

$$E_{оп.} / E_{ст.} \cdot 2,5 = a \text{ г/л (общие фосфолипиды) (2),}$$

где 3,23 и 2,5 — соответствующие коэффициенты пересчета.

## МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ТРИАЦИЛГЛИЦЕРИНОВ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ

В последние годы все больше внимания уделяется исследованию триацилглицеринов в сыворотке крови, для чего применяются наряду с косвенными (вычислительными) химические методы определения. Первые основываются на разнице результатов исследования различных липидных фракций (общих липидов, холестерина, фосфолипидов). Использование этих методов ограничено, так как они сложны, включают много операций, каждая из которых может быть источником ошибок.

Химические методы определения обычно включают 3 основных этапа: экстракцию триацилглицеринов растворителем, химический (или ферментативный) гидролиз экстракта, количественное установление (при помощи абсорбционной фотометрии, флюориметрии, ферментов) образовавшегося в результате гидролиза глицерина.

Наиболее специфичными, исключительно точными и простыми в исполнении, но труднодоступными для широкого использования из-за дороговизны и дефицитности необходимых реактивов являются ферментные методы исследования. Среди них распространен способ Буколо и Дэвида — двухступенчатый тест, в котором ферментативный гидролиз триацилглицеринов сочетается с энзиматическим определением глицерина. Это так называемый полностью энзиматический метод, в котором применяются липаза и эстераза. Ферментативный метод определения триацилглицеринов приспособлен также для проведения автоматизированных исследований на некоторых типах автоматизаторов. Даже те энзиматические методы, которые основываются на исследовании глицерина после щелочного омыления жиров сыворотки, более удобны, чем чисто химические способы, за счет исключения этапов экстракции липидов, адсорбции фосфолипидов.

Для получения хорошо воспроизводимых результатов следует строго соблюдать условия проведения опыта и время инкубации. При использовании ферментных способов экстинкцию измеряют на спектрофотометре.

Наиболее распространенными являются химические методы с колориметрическим и флюориметрическим завершением, состоящие в экстракции липидов, адсорбции фосфолипидов, неферментативном гидролизе триацилглицеринов с освобождением глицерина, окислением его до формальдегида и последующим фотометрическим определением формальдегида. Для этой цели обычно применяют две реакции: с хромотроповой кислотой (реакция Ламберта — Нейша, на которой основаны равнозначные методы Карлсона и Ганделя — Зильверсмита) и с ацетилацетоном, предложенная Гантшем. На последней бази-



руется исследование триацилглицеринов сыворотки крови на автоанализаторе «Technicon A. A. II», в триацилглицериновом канале которого используют реакцию образования способного к флюоресценции комплекса между формальдегидом и ацетилацетоном. Автоанализаторы этого типа распространены в кардиологических центрах республик для стандартизованного определения холестерина и триацилглицеринов.

Для проведения специальных исследований используют хроматографические способы определения (прежде всего методы тонкослойной, газовой хроматографии), позволяющие анализировать многие другие компоненты.

Сейчас для клинико-биохимических исследований предложено множество различных способов определения триацилглицеринов. Вместо утвержденного ранее трудоемкого модифицированного метода Карлсона в качестве унифицированного применяют способ Gottfried и Rosenberg (1973), в котором для экстракции триацилглицеринов используют гептан. В этом методе устранен трудоемкий этап экстракции по Фольчу, исключена адсорбция фосфолипидов кремневой кислотой или силикагелем, вместо нестабильного цветного реактива (хромотроповой кислоты) используют стабильный ацетилацетоновый реактив.

Мы предлагаем также другие специфичные, точные и вместе с тем относительно простые способы определения триацилглицеринов.

Для исследования триацилглицеринов могут быть применены поставляемые фирмой «Лаксма» (ЧССР) наборы реактивов.

#### Определение триацилглицеринов в сыворотке крови по цветной реакции с хромотроповой кислотой (модификация метода Ганделя и Зильверсмита)

**Принцип.** Триацилглицерины гидролизуются с освобождением глицерина, который окисляется перйодатом натрия до формальдегида. Образующиеся при этой йодаты и непрореагировавшие перйодаты восстанавливаются избытком гидросульфита натрия, после чего формальдегид определяют по цветной реакции с хромотроповой кислотой.

**Реактивы.** 1. Хлороформ х. ч. или для наркоза.

2. Метанол х. ч.

3. 0,4 г/100 мл спиртовой (этанольный) раствор КОН (готовят *ex tempore*).

4. Раствор перйодата натрия (натрия йоднокислого,  $\text{NaJO}_4$ ). 0,5 г перйодата натрия растворяют в мерной колбе на 100 мл в небольшом количестве воды и доводят дистиллированной водой до метки. Раствор стабилен около года, если хранить его при комнатной температуре в посуде из темного стекла.

5. Раствор гидросульфита натрия. 5 г гидросульфита натрия (или метабисульфита натрия) вносят в 100 мл дистиллированной воды. Реактив стабилен, если хранить его при комнатной температуре в течение месяца.

6. Раствор хромотроповой кислоты. 1 г чистой динатриевой соли хромотроповой кислоты (1,8-диокси-нафталин-3,6-дисульфоновой кислоты динатриевой соли) растворяют в 100 мл дистиллированной воды, раствор фильтруют, добавляют 300 мл концентрированной сер-

ной кислоты и 150 мл дистиллированной воды. Реактив стабилен в течение трех недель при хранении в холодильнике в посуде из темного стекла.

7. 0,7 моль/л раствора серной кислоты. К небольшому количеству дистиллированной воды, внесенной в мерную колбу на 100 мл, приливают 3,7 мл концентрированной серной кислоты, содержимое колбы смешивают и после охлаждения доводят объем дистиллированной водой до метки.

8. Кремниевая кислота водная, очищенная и активированная. К 500 г водной кремниевой кислоты (ч. или ч. д. а.) добавляют 2 л дистиллированной воды, содержимое колбы тщательно размешивают и оставляют стоять полученную суспензию на 1 ч. Верхний слой отсасывают водоструйным насосом, нижний слой фильтруют (фильтрование можно производить и сразу). Кремниевую кислоту промывают 3 раза абсолютным метанолом и несколько раз хлороформом. Очищенную кремниевую кислоту активируют в сушильном шкафу при температуре  $+110^{\circ}\text{C}$  в течение 12 ч. Хранят в герметично закрытой посуде. Перед работой кремниевую кислоту вновь активируют на протяжении 1 ч при температуре  $+100^{\circ}\text{C}$ .

9. Основной стандартный раствор трибутирина (2,3 ммоль/л или 200 мг/100 мл). 200 г трибутирина растворяют в небольшом количестве хлороформа в мерной колбе на 100 мл и доводят хлороформом до метки.

Ход определения. Для приготовления опытной пробы в пробирку с притертой пробкой вносят 0,5 г активированной кремниевой кислоты, 0,5 мл сыворотки (или плазмы) и 10 мл хлороформа. Смесь энергично встряхивают и оставляют при комнатной температуре на ночь или на сутки (можно и на 4 ч). Затем содержимое пробирки еще раз встряхивают и фильтруют через бумагу, промытую хлороформом. Экстракт выпаривают досуха и растворяют его в 0,5 мл добавленного хлороформа. Начиная с этого этапа, готовят стандартную и контрольную пробы, внося в отдельные чистые пробирки по 0,5 мл стандартного раствора и по 0,5 мл хлороформа (соответственно). В каждую пробирку доливают по 0,5 мл спиртового раствора КОП и содержимое их помещают на 20 мин в водяную баню, нагретую до температуры  $+60-70^{\circ}\text{C}$ . После этого в пробирки вносят по 0,5 мл раствора  $\text{H}_2\text{SO}_4$  и ставят их (на половину длины) в кипящую водяную баню до тех пор, пока не исчезнет запах алкоголя (на что обычно уходит 20 мин). Пробирки охлаждают и добавляют в каждую из них по 0,05 мл (1 каплю) раствора периодата натрия, встряхивают и через 10 мин приливают по 1 капле раствора гидросульфита натрия, еще раз перемешав содержимое пробирок. Спустя 10 мин добавляют по 5 мл хромотроповой кислоты и пробирки энергично встряхивают (пока раствор не станет прозрачным). Затем их помещают на 30 мин в кипящую водяную баню для развития окраски, интенсивность которой измеряют на ФЭКе с зеленым светофильтром в кювете с шириной слоя 3 мм (длина волны 500—560 нм). Результаты сравнивают с аналогичными данными контрольной пробы.

Расчет производят по формуле:

$$\text{Содержание триацилглицеринов (ммоль/л)} = E_{\text{оп.}}/E_{\text{ст.}} \cdot 2,3,$$

где 2,3 — показатель концентрации стандартного раствора триацилглицеринов.

Норма содержания триацилглицеринов в сыворотке крови — 0,56—1,69 ммоль/л (50—150 мг/100 мл).

Примечания: 1. Исследование у больного необходимо проводить натощак после 12-часового голодания.

2. Пробирки для работы должны быть абсолютно чистыми и сухими. Нужно после обычного мытья тщательно прополаскивать их дистиллированной водой и спиртом (этанолом или метанолом).

### Определение триацилглицеринов в сыворотке крови колориметрическим методом (по Gottfried и Rosenberg, 1973)

Принцип. Триацилглицерины экстрагируют из сыворотки крови. Освобожденный в результате щелочного гидролиза глицерин окисляют до формальдегида с помощью метаперiodата натрия. Образовавшийся формальдегид дает с ацетилацетоном 3,5-диацетил-1,4-дигидролүтидип, интенсивность окраски которого пропорциональна содержанию триацилглицеринов.

#### Реактивы.

1. Гептан.
2. Изопропиловый спирт.
3. Серная кислота — 0,04 моль/л. 2,2 мл концентрированной серной кислоты доводят до 1 л дистиллированной водой.
4. Раствор едкого кали — 6,25 моль/л. 17,5 г КОН растворяют в 50 мл дистиллированной воды.

Реактив стабилен в течение 2—3 мес, если хранить его в посуде из темного стекла при комнатной температуре.

5. Періодатный реактив. 0,6 г натрия йоднокислого мета ( $\text{NaJO}_4$ ) вносят в 100 мл раствора уксусной кислоты (5 г/100 мл). Реактив пригоден в течение 2—3 мес, если его содержать в посуде из темного стекла при комнатной температуре.

6. Раствор ацетата аммония — 2 моль/л. 154 г уксуснокислого аммония растворяют в небольшом количестве дистиллированной воды и доводят его объем до 1 л (рН 8,6).

7. Ацетилацетоновый реактив. 1,5 мл ацетилацетона доливают до 200 мл 2 моль/л раствором ацетата аммония. Реактив стабилен при хранении его в холодильнике на протяжении 2—3 мес в посуде из темного стекла.

8. Стандартный раствор триолеина — 200 мг/100 мл (2,3 ммоль/л). В мерной колбе на 100 мл растворяют 200 мг триолеина в изопропиловом спирте.

Ход определения. К 0,5 мл сыворотки крови добавляют 2,0 мл гептана, 3,5 мл изопропилового спирта и 1,0 мл раствора серной кислоты. Содержимое пробирки тщательно перемешивают 20 с, оставляют стоять в течение 5 мин и центрифугируют 10 мин.

К 0,4 мл верхнего слоя жидкости приливают 2,0 мл изопропилового спирта и 1 каплю раствора КОН. Содержимое пробирки перемешивают на протяжении 15 с. Пробирку закрывают пробкой и нагревают на водяной бане в течение 10 мин при +70 °С. После ее охлаждения добавляют по 0,2 мл периодатного и 1,0 мл ацетилацетонового реактивов, содержимое пробирки смешивают, закрывают ее пробкой и вновь нагревают в течение 10 мин на водяной бане при +70 °С, после чего измеряют оптическую плотность пробы на ФЭКе с синим или фиолетовым светофильтром (длина волны 410—430 нм)

в кювете с толщиной слоя 5 мм. Результаты сравнивают с аналогичными данными контрольной пробы.

Контрольную пробу ставят так же, как опытную, но вместо сыворотки берут 0,5 мл воды.

Стандартную пробу проводят так же, как опытную, но вместо сыворотки используют 0,5 мл калибровочного раствора.

Расчет производят по формуле:

$$E_{\text{оп.}} / E_{\text{ст.}} \cdot 2,3 = a \text{ ммоль/л,}$$

где 2,3 — концентрация триацилглицеринов в стандартном растворе (ммоль/л).

Примечания: 1. Исследование необходимо проводить у больного после 12—14-часового его голодания.

2. Пробирки для определения должны быть абсолютно чистыми и сухими.

3. Измерение оптической плотности можно осуществлять на спектрофотометре при 425 нм.

4. Оптическую плотность проб следует измерять при условии, что пробирки еще теплые, сразу после их нагревания при +70 °С. Окраска стабильна в течение нескольких часов.

5. При концентрации триацилглицеринов больше 300 мг/100 мл пробы необходимо разводить физиологическим раствором.

6. Слабый гемолиз не влияет на определение.

7. При отсутствии натрия йоднокислого мета ( $\text{NaJO}_4$ ) его можно заменить эквивалентным количеством  $\text{KJO}_4$ .

8. Во время приготовления периодатного реактива нужно обращать внимание на качество ледяной уксусной кислоты.

9. При применении наборов реактивов фирмы «Ляхема» (ЧССР) мы рекомендуем в процессе расчета пользоваться коэффициентом 3,45 (вместо приведенного в инструкции значения 300), что позволяет получать результаты исследования в требуемой размерности ммоль/л.

**Определение триацилглицеринов в сыворотке крови  
по цветной реакции с ацетилацетоном  
(метод Gottfried и Rosenberg, 1973,  
в модификации Н. Л. Асланяна, В. М. Шухяна, Л. А. Бабаяна,  
1977)**

Ход определения. К 0,5 мл сыворотки крови добавляют 2 мл гептана, 3,5 мл изопропилового спирта и 1 мл 0,1 н серной кислоты. Содержимое пробирки встряхивают в течение 30 с и оставляют на 10—15 мин для расслаивания. Экстракцию проводят в биологических пробирках со шлифами. Отбирают 0,8 мл из верхнего слоя (гептан), доливают 2 мл изопропилового спирта и 2 капли 6,25 н раствора едкого кали. Смесь инкубируют при +70 °С на водяной бане на протяжении 10 мин. Затем добавляют 0,4 мл раствора натрия метапериодата (600 мг натрия метапериодата растворяют в 50 мл воды, доливают 5 мл ледяной уксусной кислоты и доводят объем водой до 100 мл) и 2 мл реактива ацетилацетона (1,5 мл ацетилацетона в 200 мл 2 моль/л уксуснокислого аммония), все хорошо перемешивают и еще раз инкубируют при +70 °С на водяной бане в течение 15 мин. Если после приливания натрия метапериодата получаются две фазы, то верхний слой удаляют.

Мы рекомендуем наряду с опытными проводить 1—2 стандартные пробы. Для этого вместо 0,5 мл сыворотки в пробирку можно внести 0,5 мл раствора трибутирина в изопропиловом спирте (100 мг/100 мл). Стандартным раствором допустимо пользоваться в течение недели при хранении его на холоде. Для приготовления

контрольной пробы вместо сыворотки применяют 0,5 мл дистиллированной воды. Если для настройки фотоэлектроколориметра требуется две холостые пробы, то необходимо двойное количество всех реагентов.

После охлаждения растворы колориметрируют на ФЭКе с синим светофильтром (длина волны 360—460 нм). Результаты сравнивают с аналогичными данными контрольной пробы.

Расчет производят по формуле:

$$C_{\text{оп.}} (\text{ммоль/л}) = E_{\text{оп.}} / E_{\text{ст.}} \cdot 1,13,$$

где 1,13 — фактор пересчета в ммоль/л, соответствующий концентрации триацилглицеринов 100 мг/100 мл.

При концентрации триацилглицеридов в сыворотке крови более 3,4 ммоль/л (300 мг/100 мл) ее следует развести.

При анализе крови, взятой через 10—12 ч после последнего приема большим пищи, концентрация триацилглицеридов колеблется в пределах от 0,45 до 2,5 ммоль/л (40—220 мг/100 мл), составляя в среднем 1,37 ммоль/л, причем средние величины у женщин равны 1,39 ммоль/л, у мужчин — 1,34 ммоль/л (эти различия, вероятно, связаны с особенностями питания).

Возрастная динамика содержания холестерина и триацилглицеридов у детей следующая.

Возраст (годы)	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Холестерин (ммоль/л)	4,3	4,3	4,5	4,2	4,3	4,6	4,6	4,3	4,2	4,3
Триацилглицериды (ммоль/л)	0,53	0,55	0,59	0,60	0,63	0,75	0,64	0,79	0,89	0,86

**Примечание.** При использовании диагностических наборов реактивов фирмы «Лаксма» (ЧССР), позволяющих определять содержание триацилглицеридов методом, основанным на образовании окрашенного комплекса при взаимодействии формальдегида с ацетилацетоном, следует результат исследования выражать в новой размерности единиц. Преобразование размерности мг/100 мл в ммоль/л может быть достигнуто заменой в рекомендованной инструкции формуле расчета коэффициента 300 на 3,45.

*Клинико-диагностическое значение  
определения содержания  
триацилглицеридов в сыворотке крови*

Увеличение концентраций нейтральных жиров (гипертриацилглицеридемия) наблюдается при эссенциальной гиперлипемии и при первичной (семейной) гиперлипопротеидемии. Считают, что определение триацилглицеридов является одним из решающих показателей для диагностики отдельных типов врожденного нарушения обмена липидов.

Симптоматическое возрастание концентрации триацилглицеридов отмечается при беременности, диабете, панкреатите, нефротическом синдроме, гипотиреозе, жировой инфильтрации и при ряде других заболеваний печени (желчный цирроз), при атеросклерозе.

У больных с гипертонической болезнью и ишемической болезнью сердца выявлено значительное повышение содержания триацилглице-

ринов в сыворотке крови — до 9,0—11,3 ммоль/л (800—1000 мг/100 мл). У больных с ревматическими пороками сердца заметного возрастания рассматриваемого показателя не обнаружено.

По данным З. Б. Токарской (1980), при ишемической болезни сердца гипертриацилглицеринемия наблюдается в 48 % случаев.

## СОСТАВ И СВОЙСТВА ЛИПОПРОТЕИДОВ СЫВОРОТКИ КРОВИ

Большинство липидов обнаруживается в крови не в свободном состоянии, а в составе белково-липидных комплексов (представленных, в частности, хиломикронами,  $\alpha$ - и  $\beta$ -липопротеидами), для разделения которых с успехом могут быть использованы методы электрофореза.

$\alpha$ - и  $\beta$ -липопротеиды отличаются не только молекулярной массой, но и процентным содержанием отдельных липидных компонентов (табл. 32). Так, для  $\alpha$ -липопротеидов, отличающихся большим

Табл. 32. Состав и некоторые свойства липопротеидов сыворотки крови

Критерии оценки липопротеидов (ЛП)	Типы липопротеидов			Хило- микроны
	$\alpha$ -липо- протеиды (ЛПВП)	$\beta$ -липо- протеиды (ЛПНП)	пре- $\beta$ -липо- протеиды (ЛПОНП)	
Плотность (кг/л)	1,063—1,21	1,01—1,063	1,01—0,93	0,93
Молекулярная масса липопротеи- дов (далтоны)	от 180 000 до 380 000	2 200 000	3 000 000— 128 000 000	—
Размер молекул и частиц (нм)	7,0—10,0	10,0—30,0	200,0	>200,0
Всего белков (%)	50—57	21—22	5—12	2
Всего липидов (%)	43—50	78—79	88—95	98
Свободный холе- стерин (%)	2—3	8—10	3—5	2
Эстерифициро- ванный холестерин (%)	19—20	36—37	10—13	4—5
Фосфолипиды (%)	22—24	20—22	13—20	4—7
Холестерин (общий)	1,0	2,3	0,9	1,1
Фосфолипиды				
Триацилглице- рины (%)	4—8	11—12	50—60	84—87

количеством белка, характерна и более высокая плотность. Что касается  $\beta$ - и пре- $\beta$ -липопротеидов, то в связи со значительным содержанием в них липидов, достигающим 95 % от всей молекулярной массы, плотность этих липопротеидных комплексов оказывается сравнительно низкой. Поэтому становится возможным разделение упомянутых липопротеидных фракций различными методами.

## МЕТОДЫ ФРАКЦИОНИРОВАНИЯ ЛИПОПРОТЕИДОВ

Для выделения отдельных фракций липопротеидов применяют методы электрофореза на бумаге, ацетатцеллюлозе, в агаровом, крахмальном, полиакриламидном гелях.

Липопротеиды могут быть разделены и путем ультрацентрифугирования в солевых растворах различной плотности. При этом выделяются хиломикроны и липопротеиды разной плотности: очень низкой (ЛПОНП, пре- $\beta$ -липопротеиды), низкой (ЛПНП,  $\beta$ -липопротеиды), высокой (ЛПВП,  $\alpha$ -липопротеиды) и другие.

Используют также алкогольное фракционирование липопротеидов при низкой температуре (этаноловый метод Копа и его модификации).

Для обнаружения хиломикронов ВОЗ рекомендует метод наблюдения или выдерживания плазмы (1971). Он основывается на том, что при содержании хиломикронов или пре- $\beta$ -липопротеидов (ЛПОНП) в плазме в концентрации 300 мг/100 мл и более из-за рассеяния частицами света проба делается мутной или приобретает молочную окраску. Если плазму содержать в пробирке при температурном интервале от 0 до +4 °С в течение 18—24 ч, то хиломикроны поднимаются на поверхность, образуя видимый слой кремобразного вещества. Пре- $\beta$ -липопротеиды (ЛПОНП) остаются во взвешенном состоянии, что делает пробу мутной во всем объеме пробирки, и эта диффузная мутность свидетельствует о повышенной концентрации пре- $\beta$ -липопротеидов (ЛПОНП).

Иммунохимические способы исследования липопротеидов, радиоиммунное определение и изoeлектрическое фокусирование большого распространения не получили.

Гораздо большее применение нашли химические (турбидиметрические) методы определения концентрации липопротеидов. Большинство из них базируется на образовании гепаринлипопротеинового комплекса, способного осаждаться без денатурации в присутствии некоторых электролитов: хлористого кальция (Бурштейн и Самай, 1956) или хлористого марганца (О. Н. Никольская и В. П. Тихонов, 1968). В первом случае осаждаются почти чистые  $\beta$ -липопротеиды, во втором — вся фракция липопротеидов. По разнице этих определений можно найти содержание  $\alpha$ -липопротеидов. Наибольший интерес представляет простой и доступный для любой лаборатории турбидиметрический способ исследования  $\beta$ -липопротеидов по Бурштейну и Самаю, который в настоящее время является унифицированным. Нужно лишь отметить, что, по мнению ряда авторов, гепарин способен осаждать не только  $\beta$ -, но и пре- $\beta$ -липопротеиды (и даже хиломикроны). Кроме того, в качестве осаждающего средства можно использовать декстран-сульфат, амилопектин, поливинилпирролидин и другие вещества. Однако названные способы широко не применяются.

К турбидиметрическим способам относятся и исправные методы определения липопротеидов, которые включают в себя установление



содержания  $\beta$ -липопротеидов по Бурштейну и Самаю и холестерина — по реакции Либермана — Бурхарда (метод Ильяка с сотр. и др.). Использование при этом различных коэффициентов часто приводит к ошибочным результатам.

### Разделение липопротеидов методом зонального электрофореза

Принципы электрофоретического фракционирования. Электрофорез липопротеидов на бумаге — первый рутинный метод фракционирования липидно-белковых комплексов.

Техника постановки электрофореза липопротеидов на бумаге мало чем отличается от таковой при электрофоретическом разделении белков. Однако для фракционирования липопротеидов берут в 2—3 раза большее количество сыворотки, поскольку липиды окрашиваются труднее, чем белки. Обычно для проведения электрофореза рекомендуются употребить 0,05 мл сыворотки.

После высушивания бумажных лент их окрашивают растворами различных жирных красителей (судан черный, судан II, III, IV, осмевая кислота и другие). В лабораториях преимущественно используют судан черный Б. Большую часть красителей применяют в водно-спиртовом растворе (50—60 мл/100 мл).

В последнее время ряд авторов предлагает прибавлять краситель (судан черный) к испытуемой сыворотке перед осуществлением бумажного электрофореза.

В липопротеидограмме, полученной методом электрофореза на бумаге, как правило, различают три основные зоны.

Первая зона находится в месте расположения  $\alpha$ -глобулинов ( $\alpha$ -липопротеиды), вторая — в области  $\beta$ -глобулинов ( $\beta$ -липопротеиды), третья — недалеко от черты нанесения сыворотки (в зоне  $\gamma$ -глобулинов). Последняя содержит хиломикроны, которые не передвигаются под влиянием электрофореза, и называется липидным остатком.

Во фракции  $\alpha$ -липопротеидов сосредоточивается примерно 2/3 фосфолипидов и 40 % холестерина; во фракции  $\beta$ -липопротеидов находится около 60 % холестерина и 1/3 фосфолипидов. Липидный остаток представлен преимущественно нейтральными жирами. Примечательно, что добавление к веронал-мединаловому буферному раствору pH 8,6 (см. подраздел «Определение липопротеидов в сыворотке крови методом электрофореза на бумаге» — Реактивы) 1 % (от объема буфера) кристаллического человеческого альбумина и трилона Б (из расчета 0,37 г на 1 л раствора) улучшает качество разделения, позволяя получить и фракцию пре- $\beta$ -липопротеидов. Весьма хорошее разделение происходит и при применении буфера ТЭБ (трис-ЭДТА-борная кислота), в особенности если в него внести 1 % бычьего альбумина.

Электрофорез на ацетатцеллюлозных пленках в настоящее время широко используют в клинко-диагностических лабораториях за рубежом. Преимуществом его является четкое разделение липопротеидов на фракции и непродолжительность фракционирования.

Для осуществления электрофореза большое значение имеет выбор буфера и способ окраски. Одни авторы используют барбиталовый буфер (pH 8,6), другие предпочитают добавлять в барбиталовый буфер ЭДТА.

В последние годы появились работы о применении трис-глицинового и трис-барбиталового буферов при проведении зонального электрофореза.

Способы выявления липидно-белковых комплексов на электрофорсграммах. Для окраски липопротеидов, разделенных способом электрофореза на пленках из ацетатцеллюлозы, используют реактив Шиффа, масляный красный О (Oil red O), жировой красный 7В (Fat red 7В) и судан черный Б. Большинство исследователей отдает предпочтение масляному красному О (краску растворяют либо в смеси метанол-вода либо в смеси этанол-вода, взятых в разных соотношениях). Существенный недостаток метода — длительность выявления липидно-белковых комплексов. Более быстро происходит окрашивание жировым красным 7В. Хорошие результаты получены с использованием масляного красного О и судана IV. Считают, что предварительная окраска суданом черным Б делает невозможным электрофоретическое разделение липопротеидов на пленках из ацетатцеллюлозы.

Оценивают полученные данные на денситометре и результат выражают в процентах по отношению к общему количеству фракций.

Большинство авторов отмечают высокую чувствительность, удовлетворительную воспроизводимость и хорошую разделительную способность электрофореза в агарозном геле. Для фракционирования липопротеидов, как правило, применяют агарозный гель с концентрацией ниже 1%; разделение осуществляют чаще всего в барбиталовом буфере с добавлением альбумина; фракции окрашивают суданом черным Б или суданом III.

Разделение при помощи диск-электрофореза в полиакриламидном геле липопротеидов сыворотки крови, предварительно окрашенных суданом черным Б, основано не только на различной величине заряда молекул, но и на различных размерах частиц липопротеидов. Первые сообщения об использовании диск-электрофореза (ДЭФ) в ПААГ для определения фракций липопротеидов были опубликованы Нагауаи с соавт. (1965), указанные авторы применяли гель с однородной величиной пор. При сравнении способа электрофореза в двухслойном геле с концентрацией по акриламиду 3,125 и 4 г/100 мл была достигнута хорошая корреляция результатов с таковыми, полученными методом ультрацентрифугирования. Из других модификаций можно отметить методы Е. Я. Маграчевой, использовавшей четырехслойный и трехслойный гель, Т. Ф. Пироговой и Б. Л. Дундуре (1972, 1974, 1980), применивших свой вариант способа диск-электрофореза в ПААГ для разделения липопротеидов сыворотки крови. От метода Е. Я. Маграчевой их способ фракционирования липопротеидов отличается особенностями формирования разделительного геля, а именно: использованием более длинного его слоя, иной величины пор, изменением в способе полимеризации, увеличением длины концентрирующего геля. Все это позволило выявлять большее число липидно-белковых фракций: 6—10 фракций в зоне ЛПВП, 1—4 фракции в зоне ЛПНП, 1—3 фракции в зоне ЛПОНП.

Широкое внедрение в клиническую практику диск-электрофоретического исследования сывороточных липопротеидов сдерживается трудностью оценки гелеграмм.

Количественный учет всех обнаруженных фракций мы производим путем обработки денситограмм, полученных при записи диск-электрофорегрмм липопротеидов сыворотки крови на микроденси-

тометре в проходящем свете. Содержание каждой фракции может быть выражено в процентах по отношению к суммарному их представителю в геле. Допустимо также оценивать результаты на денситометре БИАН-170, ERI-65, если изменить устройство каретки и приспособить ее для денситометрии гелей в стеклянных трубках. Л. В. Джикня предложил денситометрировать (БИАН-170) отдельно две половины гелевого столбика и складывать полученные значения для каждой фракции. Некоторые авторы рекомендуют осуществлять элюирование из ПААГ связанного с липидами красителя с помощью тритона X-100 и твина-80. При проведении электрофореза в прерывистом двухслойном геле можно производить количественную оценку результатов элюированием смесью этанол — ледяная уксусная кислота (3 : 1).

Мы осуществляли запись электрофореграмм гелей в тех же стеклянных трубках, которые помещали в аппарат для разделения липопротеидов. С этой целью использовали универсальный микроденситометр, собранный на базе микроскопа, источника высоковольтного стабилизированного напряжения типа ВС-22, ФЭУ-35, усилителя постоянного тока И-37, согласованного с самописцем И-37.

Большое значение для проведения электрофореза имеет правильное взятие крови у больных. Рекомендовано у них брать кровь после 12—14-часового голодания утром натощак. Можно исследовать сыворотку или плазму крови. Наилучшим является осуществление электрофореза в день взятия крови.

Сыворотку или плазму можно хранить при +4 °С в течение 4 или 5 дней (с добавлением к крови ЭДТА, рекомендованного в качестве консерванта). В. Н. Титовым с соавт. (1978) было показано, что уже на 4-й день хранения сыворотки (+4 °С) в процессе электрофореза липопротеидов на агарозе отмечаются качественные изменения спектра по сравнению с таковым при применении свежей сыворотки. Добавление в свежую сыворотку крови ЭДТА (1 мг динатриевой соли ЭДТА на каждый мл сыворотки) способствует стабилизации фракций липопротеидов. Однако и при соблюдении указанного условия не следует хранить сыворотку крови более 3 дней. По вопросу о замораживании пробы нет единого мнения. Некоторые авторы считают, что однократное замораживание и хранение пробы при —70 °С больше 1 мес не вызывает изменений во фракциях. Другие авторы полагают, что замороженные пробы нельзя использовать, так как липопротеиды очень низкой плотности и хиломикроны при этом агрегируют и подвергаются разрушению.

#### Определение липопротеидов

в сыворотке крови методом электрофореза

на бумаге (Сван, 1953; Л. К. Бауман, 1961; В. Г. Колб, 1970)

Принцип метода сводится к электрофоретическому разделению на фракции предварительно окрашенных суданом черным липопротеидов сыворотки крови с последующим определением оптической плотности извлеченной краски и вычислением процентного соотношения между  $\alpha$ - и  $\beta$ -липопротеидами.

**Реактивы.** 1. Веронал-мединаловый буфер, рН 8,6. 10,32 г медиала и 1,84 г веронала растворяют в 1 л дистиллированной воды.

2. Насыщенный раствор судана черного. 100 мг судана черного

растворяют в 3 мл 96° этилового спирта (хранить в темной склянке на холоде).

3. Смесь абсолютного этилового спирта с ледяной уксусной кислотой в соотношении 4 : 1.

4. Бумага марки «хроматографическая быстрая».

**Ход определения.** В центрифужную пробирку вносят 0,5 мл свежеполученной (негемолизированной) сыворотки, добавляют 0,05 мл раствора судана черного. При необходимости можно увеличить или уменьшить количество сыворотки для анализа, но соотношение 10 : 1 должно быть строго соблюдено. Пробу перемешивают и оставляют на 1 ч при комнатной температуре. Окрашенную сыворотку центрифугируют при 2500 об/мин в течение 30 мин, сливают с осадка и 0,05 мл ее наносят у катода на горизонтально расположенную полосу хроматографической бумаги шириной 5 см так, чтобы сыворотку не доводить до краев ленты на 1 см. Лучше помещать окрашенную сыворотку на смоченные в веропал-мединаловом растворе ленты, просушенные между двумя листами фильтровальной бумаги.

Камеру закрывают и аппарат включают в сеть. Электрофорез проводят при напряжении 250—300 В и силе тока 0,25 мА на 1 см ширины полосы бумаги в течение 4—4,5 ч. За процессом можно следить визуально — по характеру продвижения окрашенных фракций  $\alpha$ - и  $\beta$ -липопротеидов. По окончании электрофореза ленты сушат на воздухе, а затем в течение 15 мин — в сушильном шкафу, предварительно нагретом до +100 °С. После этого бумажные полоски нарезают на фракции и измельчают на маленькие кусочки. Для контроля вырезают кусочек фона ленты. Полоски, содержащие опытные и контрольную пробы, переносят в отдельные пробирки, которые заливают 5 мл смеси этапола с уксусной кислотой и выдерживают в течение 1 ч (периодически встряхивая). Колориметрируют на спектрофотометре или ФЭКе (длина волны 595 нм), в последнем случае используют кюветы с шириной слоя 5 мм.

Сумму экстинкции двух фракций принимают за 100 %, а каждой — за х. Результаты выражают в относительных процентах.

По данным В. Г. Колба, средние значения содержания  $\alpha$ - и  $\beta$ -липопротеидов (при проведении электрофореза у 33 доноров) составляют 28,5 и 71,5 %.

#### Определение липопротеидов сыворотки крови методом электрофореза в полиакриламидном геле (по Е. Я. Маграчевой, 1973)

**Реактивы.** Приготовление реактивов описано в подразделе «Методика диск-электрофоретического фракционирования белков сыворотки крови».

Для формирования гелей используют растворы 1, 2, 3, 4 (с ТЕМЕД вместо 1 моль/л  $H_3PO_4$ ), 5, 6, 7. Кроме того, применяют: 1. Насыщенный раствор судана черного Б в этиловом спирте. 100 мг препарата растворяют в 10 мл спирта (размешивают стеклянной палочкой, центрифугируют 30 мин при 3000 об/мин и фильтруют через бумажный фильтр, смоченный спиртом).

2. Триглицидный буфер, рН 8,3 (основной раствор): триг — 6,0 г, глицин — 28,8 г,  $H_2O$  дистиллированная — до 1000 мл.

В работе применяют рабочий буферный раствор, приготовленный

10-кратным разведением основного раствора буфера. Для этого 200 мл основного раствора доводят дистиллированной водой до 2000 мл, 1 л рабочего буферного раствора вливают в верхнюю камеру, 1 л — в нижнюю. Верхний и нижний буферные растворы нельзя сливать вместе, их следует хранить в отдельных сосудах в холодильнике. Рабочие буферные растворы годны для использования до 3 раз! Основные растворы держат в холодильнике на протяжении 4 мес.

**Ход определения.** Стеклянные трубочки перед заполнением их гелем хорошо обезжиривают (для чего моют теплой водой с мылом) и высушивают. Устанавливать их в штативе нужно строго вертикально.

1-й слой гелей — с концентрацией по акриlamиду 10 г/100 мл, объем его, приходящийся на каждую трубочку, — 0,75 мл.

Пропись приготовления геля. 2 мл реактива 1 (1 объем), 5,6 мл реактива 2 (2,8 объема), 0,4 мл дистиллированной воды (0,2 объема), 8 мл реактива 3 (4 объема).

На поверхность нижнего слоя очень осторожно (с помощью шприца) наносят (медленно, по стенке трубочки) 0,2 мл дистиллированной воды, чтобы предупредить образование мениска. Этот слой геля полимеризуют при комнатной температуре в обычных условиях. Параллельно готовят разделяющий гель с концентрацией по акриlamиду 5 г/100 мл.

2-й слой гелей — с концентрацией акриlamиды 5 г/100 мл, объем смеси, приходящийся на каждую трубочку, — 0,53 мл.

Пропись приготовления геля. 1 мл реактива 1 (1 объем), 1,36 мл реактива 2 (1,36 объема), 1,64 мл дистиллированной воды (1,64 объема), 4 мл реактива 3 (4 объема).

После того как нижний слой геля заполимеризуется (при этом будет видна граница раздела), резким движением вытряхивают воду из трубочек, приливают в каждую трубочку приблизительно по 0,2 мл раствора для формирования 2-го геля и смывают им воду, то есть после внесения его удаляют. И лишь затем доливают по 0,53 мл 2-го геля в трубочку для полимеризации. На поверхность этого геля из шприца, соединенного с полихлорвиниловым капилляром, очень осторожно наносят по 0,2 мл дистиллированной воды и оставляют колонки при комнатной температуре для полимеризации в обычных условиях.

С целью образования в трубках 1-го и 2-го геля используют одну и ту же пипетку (для разделяющего геля).

3-й слой гелей — с концентрацией акриlamиды 3 г/100 мл, объем его — 0,33 мл на каждую трубочку.

Пропись приготовления геля. 1 мл реактива 1 (1 объем), 2 мл реактива 5 (2 объема), 1 мл реактива 6 (1 объем), 4 мл реактива 7 (4 объема).

Поверх третьего слоя геля наносят 0,2 мл дистиллированной воды. Воду следует насаивать осторожно (как и гели), иначе поверхность гелей окажется неровной. Трубочки с гелями устанавливают под лампу дневного света на 1,5 ч. После полимеризации воду резким движением удаляют и насаивают 4-й слой концентрирующего геля.

4-й слой гелей — с концентрацией акриlamиды 3 г/100 мл. Объем смеси, приходящийся на каждую трубочку, — 0,30 мл.

Пропись приготовления геля. 1 мл реактива 4 (1 объем), 2 мл

реактива 5 (2 объема), 1 мл реактива 6 (1 объем), 4 мл реактива 7 (4 объема).

Поверх слоя концентрирующего геля наносят из шприца по 0,2 мл дистиллированной воды и полимеризуют его под лампой дневного света в течение 1,5 ч. Штатив с трубками устанавливают на расстоянии 30 см от самой лампы.

К 0,3 мл сыворотки добавляют 0,15 мл реактива 7 (сахарозы), 1 каплю (0,05 мл) реактива 4 и 3 капли судана черного Б (каждую каплю (0,05 мл) наносят из обычной пипетки). Пробы хорошо встряхивают и оставляют на 1 ч при комнатной температуре. Затем центрифугируют 30 мин при 3000 об/мин. 0,05 мл окрашенной сыворотки очень осторожно (при помощи пипетки с грушей на 0,1 мл) спускают по внутренней поверхности стеклянной трубки на концентрирующий гель. В блокнот записывают номер сыворотки (или фамилию больного) и соответствующий ей номер трубочки. Сверху трубочки осторожно заполняют рабочим раствором буфера. Затем их помещают в аппарат, заливают снизу и сверху триглицидным буфером по 1000 мл. Электрофорез длится сначала 15 мин при силе тока 2 мА на трубочку, затем 50 мин при силе тока 5 мА на трубочку. Аппарат выключают, стеклянные трубочки с гелями вынимают, помещают в лоток, заливают буферным раствором и оставляют стоять на сутки для более четкого разделения фракций.

**Количественная оценка диск-электрофореграмм  
липопротеидов сыворотки крови  
(В. С. Камышников, В. Г. Колб, 1976)**

Необходимость объективной оценки диск-электрофореграмм липопротеидов обуславливается все более широким внедрением метода Davis и Orstein в модификации Е. Я. Маграчевой и других авторов в клиническую практику. Простота исследования, возможность использования доступных приборов и реактивов, выпускаемых отечественными предприятиями и фирмой «Реанал», выделение большего количества (чем при проведении электрофореза на бумаге) уже идентифицированных фракций позволяют рассматривать этот способ как весьма перспективный для оценки спектра липопротеидов сыворотки крови. Немаловажно, что им обнаруживаются все те компоненты, которые необходимы для типирования гиперлиппротеидемий по рекомендованной экспертами ВОЗ и принятой у нас в стране классификации.

Опыт работы показывает, что типирование гиперлиппротеидемий возможно даже путем визуальной оценки выраженности некоторых из разделяемых фракций, что само по себе создает предпосылки для более широкого распространения данного метода в условиях обычных клинико-диагностических лабораторий. Вместе с тем указанный способ учета результатов, не лишенный элементов субъективизма, не позволяет установить количественные закономерности в изменении спектра липопротеидов и как бы оставляет вне поля зрения ряд других фракций, могущих представлять интерес для клиницистов. Отсюда становится понятным, насколько важна разработка простого и надежного способа количественной оценки липопротеидограмм, получаемых при диск-электрофорезе в полиакриламидном геле. Применение метода элюции отдельных липопротеидных фракций (с

предварительным разрушением структуры полнакриламидного геля додецилсульфатом натрия или другими веществами) затрудняется тем, что при извлечении из стеклянной трубки многослойного геля происходит его разрушение.

Для количественной оценки липопротеидограмм мы воспользовались одним из классических методов обработки денситограмм применительно к полученным при записи на микроденситометре фракциям липопротеидов. Кривую делили на ряд участков, соотносящихся с отдельными фракциями. На однородной, плотной, полупрозрачной бумаге тонко отточенным карандашом делали копии кривых с соответствующими разметками. Намеченные участки бумаги вырезали и взвешивали на торсионных весах. Полученную сумму принимали за 100 % и по известной пропорции рассчитывали массу каждого пика бумаги, характеризующего ту или иную фракцию. Ответ давали в относительных процентах, аналогично выражению результатов способом проведения электрофореза на бумаге.

Средние значения всех выделенных фракций липопротеидов составляют: для альбуминов, связанных с неэстерифицированными жирными кислотами (НЭЖК), — 12,94,  $\alpha$ -липопротеидов ( $\alpha$ -ЛП) — 44,98,  $\beta$ -липопротеидов ( $\beta$ -ЛП) — 27,40, хиломикрон — 14,68 %. Небезынтересно, что у здоровых людей фракцию пре- $\beta$ -липопротеидов (пре- $\beta$ -ЛП) мы практически не выявляли. Фракция  $\alpha$ -ЛП оказалась неразделенной на подфракции всего лишь у 6 (5 %) из 118 человек. У 94 (80 %) из 118 человек она разбилась на две подфракции — а и б — со средними значениями соответственно 23,83 и 21,24 %. У 18 (15 %) из 118 доноров фракция  $\alpha$ -ЛП разделилась на три подфракции: а, б, с со средними значениями 18,29; 10,94 и 15,75 %. Фракция  $\beta$ -ЛП оказалась однородной у 49 (41,5 %) из 118 человек. У 68 (57,6 %) из 118 доноров фракция  $\beta$ -ЛП разбилась на две подфракции: а и б со средними значениями 23,00 и 5,90 %, и лишь у одного человека (0,85 %) она разграничилась на три подфракции — а, б, с. Распределение  $\alpha$ -ЛП и  $\beta$ -ЛП на 2—3 подфракции по обе стороны границы слоев полнакриламидного геля с различной концентрацией может быть проявлением молекулярной гетерогенности липопротеидов. При сравнении спектров липопротеидов сыворотки крови здоровых мужчин и женщин у первых отмечено более высокое содержание  $\beta$ -ЛП. Существенных различий во фракционном составе липопротеидов сыворотки крови у обследованных разного возраста не выявлено.

Учитывая, что при проведении диск-электрофореза фракция хиломикрон иногда обнаруживается в виде воронкообразно измененной полосы, несколько искажающей результаты денситометрического учета электрофореграмм, мы сочли целесообразным в дальнейшем не принимать в расчет указанный компонент, который к тому же не является, по нашему мнению, липопротеидом в строгом смысле этого слова. Действительно, формируясь в клетках слизистой оболочки кишечника, хиломикроны представляют собой довольно крупные частицы, имеющие своеобразную архитектуру: в полости, отграниченной от окружающей среды белково-липидным слоем, содержится огромное количество молекул триацилглицерин и некоторых других липидов. Вместе с тем нам кажется вполне возможным отнести к липопротеидам фракцию белков, связанных с неэстерифицированными жирными кислотами (НЭЖК). Таким образом, в дальнейшем мы оценивали диск-электрофореграммы липопротеидов на основании уч-



та содержания альбуминов, комплексированных с НЭЖК; фракций (и подфракций)  $\alpha$ -липопротеидов; фракций (и подфракций)  $\beta$ -липопротеидов; фракций пре- $\beta$ -липопротеидов и некоторых других, выявляемых лишь при патологических состояниях и занимающих место либо впереди, либо несколько позади фракции пре- $\beta$ -липопротеидов.

Разумеется, на результатах количественной оценки диск-электрофореграмм липопротеидов сыворотки крови в норме и при патологических состояниях не могли не сказаться особенности выделения фракций липидно-белковых комплексов в многослойном полиакриламидном геле, условия осуществления их денситометрической записи, конструкция регистрирующего прибора и способ количественного учета результатов. Однако мы склонны считать, что при одинаковых условиях проведения анализа получаемые относительные величины позволяют гораздо более объективно (в сравнении с визуальным контролем) оценить изменения в распределении липидно-белковых комплексов сыворотки крови, что открывает большие возможности для установления количественных закономерностей в сдвигах соотношений между фракциями липопротеидов под влиянием патологического процесса.

При исследовании патощак 118 практически здоровых людей (75 мужчин и 43 женщины в возрасте от 18 до 55 лет) было выявлено, что содержание в сыворотке крови альбуминов, связанных с НЭЖК, составляет у доноров  $15,1 \pm 0,3$  %,  $\alpha$ -ЛП —  $52,5 \pm 0,6$  %,  $\beta$ -ЛП —  $32,6 \pm 0,8$  %. Фракцию пре- $\beta$ -ЛП у здоровых людей мы не обнаружили. Фракция  $\alpha$ -ЛП оказалась неразделенной на подфракции у 6 из 118 человек (5 %). У 94 из 118 доноров (80 %) она сгруппировалась на две подфракции — а и б — со средними значениями  $28,3 \pm 0,9$  и  $24,2 \pm 1,2$  % соответственно. У 18 из 118 человек (15,2 %) фракция  $\alpha$ -ЛП разделилась на три подфракции — а, б и с со средними значениями  $21,6 \pm 1,9$  %;  $12,8 \pm 1,5$  % и  $18,6 \pm 2,0$  %. Фракция  $\beta$ -ЛП оказалась однородной у 49 из 118 доноров (41,5 %). У 68 из 118 человек (57,6 %) фракция  $\beta$ -ЛП сгруппировалась на подфракции а и б со средними значениями  $27,2 \pm 0,75$  % и  $7,5 \pm 0,54$  %, и лишь у одного исследуемого (0,85 %) она разделилась на три подфракции — а (38,1 %), б (6,5 %) и с (3,2 %).

Сравнение спектра липопротеидов сыворотки крови здоровых мужчин и женщин не выявило существенных половых и возрастных различий.

И. А. Людвичек с соавт. (1979), также фотометрируя диск-электрофореграммы липопротеидов непосредственно в трубках с помощью отечественного микрофотометра ИФО-451, показали, что количественным критерием фракций липопротеидов может служить только площадь, ограниченная кривой изменения светового потока. При использовании денситометра обычной конструкции и обработке денситограмм по полученным кривым амплитуда и ширина пиков липопротеидограммы оказываются менее информативными. Интересно, что проведение авторами фотометрирования с помощью лазерной установки, состоящей из оптического квантового генератора ЛГ-56 с длиной излучения 632,8 нм, механизма перемещения электрофореграммы, фоторегистрирующего прибора и шлейфового осциллографа Н-117, приводило к получению таких электрофореграмм, в которых обнаруживалась высокая степень корреляции с данными биохимического анализа как площади, ограниченной кривой изменения светового потока, так и ширины фракции. Используя в своей работе оптиче-

ский квантовый генератор ЛГ-52-3 для денситометрирования диск-электрофорограмм гликопротеидов, мы вполне разделяем мнение авторов о том, что данный метод заслуживает самого серьезного внимания и нуждается в дальнейших исследованиях.

**Определение фракционного состава  
липопротеидов сыворотки крови  
в геле одной концентрации (В. Г. Колб, А. Д. Таганович,  
Г. Л. Гуревич, 1979)**

В основу настоящей методики мы положили принцип разделения основных фракций липопротеидов в геле одной концентрации с использованием в качестве концентрирующего геля предварительно набухшего сефадекса.

**Реактивы и гели.** 1. Необходимо иметь хорошо очищенный реактив акриламида. В случае неудовлетворительных результатов акриламид перекристаллизовывают: 1 г акриламида растворяют в 100 мл хлороформа при  $+50^{\circ}\text{C}$ . Горячий раствор профильтровывают, охлаждают до комнатной температуры, а затем ставят на несколько часов в холодильник. Выпавшие кристаллы отфильтровывают через бюхнеровскую воронку, промыв их затем несколькими порциями охлажденного хлороформа. Сушат их на воздухе. Водный раствор из перекристаллизованного акриламида имеет рН 5,1—5,3. При рН ниже 4,7 акриламид следует снова перекристаллизовывать, так как акриловая кислота, снижающая рН, уменьшает электрофоретическую подвижность ЛП.

2. NN'-метиленбисакриламид (МБА, или БИС). Недостаточно чистый препарат также должен быть перекристаллизован: 10 г порошка растворяют в 1 л ацетона при нагревании смеси в водяной бане с температурой  $+45$ — $50^{\circ}\text{C}$ . Горячий раствор фильтруют, охлаждают, ставят в холодильник. Выпавшие кристаллы отфильтровывают и промывают ацетоном. Сушат их на воздухе.

3. Трис(оксиметил)аминометан (трис).

4. N N N' N'-тетраметилэтилендиамин (ТЕМЕД).

5. 1 н раствор HCl.

6. Раствор персульфата аммония (140 мг в 100 мл дистиллированной воды).

7. Электродный буфер. 0,6 г триса и 2,88 г глицина растворяют в 1 л дистиллированной воды (рН 8,3). рН 500 мл буфера доводят до 9,2 1 н NaOH.

8. Сефадекс G-200.

9. Этиловый спирт.

10. Насыщенный раствор судана черного Б в этиловом спирте. 1 г препарата растворяют в 10 мл этилового спирта. Полученный раствор переливают в центрифужную пробирку и центрифугируют 25—30 мин при 3000 об/мин. После этого надосадочный раствор переливают в темную посуду и хранят при комнатной температуре.

Все растворы после приготовления фильтруют и держат в склянках из темного стекла при  $+4^{\circ}\text{C}$  до 2—3 мес, кроме персульфата аммония, который хранят не более 7—8 дней. Состав растворов для получения гелей приведен в табл. 33.

Если рН растворов А и Б окажется выше обозначенного в табл. 33, доливают несколько капель 1 н HCl для доведения рН раствора до нужной величины.

Табл. 33. Состав растворов для приготовления гелей

Раствор А	Раствор Б	Раствор В
1 н НСl — 24 мл	1 н НСl — 48,0 мл	Акриламид — 12,0 г
Трис — 18,3 г	Трис — 5,98 г	БИС-акриламид —
ТЕМЕД — 0,23 мл	ТЕМЕД — 0,46 мл	0,6 г
H <sub>2</sub> O дист.— до 100 мл, рН 8,9	H <sub>2</sub> O дист.— до 100 мл, рН 6,7	H <sub>2</sub> O дист.— до 100 мл

Рабочий раствор готовят из исходных растворов непосредственно перед использованием (исходные реагенты предварительно нагревают до комнатной температуры). Схема приготовления рабочего раствора: 1 объем раствора А, 1 объем раствора В, 1 объем раствора персульфата аммония — 0,25 г/100 мл, 1 объем дистиллированной воды.

В качестве концентрирующего геля можно использовать сефадекс, замоченный в течение 1—2 сут в разбавленном в 8 раз растворе Б. Основным достоинством этого способа является то, что в таком геле при проведении электрофореза никогда не образуется воронки. При надобности (например, перед денситометрированием) его легко можно удалить из трубочки струей обычной водопроводной воды, не повредив при этом разделяющего геля.

Заполнение стеклянных трубочек происходит следующим образом. Рабочий раствор, состав которого описан выше, пипеткой или шприцем с длинной иглой разливают равными объемами (2 мл) в вертикально укрепленные стеклянные трубочки (длина — 100 мм, диаметр — 6 мм). Если отсутствует специально приспособленная для этих целей подставка фирмы «Реанал», необходимо герметично закрыть нижний конец трубочки и после этого укрепить ее в вертикальном положении. На слой формируемого геля приливают дистиллированную воду на уровень 3—4 мм (для получения горизонтальной поверхности), которую отсасывают после окончания полимеризации геля. Гель полимеризуют при комнатной температуре в течение 30—35 мин. После окончания этого процесса и отсоса воды шприцем с длинной иглой насаивают на поверхность геля предварительно набухший сефадекс объемом 0,2 мл.

Ход исследования. К 0,2 мл сыворотки добавляют 0,06 мл раствора Б и 1 каплю насыщенного раствора судана. После этого пробы оставляют на 3 ч при комнатной температуре в темноте. Затем окрашенные сыворотки центрифугируют при 3000 об/мин 25 мин. После этого надосадочную жидкость переливают в другую пробирку.

Электрофорез проводят в приборе фирмы «Реанал». При отсутствии фабричного прибора склеивают прямоугольную камеру из оргстекла, в дне которой по окружности прожигают круглые отверстия диаметром 12 мм, чтобы в них могли войти резиновые пробки с отверстиями для трубок. Аналогичное отверстие делают для электрода. В качестве нижней камеры используют стеклянный сосуд, глубиной превышающий длину трубок.

Электрод для осуществления электрофореза может иметь в ка-

честве анодного конца тонкую платиновую проволоку (толщина — 0,1 мм, длина — 3 см), а на катодном конце — аналогичную по размерам стальную или платиновую проволоку. Готовый электрод, помещенный в стеклянную трубочку диаметром 5—6 мм, герметично закрывают на анодном (нижнем) конце. Катод и анод выводят из стеклянной трубочки на выпрямитель тока.

Для проведения электрофореза трубочки с гелями укрепляют в электрофоретической камере. Подготовленную смесь, содержащую окрашенную сыворотку, осторожно наслаивают на верхний гель, а оставшуюся часть трубочки заполняют электродным триглицидным буфером (рН 9,2) так, чтобы образовался выпуклый мениск. Затем осторожно заливают всю верхнюю камеру. Нижнюю камеру заполняют буфером предварительно (рН 8,3). Разделение ведут от катода к аноду. Сила тока — 5 мА на трубочку. Смешивать катодный и анодный буфер не рекомендуется. Буфер может быть использован до 10 раз.

В результате электрофореза в течение 45—60 мин липопротенды разделяются на основные фракции: хиломикроны остаются на старте с избытком красителя; пре-β-ЛП располагаются на расстоянии 2—4 мм от входа в разделяющий гель; за ними на расстоянии 1—2 см находятся β-ЛП. Дальше всего от старта локализуются α-ЛП. Иногда β-ЛП делятся на две подфракции.

Находящиеся в стеклянных трубочках диск-электрофореграммы липопротендов подвергали прямой денситометрии. Содержание липопротендных фракций у 50 доноров в сыворотке крови, взятой натощак, для пре-β-ЛП составляло  $11,58 \pm 0,67\%$ , для β-ЛП —  $52,11 \pm 1,78\%$ , для α-ЛП —  $36,31 \pm 0,95\%$ .

#### Электрофорез липопротендов в геле агарозы

(В. Н. Титов, И. Г. Кантраджян, И. К. Филиппов, 1978)

Характерными особенностями данного метода являются: 1) окрашивание липопротендов сыворотки крови до проведения электрофореза, 2) использование буфера с коммерческим (а потому доступным) альбумином, содержащим жирные кислоты, 3) применение для разделения липопротендов отечественного прибора ПЭФ-3 и отечественных реактивов.

**Реактивы.** 1) веронал, 2) медиал, 3) лиофилизированный альбумин человека, 4) агароза марки «А» отечественного производства, 5) судан черный Б, 6) этиленгликоль, 7) уксусная кислота ледяная, 8) этиловый спирт 96°.

Для приготовления буфера 1,34 г веронала растворяют в 600 мл дистиллированной воды, добавляют 10,3 г медиала. После остывания раствора объем доводят водой до 1 л (рН буфера 8,6, ионная сила 0,05).

Для получения раствора альбумина 1 г лиофилизированного альбумина человека вносят в 200 мл вероналового буфера.

Для приготовления геля агарозы 0,32 г агарозы марки «А» растворяют в 20 мл дистиллированной воды при кипячении. После этого стакан с раствором агарозы помещают в водяной термостат с температурой +50—55 °С, доливают в него 20 мл раствора альбумина и все содержимое перемешивают. 3 мл раствора агарозы наносят пипеткой на предварительно обезжиренное и горизонтально установ-

ленное предметное стекло. Для образования лунки в агарозном геле в еще не застывший гель помещают металлический стержень длиной 20 мм и диаметром 2 мм, который после застывания геля удаляют магнитом.

Для получения красящего раствора 200 мг судана В растворяют в 20 мл этиленгликоля, помещая сосуд в кипящую водяную баню. Насыщенный раствор судана В, не давая ему остыть, фильтруют через бумажный фильтр и хранят длительное время в сосуде из темного стекла.

**Ход проведения исследования.** 1. Окраска липопротеидов сыворотки крови и нанесение ее на слой агарозы. К 0,3 мл сыворотки в пробирке добавляют 3 капли насыщенного раствора красителя, содержимое пробирки перемешивают и оставляют в темном месте на 1 ч. По истечении указанного времени к окрашенной пробе доливают 0,2 мл теплого раствора агарозы, смесь прогревают в термостате при температуре  $+50-55^{\circ}\text{C}$  и капиллярным концом подогретой пипетки наносят в желобок в агарозном геле, заполняя его полностью, после чего дают пробе застыть.

2. Фракционирование липопротеидов. Восемь штук предметных стекол помещают в электрофоретическую камеру слоем агарозы вниз, при этом слой сыворотки крови на стекле располагают у катода. Разделение проводят в камере, находящейся в холодильнике в течение 1 ч (напряжение — 100 В, сила тока — 40—45 мА на все 8 стекол). Непосредственно после фореаза в геле четко видны фракции липопротеидов. Фореграммы фиксируют в уксусной кислоте (5 г/100 мл) на протяжении 1 ч, затем стекла располагают на 20 мм между двумя листами фильтровальной бумаги, смоченной 96° этанолом, после чего их оставляют сохнуть. Буфер, помещенный в электрофоретическую камеру, может быть использован многократно, однако при этом желательно менять полярность погруженных в него электродов. Электрофореграммы сохраняются неограниченно долго.

3. Количественная обработка диск-электрофореграммы. Авторы метода осуществляли денситометрию на отечественном денситометре БИАН-170. Указанная модель денситометра снабжена интегратором, что позволяет рассчитать процентное соотношение фракций липопротеидов. Таким образом, модифицированный способ электрофореза липопротеидов позволяет использовать серийно выпускаемое оборудование и доступные реактивы. Этот метод по сравнению с разделением липопротеидов в геле полиакриламида менее трудоемок, электрофореграммы могут храниться неограниченно долго.

Разделение липопротеидов в агарозном геле дает возможность идентифицировать все основные классы белково-липидных комплексов — хиломикроны,  $\beta$ -ЛП, пре- $\beta$ -ЛП и быстрее всех движущиеся  $\alpha$ -ЛП, а также фенотипировать гиперлиппротеидемии (см. «Клинико-диагностическое значение исследования липопротеидов в сыворотке крови»).

#### **Метод определения холестерина липопротеидов высокой плотности ( $\alpha$ -холестерина)**

**Принцип.** Метод основан на способности липопротеидов низкой и очень низкой плотности в противоположность липопротеидам высокой плотности образовывать нерастворимые комплексы с гепарином

в присутствии ионов марганца. В надосадочной жидкости, оставшейся после осаждения  $\beta$ -ЛП и пре- $\beta$ -ЛП и заключающей фракцию  $\alpha$ -ЛП, определяют содержание  $\alpha$ -ХС.

Реактивы. 1. 1 моль/л раствора хлористого марганца (19,791 г  $MnCl_2 \cdot 4H_2O$  растворить в 100 мл дистиллированной воды).

2. Гепарин с содержанием 5000 ЕД в 1 мл (гепарин фирмы «Гедеон Рихтер», Венгрия).

3. Все реактивы, необходимые для проведения цветной реакции Либермана — Бурхарда по методу Abell или Илька (см. описание методики в разделе «Холестерин»).

Кровь для анализа  $\alpha$ -ХС берут у обследуемого утром натощак через 12—14 ч после последнего приема пищи. В течение двух недель до взятия крови необходимо исключить использование большим лекарственных препаратов, влияющих на липидный обмен.

Для анализа можно применять как сыворотку крови, так и плазму. Для получения плазмы крови берут этилендиаминтетрауксусную кислоту (ЭДТА) в качестве антикоагулянта (1 мг сухой динатриевой соли ЭДТА на 1 мл крови). ЭДТА связывает ионы тяжелых металлов, стимулирующие аутоокисление липидов. Взятая цельная кровь может храниться при  $+4^\circ C$  не более 3 ч. Плазму получают центрифугированием при 1500 г в течение 30 мин. Ее можно держать в холодильнике при  $+4^\circ C$  до семи суток. Замораживание плазмы не влияет на определение общего холестерина и триацилглицеринов, но является нежелательным при разделении разных фракций липопротеидов с целью последующего исследования  $\alpha$ -липопротеидного холестерина.

Ход определения. 1. К 1 мл плазмы с помощью стеклянной микропипетки (класса А) добавляют 0,04 мл раствора гепарина, содержащее пробирки перемешивают в течение 10 с путем ее встряхивания вручную или с помощью автоматического смесителя.

2. К смеси доливают 0,05 мл раствора  $MnCl_2$ , после чего ее медленно начинают перемешивать на протяжении 10 с.

3. Содержимое пробирки оставляют в ледяной бане на 30 мин, затем пробирки центрифугируют ( $+4^\circ C$ ) в течение 30 мин при 1500 г. Для расчета числа оборотов при заданном числе г (ОЦУ) используют формулу:

$$n = \frac{30}{\pi} \cdot \sqrt{\frac{980 g}{r}},$$

где  $n$  — число оборотов в мин;  $r$  — радиус ротора центрифуги (см); 980 ( $cm \cdot s^{-1}$ ) — гравитационная постоянная г; ОЦУ — относительное центробежное ускорение, выражаемое количеством г (в данном случае 1500);  $\pi$  — константа (3,14).

Следует обратить внимание на то, чтобы температура, при которой идет преципитация  $\beta$ -ЛП и пре- $\beta$ -ЛП, не была ниже  $0^\circ C$  во избежание замораживания раствора и нарушений в структуре ЛП, приводящих к ошибкам в определении  $\alpha$ -холестерина. Возрастание температуры при центрифугировании выше  $+4^\circ C$  может также способствовать неполному осаждению.

4. После центрифугирования осторожно отсасывают надосадочную жидкость, содержащую  $\alpha$ -ЛП. При выполнении этой процедуры рекомендуется пользоваться пастеровской пипеткой с оттянутым концом и резиновым наконечником.

5. 0,5 мл полученной таким образом надосадочной жидкости применяют для установления в ней  $\alpha$ -ХС методом Abell с соавт. При этом возможно использование как ручного метода Abell с соавт., так и определение ХС на автоанализаторе «Technicon A. A. II». В клинических исследованиях может быть применен метод Илька.

6. При окончательном расчете результаты умножают на поправочный коэффициент 1,09, учитывающий степень разведения плазмы при добавлении к ней реактивов в указанных выше количествах во время преципитации пре- $\beta$ -ЛП и  $\beta$ -ЛП.

7. При работе с липемическими сыворотками осаждение может быть неполным, чтобы избежать этого, плазму нужно разбавлять в 2 раза физиологическим раствором (0,85 г/100 мл) NaCl.

### Определение содержания $\beta$ - и пре- $\beta$ -липопротеидов сыворотки крови турбидиметрическим методом (по Бурштейну и Самаю)

**Принцип метода.** В присутствии  $\text{CaCl}_2$  и гепарина нарушается коллоидная устойчивость белков сыворотки крови, в связи с чем осаждаются  $\beta$ - и пре- $\beta$ -липопротеиды. Гепарин способен образовывать с  $\beta$ -липопротеидами комплекс, который под действием хлористого кальция выпадает в осадок. По степени помутнения раствора и судят о концентрации  $\beta$ - и пре- $\beta$ -липопротеидов в сыворотке.

**Реактивы.** 1. 0,025 моль/л раствора  $\text{CaCl}_2$ . Этот реактив может быть приготовлен из ампулированного раствора хлористого кальция или путем доведения 9,7 мл 10 г/100 мл раствора  $\text{CaCl}_2$  (19,4 мл 5 г/100 мл раствора  $\text{CaCl}_2$ ) дистиллированной водой до 350 мл. Следует лишь помнить, что большинство ампул содержит препарат кристаллического хлористого кальция ( $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) в концентрации 10 г/100 мл, который фактически содержит 5 г  $\text{CaCl}_2$  в 100 мл жидкости. К 1 мл 10 г/100 мл раствора кристаллической соли добавляют 17 мл воды.

2. Гепарин активностью 1000 ЕД в 1 мл.

**Ход определения.** В правую и левую кювету фотоэлектроколориметра с шириной рабочего слоя 5 мм вносят по 2,0 мл раствора  $\text{CaCl}_2$  и после прогрева прибора устанавливают нулевую точку ФЭКа с красным светофильтром (720 нм). Затем в правую кювету приливают 0,2 мл сыворотки и после перемешивания содержимого стеклянной палочкой или полоской рентгеновской пленки отмечают экстинкцию, которая обычно составляет 0,01; 0,02; 0,03. Потом в эту же кювету добавляют 0,04 мл гепарина и после повторного перемешивания ее содержимого точно через 4 мин вновь отмечают экстинкцию (время засекают секундомером).

Результат выражают в единицах экстинкции ( $E = E_{\text{оп.}} - E_{\text{к.}}$ ) или в условных фотометрических единицах, вычисляемых путем умножения значений экстинкции на 100.

В норме проба Бурштейна и Самая составляет 0,35—0,55 ед. экстинкции, или 35—55 усл. ед.

**Примечания:** 1. Кровь для анализа нужно брать у обследуемого обязательно натощак.

2. Сыворотка стойка в течение двух суток, если содержать ее в холодильнике или при комнатной температуре.

3. В случае если при измерении экстинкции не хватает шкалы правого барабана, определение можно вести в 0,1 мл сыворотки (с последующим



умножением конечного результата на 2) или на левом барабане ФЭКа-М, ФЭКа-Н-57.

4. При исследовании липемических сывороток следует измерять мутность раствора до и после добавления гепарина. Во всех остальных случаях из показаний экстинкции опытных проб сразу же вычитают 0,02 (среднее значение показаний контрольных проб) или же от конечного результата, выраженного в условных единицах, отнимают две фотометрические единицы. Это относится и к желтушным сывороткам, которые благодаря значительному разбавлению дают такую же поправку — 0,02 ед. экстинкции (2 усл. ед.).

### Определение патологической фракции липопротеидов (липопротеида-Х) в сыворотке крови

В 1955 г. Eder с соавт. при спиртовом фракционировании липопротеидов сыворотки установили, что последние у лиц с застоем желчи отличаются от липопротеидов сыворотки здоровых людей. Затем Etienne с соавт. (1966), Dangerfield с соавт. (1967) у больных с механической желтухой удалось изолировать фракцию липопротеидов, имеющую электрофоретическую подвижность  $\beta$ -липидов, но обладающую иммунологическими свойствами и аминокислотным составом, отличающимся от липопротеидов сыворотки здоровых людей. Данная фракция имела свойство не осаждаться сульфосалициловой кислотой. Как установила Wehr (1970), этот липопротеид содержит меньше белка, а больше липидов, особенно свободного холестерина и фосфолипидов.

В настоящее время выяснено, что на долю белка этого липопротеида приходится 6 %, фосфолипидов — 66 %, неэстерифицированного холестерина — 22 %, эфиров холестерина — 3 %, триацилглицеринов — 3 %. Lemaire с соавт. (1965) объясняют наличие этой липопротеидной фракции в сыворотке крови у больных при застое желчи проникновением ее в кровь из желчи. Wehr (1970) считает, что образование этой фракции липопротеидов вызывается необходимостью транспортировки холестерина из печени вследствие повышения его синтеза при застое желчи, в результате чего формируются специальные высоконасыщенные холестерином липопротеиды, поддерживающие стеролы в растворе. Однако указанные работы посвящены в основном химическому анализу патологической фракции липопротеидов, в доступной нам литературе не обнаружено обстоятельных работ по изучению возможности применения этой пробы в клинической практике.

Референтным методом исследования липопротеида-Х является иммунологический. Важная его особенность — высокая подвижность этого комплекса к катоду при электрофорезе на агаровом геле.

Наиболее распространен в клинической практике метод Wehr (1970).

- Реактивы. 1. Раствор хлорида натрия — 0,9 г/100 мл.  
2. Раствор сульфосалициловой кислоты — 10 г/100 мл.  
3. 1 моль/л раствора надхлорной кислоты.

Ход определения. При комнатной температуре к 1 мл сыворотки крови в центрифужной пробирке прибавляют 1 мл раствора хлористого натрия и по каплям 1 мл раствора сульфосалициловой кислоты. Содержимое пробирки перемешивают стеклянной палочкой и центрифугируют 30 мин при 3000 об/мин. К 1 мл надосадочной жидкости доливают 1,5 мл раствора надхлорной кислоты. Через 15 мин измеряют степень помутнения раствора на фотоэлектроколориметре-

нефелометре при длине волны 660 нм в кювете с шириной слоя 5 мм. Компенсационной жидкостью служит дистиллированная вода. Результаты измерения выражают в единицах оптической плотности, умноженных на 100.

Хранение сыворотки при +4 °С в течение 4 дней не влияет на результат анализа, при более длительном ее содержании наблюдается снижение величины показателя измерения.

### Исследование липопроотеидлипазной активности плазмы крови

Образующиеся в печени липидно-белковые комплексы секретируются в кровь в виде ЛПОНП, которые более чем на 60 % состоят из триацилглицеринов.

Активируемая гепарином липопроотеидлипаза (ЛПЛ; КФ 3.1.1.34), гидролизуя триацилглицерины, способна превращать ЛПОНП в ЛПНП за счет увеличения содержания холестерина и фосфолипидов и возрастания плотности частиц. Ингибирование же ЛПЛ приводит к накоплению в плазме крови ЛПОНП, что характерно для гиперлипопроотеидемий I, IIb, IV, V типов по классификации Фредриксона. Поэтому исследование активности этого энзима может облегчить типирование гиперлипопроотеидемий, а также способствовать лучшему пониманию характера нарушения липидного обмена при патологии.

Большинство описанных в литературе методов исследования липопроотеидлипазной активности в биологическом материале основано на установлении конечных продуктов липолитической реакции — высших жирных кислот. При этом на первом этапе во всех способах инкубируют различные субстраты с исследуемой плазмой, а затем после экстракции анализируемого продукта из реакционной смеси определяют жирные кислоты либо титрованием, либо колориметрически, а при использовании  $C^{14}$  меченого субстрата — по радиоактивности. Некоторые авторы, применяя рН-стат, прослеживают образование жирных кислот непосредственно в реакционной смеси методом потенциометрического титрования при постоянном рН.

Общим недостатком всех этих способов является их трудоемкость, необходимость использования для экстракции и регистрации жирных кислот дорогостоящих реактивов и оборудования. Кроме того, отсутствие в указанных методах контроля уровня жирных кислот, выделившихся за счет неспецифического гидролиза субстратов, снижает чувствительность рассмотренных способов и не исключает действия других липолитических ферментов.

Предлагаемый метод выявляет уровень жирных кислот непосредственно в инкубационной смеси. При этом изменение рН, вызванное освободившимися в результате энзиматического гидролиза субстрата жирными кислотами, определяют потенциометрически, этот показатель является мерой активности фермента.

Кровь забирают до (контрольная проба) и через 20 мин после (опытная проба) внутривенного введения гепарина в дозе 150 ЕД/кг массы. Кровь смешивают с гепарином в отношении 1 : 10, центрифугируют, плазму используют немедленно или замораживают при -20 °С.

**Реактивы.** 1. В качестве субстрата применяют интралипид («Vitrum», Швеция).

2. Аммиачный буфер (рН 8,7). Готовят смешиванием 31 объема 0,1 моль/л  $\text{NH}_4\text{Cl}$  и 30 объемов 0,1 моль/л  $\text{NH}_4\text{OH}$ . Чтобы уменьшить силу буфера, перед использованием его разводят водой в 4 раза.

3. Раствор бычьего альбумина в разведенном буфере — 70 мг/мл.

**Ход определения.** В две маленькие пробирки отмеряют по 1 мл забуференного раствора альбумина и по 0,1 мл интралипида, пробирки помещают в термостат на 10 мин при температуре  $+29^\circ\text{C}$ . После этого в одну пробирку добавляют 0,4 мл плазмы, взятой до введения обследуемому гепарина (контрольная проба), а в другую — 0,4 мл постгепариновой плазмы (опытная проба). рН обеих проб измеряют в микрочайке рН-метра и ставят их снова в термостат на 2 ч (температура  $+29^\circ\text{C}$ ). По истечении срока инкубации вновь определяют рН опытной и контрольной пробирок. При температуре инкубации  $+29^\circ\text{C}$  имеет место максимальное освобождение жирных кислот и в то же время уменьшается возможность действия других липолитических ферментов, активируемых гепарином.

Для получения данных к построению калибровочного графика используют растворы этилового спирта, содержащие в 0,4 мл 10, 20, 30 и т. д. мкмоль стеариновой кислоты. Последнюю берут в качестве стандарта. Ее вносят в инкубационную смесь вместо плазмы, измеряют рН и строят калибровочный график.

По калибровочному графику устанавливают, какому количеству мкмоль стеариновой кислоты соответствует полученный в опытной и контрольной пробах сдвиг рН. За единицу активности фермента принимают то количество мкмоль жирной кислоты, которое освобождается в условиях опыта за 1 ч в пересчете на 1 мл плазмы крови по сравнению с контрольной пробой.

$$AL = \frac{C_o \cdot 2,5}{2} - \frac{C_k \cdot 2,5}{2},$$

после преобразования  $AL = 1,25 (C_o - C_k)$ , где AL — активность липопротеидлаз (мкмоль стеариновой кислоты на 1 мл плазмы при инкубации 1 ч); 2,5 — пересчет на 1 мл плазмы; 2 — время инкубации в ч; C — количество стеариновой кислоты (мкмоль), освобожденное под действием фермента в опытной ( $C_o$ ) и контрольной ( $C_k$ ) пробирках (устанавливают по калибровочному графику).

Мы определили по указанной методике липопротеидлазную активность плазмы крови у 30 здоровых людей.

Средняя величина активности фермента составляет  $19,9 \pm 0,87$  мкмоль жирных кислот / (ч · мл).

### *Клинико-диагностическое значение исследования липопротеидов в сыворотке крови*

Выяснение вида нарушений обмена липопротеидов, то есть типа гиперлипотеидемии у больных, обычно проводят в соответствии с классификацией Фредриксона с соавт. (1965, 1971), в основу которой положены не только характер фракционного распределения липопротеидов, но и содержание в сыворотке триацилглицеринов и холестерина. При гиперлипотеидемии выделяют 5 основных типов отклонения липидного обмена от нормы.

Тип I — гиперхиломикронемия. Ему свойственны наличие большого количества хиломикронов, нормальное или слегка повышенное содержание пре- $\beta$ -липопротеидов и резкое увеличение уровня триацилглицеринов. Клинически проявляется ксантоматозом.

«Молочная» сыворотка, если содержать ее в течение суток при температуре  $+4^{\circ}\text{C}$ , становится прозрачной, с обильным сливкообразным слоем хиломикронов сверху (тест для обнаружения хиломикронов положителен, если хиломикроны или ЛПОНП присутствуют и пробе в повышенной концентрации).

Первичная гиперлипопротеидемия I типа встречается редко и проявляется уже у больных в раннем возрасте. Как вторичный признак наблюдается у больных с диабетом, красной волчанкой, иногда с нефрозом, гипотиреозом, панкреатитом, при злоупотреблении алкоголем. Обнаруживается ожирением.

Тип II — гипер- $\beta$ -липопротеидемия — обусловлен высоким содержанием в крови  $\beta$ -липопротеидов. Распадается на подтипы IIa и IIb. Первый характеризуется высоким уровнем  $\beta$ -липопротеидов, нормальным содержанием пре- $\beta$ -липопротеидов, а также возрастанием концентрации холестерина при нормальном содержании триацилглицеринов; второй сопровождается увеличением содержания  $\beta$ -липопротеидов, пре- $\beta$ -липопротеидов, холестерина и триацилглицеринов.

Клинически тип II проявляется атеросклеротическими нарушениями.

Первичная гиперлипопротеидемия II типа встречается более часто и наблюдается уже у новорожденных. Часто связана с прогрессирующим атеросклерозом. Как вторичная гиперлипопротеидемия отмечается при нефрозах, заболеваниях печени, миеломной болезни, макроглобулинемии.

Тип III — гипер- $\beta$ -гиперпре- $\beta$ -липопротеидемия. Эта широкополосная  $\beta$ -липопротеидемия сопровождается повышением уровня холестерина и триацилглицеринов. Часто обнаруживается у больных атеросклерозом, сочетающимся с развитием коронарной недостаточности.

Вторичная гиперлипопротеидемия бывает у больных с системной красной волчанкой и диабетическим кетоацидозом.

Тип IV — гиперпре- $\beta$ -липопротеидемия — обусловлен значительным увеличением пре- $\beta$ -липопротеидов. Характеризуется также повышением уровня триацилглицеринов при нормальном или слегка увеличенном содержании холестерина. Выявляется у больных диабетом, ожирением, ишемической болезнью сердца, а также при нефротическом синдроме, гипотиреозе. Первичная гиперлипопротеидемия IV типа обнаруживается развитием атеросклероза у больных после 20 лет. Характеризуется ишемической болезнью сердца. Вторичная гиперлипопротеидемия наблюдается при диабете, нефрозе, гипотиреозе, панкреатите, алкоголизме.

Тип V — гиперпре- $\beta$ -липопротеидемия с гиперхиломикронемией. Ему свойственны увеличение богатых триацилглицеринами пре- $\beta$ -липопротеидов и хиломикронов. Содержание холестерина и триацилглицеринов в крови возрастает.

При стоянии сыворотка расслаивается на верхний — сливкообразный и нижний — мутный слои.

Обнаруживается у больных, страдающих ксантоматозом. Ишемической болезни при этом типе не наблюдается.

Первичная гиперлипопротеидемия V типа проявляется у боль-

ных после 20—30 лет. Вторичная гиперлипопротеидемия отмечается при диабете, нефрозе, гипотиреозе, панкреатите, алкоголизме.

Итак, как вторичные состояния гиперлипопротеидемии I, IV, V типов одинаковы. Атерогенными являются гиперлипопротеидемии II, III и IV типов.

Типы гиперлипопротеидемии удобно определять, используя метод электрофореза липопротеидов в полиакриламидном геле (по Е. Я. Маграчевой, 1973), на отечественном аппарате и фабричном приборе, выпускаемом фирмой «Реанал» (Венгрия). Оценку результатов разделения можно давать визуально (описательно) или регистрируя их на микроденситометре.

Однако при отсутствии специальной аппаратуры типы гиперлипопротеидемии допустимо устанавливать и косвенно, по содержанию холестерина и триацилглицеридов в сыворотке крови, учитывая при этом, что около 40 % холестерина приходится на  $\beta$ -липопротеиды, а 50—60 % и 84—87 % триацилглицеридов — на пре- $\beta$ -липопротеиды и хиломикроны соответственно. Типированию может помочь и способ наблюдения или выдерживания плазмы.

В настоящее время более правильно говорить не о типах гиперлипопротеидемий, а о типах дислипопротеидемий, поскольку изменения в спектре отдельных фракций липопротеидов не всегда сопровождаются гиперлипопротеидемией.

Выявление типов дислипопротеидемий (ДЛП) проводят по принципам, общим с типированием гиперлипопротеидемий по Фредриксону, однако добавочно к нему вводят обнаружение типов с гиперальфа- и гипоальфалипопротеидемиями, гипобеталипопротеидемией. Основным современным подходом в типировании ДЛП является оценка уровня каждого из классов липопротеидов плазмы: ЛПОIII, ЛПВП, ЛПВП — по уровню холестерина, входящего в состав этих фракций.

Уменьшение содержания альфа-липопротеидов наблюдается при остром гепатите, циррозе печени и застойной желтухе. В последнем случае оно выражено настолько резко, что может привести к полному исчезновению альфа-фракции.

Увеличение уровня альфа-липопротеидов отмечается иногда при хроническом гепатите.

Возрастание содержания бета-липопротеидов — наиболее часто встречающееся в липограмме отклонение от нормы. Оно бывает при атеросклерозе, диабете, гипотиреозе, мононуклеозе, некоторых острых гепатитах, бета<sub>1</sub>-плазмоцитоме, при резкой гипопротемии, гликогеновой болезни, ксантоматозе и других патологических состояниях.

Уменьшение бета-липопротеидовой фракции описано при бета<sub>2</sub>-плазмоцитоме.

Увеличение липидного остатка наблюдается у больных с алиментарной гиперлипемией и в особенности с эссенциальной гиперлипемией.

Повышение уровня липопротеидов в крови тесно связано с гиперхолестеринемией, поскольку холестерин входит в состав главным образом бета-липопротеидов.

Диспротеинемическая проба Бурштейна имеет значение не только при гиперлипемических состояниях, но и как функциональная печеночная проба. При сопоставлении с тимоловой пробой этот показатель, несмотря на свою неспецифичность, особенно ценен. Тимоловая проба более чувствительна к расстройствам в начальной фазе, и

проба Бурштейна — в конечной фазе острого гепатита. Особую роль играет липопротеиновая проба в оценке постгепатитного состояния. В этом случае она часто является единственной флокуляционной пробой, улавливающей повреждение печени. В сочетании с тимоловой она имеет большое значение для дифференциации механической желтухи от паренхиматозной. При паренхиматозной желтухе обе пробы положительны либо тимоловая положительна, а проба на  $\beta$ -липопротеиды отрицательна. При механической желтухе тимоловая проба отрицательна (если нет вторичного гепатита), проба Бурштейна — резко положительна.

При механической желтухе обнаруживается также значительное увеличение содержания патологической фракции липопротеидов (липопротеида-Х), выявляемое описанным методом Wehr.

У больных с неспецифическими пневмониями происходят значительные изменения не только в качественном, но и в количественном распределении липидно-белковых комплексов сыворотки крови. Причем у больных с острой очаговой пневмонией, по нашим предварительным данным, в меньшем проценте случаев обнаруживается патологическое распределение липопротеидов, чем у больных с хронической пневмонией. Если при острой очаговой пневмонии наблюдается склонность к нормализации спектра липопротеидов, то при хронической пневмонии таковая не выявляется. Все это свидетельствует о более глубоких изменениях в спектре липопротеидов у больных хронической пневмонией по сравнению с таковыми у больных, страдающих острой очаговой пневмонией.

Состав липопротеидов сыворотки крови резко меняется и в остром периоде вирусного гепатита (Ж. Л. Лобановская с соавт., 1980). Методом электрофореза в полиакриламидном геле обнаружено снижение содержания  $\alpha$ -ЛП, а иногда и полное их исчезновение. При среднетяжелом и тяжелом течении определяются патологические фракции  $\alpha$ -ЛП, обладающие иной электрофоретической подвижностью. В этот период полосы  $\beta$ - и пре- $\beta$ -ЛП интенсивные, часто двойные. При снижении гипербилирубинемии, отражающей функциональное состояние печени, на диск-электрофограмме обнаруживается более выраженная фракция  $\alpha$ -ЛП с восстановлением (по качеству распределения фракций) спектра липопротеидов, хотя соотношения  $\alpha$ -ЛП/ $\beta$ -ЛП и в III фазе заболевания еще достоверно отличаются от нормы. Но и к моменту выписки больных с острым гепатитом в 27 % случаев отсутствует нормализация соотношения фракций  $\alpha$ -ЛП/ $\beta$ -ЛП.

Приведенные клинические примеры показывают важность использования метода электрофоретического фракционирования липопротеидов в полиакриламидном геле (с качественной и количественной оценкой выявляемых изменений в распределении липидно-белковых комплексов) для улучшения диагностики заболеваний и контроля за эффективностью проводимого лечения.

В ряде эпидемиологических исследований определено наличие отрицательной корреляционной зависимости между содержанием холестерина фракции липопротеидов высокой плотности ( $\alpha$ -липопротеидов) в плазме крови и частотой распространения ишемической болезни сердца.

В клинической практике также отмечено снижение концентрации  $\alpha$ -липопротеидного холестерина у больных с ишемической болезнью сердца, обусловленной коронарным атеросклерозом.

Установлено, что каждый из известных риск факторов ишемической болезни сердца (ожирение, курение и недостаток физической активности) сопряжен со снижением содержания холестерина во фракции  $\alpha$ -липопротеидов.

У людей с наследственной гиперальфахолестеринемией, наоборот, реже, чем у остальных, наблюдается ишемическая болезнь сердца и инфаркт миокарда.

Смертность от заболеваний сердечно-сосудистой системы при высоком уровне  $\alpha$ -липопротеидного холестерина меньшая, чем при низком. У лиц, занимающихся систематическими физическими тренировками, содержание холестерина во фракции  $\alpha$ -липопротеидов повышено, а ишемическая болезнь сердца отмечается реже, чем в контрольной группе. Предполагается, что гиперальфахолестеринемия является антириск-фактором, а гипоальфахолестеринемия — независимым риск-фактором в развитии ишемической болезни сердца, вызванной коронарным атеросклерозом.

Следует иметь в виду, что низкая концентрация  $\alpha$ -ЛП в плазме приводит к изменению соотношения концентрации неатерогенных и атерогенных липопротеидов в сторону относительного преобладания последних. Для характеристики этого соотношения предложен пока-

затель  $\frac{XC_{\text{общий}} - XC_{\text{ЛПВП}}}{XC_{\text{ЛПВП}}}$ . Возрастание его и свидетельствует об

атерогенности липопротеидного спектра.

Как видно из приведенной формулы, это может иметь место как при нормальных величинах  $XC_{\text{ЛПВП}}$ , но повышенном уровне  $\beta$ -или пре- $\beta$ -ЛП (относительная гипоальфалиппротеидемия), так и при снижении уровня  $XC_{\text{ЛПВП}}$ . Таким образом, гипоальфалиппротеидемия является одним из случаев дислиппротеидемии. Определение содержания  $\alpha$ -липопротеидного холестерина представляет интерес в эпидемиологических исследованиях для выявления лиц с низким и высоким уровнем этого показателя с целью перспективных наблюдений за ними, а также играет известную роль в клинической практике.

## Глава X

### ИССЛЕДОВАНИЕ ПИГМЕНТНОГО ОБМЕНА

По данным современных исследований, срок жизни эритроцитов в среднем составляет 110—130 дней. По окончании этого периода они разрушаются в клетках ретикулоэндотелиальной системы костного мозга, печени, селезенки и некоторых других органов. Процессу распада подвергается и содержащийся в эритроцитах гемоглобин.

Вначале происходит разрыв метинового мостика между I и II пиррольными ядрами порфиринового кольца с одновременным окислением двухвалентного железа в трехвалентное. Образующийся таким образом пигмент зеленого цвета получил название вердоглобин (вердогемоглобин, холеглобин, псевдогемоглобин). Дальнейшие превращения приводят к потере вердоглобином железа и глобина, в результате чего порфириновое кольцо разворачивается в цепь и формируется желчный пигмент зеленого цвета — биливердин. Почти весь биливердин ферментативным путем восстанавливается в основ-



ной и важнейший красно-желтый пигмент желчи — билирубин, являющийся нормальной составной частью сыворотки крови. Этот свободный (несвязанный) билирубин (линейный тетрапиррол) в силу нерастворимости в воде не переходит в мочу и дает непрямую реакцию ван ден Берга (то есть реагирует с диазореактивом лишь после предварительного растворения в спирте). Следовательно, непрямой билирубин представляет собой свободный билирубин. Последний в клетках печени под влиянием фермента трансферазы связывается с глюкуроновой кислотой, что сообщает ему хорошую растворимость в воде. Благодаря этому связанный билирубин легко выделяется с мочой и реагирует с диазореактивом сразу же после прибавления его к сыворотке желтушных больных. Установлено, что связанный билирубин (прямой) представлен двумя пигментами: моно- и диглюкуронидом; последний составляет 75—80 % выделяемого желчью пигмента. Таким образом, билирубинглюкуронида — это прямой билирубин.

## МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ БИЛИРУБИНА В СЫВОРОТКЕ КРОВИ

В настоящее время для определения билирубина в сыворотке крови используют:

I. Колориметрические диазометоды, основанные на образовании азобилирубина (красно-розового цвета) при добавлении к сыворотке диазофенилсульфоной кислоты (и других диазосоединений). К ним относятся: 1. Метод ван ден Берга. 2. Способы с применением акселераторных веществ, обладающих свойством ускорять реакцию между непрямым билирубином и диазореактивом в водной среде путем повышения растворимости свободного билирубина или каталитическим способом. В качестве акселераторов используют: метиловый спирт, кофеин и бензоат натрия, кофеин и мочевины, бензоат натрия и мочевины, ацетамид (дифилин), уксусную кислоту.

II. Спектрофотометрические методы, базирующиеся на том, что общий билирубин дает характерную абсорбционную зону при 450—460 нм.

III. Хроматографические методы.

IV. Способы, основанные на распределении фракций билирубина в различных растворителях.

V. Флюориметрические и другие методы.

Большинство колориметрических способов определения билирубина базируется на реакции ван ден Берга. Она протекает в две стадии. Вначале под воздействием соляной кислоты разрывается тетрапирроловая цепь и образуются два дипиррола. Затем два дипирроловых производных диазотируются диазофенилсульфоной кислотой с превращением их в азобилирубин.

Оригинальным методом ван ден Берга устанавливают лишь характер реакции (прямая, непрямая, замедленная), то есть отмечают преобладание в сыворотке крови того или иного билирубина.

Метод Йендрашика, Клеггорна и Грофа дает возможность фракционно устанавливать содержание билирубина. Он прост, удобен, не связан с применением дефицитных реактивов и является наиболее приемлемым для практических лабораторий.

Оказалось весьма затруднительно выбрать общий унифициро-

важный метод для исследования всего диапазона наблюдаемых в норме и при патологии концентраций билирубина. Для определения билирубина в плазме новорожденных наиболее приемлем способ Маллоя и Эвелина в модификации Лате и Рутвена, поскольку он оказывается нечувствительным к гемовым пигментам.

Иендрашик с соавт. указывают, что для исследования билирубина в сыворотке крови существуют нейтральные, щелочные и кислотно-щелочные азометоды. Наиболее чувствительны модификации способа с определением на конечном этапе кислого или щелочного азопигмента. Кислый азозеленый, образующийся при рН 0,8, обладает гораздо более высоким коэффициентом молярной экстинкции по сравнению с таковым розового азопигмента. Однако в кислой среде очень часто наблюдается появление мутности.

Типичный азобилирубин появляется только в слабокислой или в нейтральной среде. В сильноокислой же или щелочной среде ход реакции иной. Поэтому нельзя утверждать, что при щелочном или кислом рН полученный продукт идентичен азобилирубину.

В щелочной среде розовый азопигмент превращается в стабильный продукт зеленого цвета, интенсивность окраски которого измеряется при длине волны 600—610 нм. В этой зоне спектра желтые, красные и коричневые пигменты имеют крайне незначительную абсорбцию, что в большой степени повышает специфичность метода. Иендрашик с соавт. предпочитают щелочной способ кислоте также потому, что при его использовании удается избежать осаждения белков. Считается, что во многих случаях весьма удобным является упрощенный нейтральный метод определения билирубина в сыворотке крови с колориметрией при длине волны 530 нм. Однако при этом необходимо учитывать низкую чувствительность диазореакции, которая к тому же может не давать стойких величин абсорбции; при постановке способа очень важно следить за рН среды. Пробы могут давать помутнение (особенно в диапазоне рН 3,5—6,0 — кислая среда), зависящее от белков сыворотки.

Разделение билирубина на фракции (ди-, моноглюкурониды) методом хроматографии или с применением органических растворителей позволяет подойти к более глубокой оценке процессов, происходящих в печени. Однако сложность технического исполнения указанных способов затрудняет распространение их в клинической практике.

Определение рекомендуется осуществлять сразу же после забора проб, чтобы избежать окисления билирубина на свету. Гемолиз сыворотки снижает количество билирубина пропорционально присутствию гемоглобина. Следовательно, сыворотка крови не должна быть гемолизирована.

Для избежания ошибки, связанной с появлением мутности, рекомендуется ставить контрольные пробы на каждую сыворотку.

В качестве унифицированного метода для определения билирубина и его фракций в сыворотке крови предложен способ Иендрашика, Клеггорна и Грофа с измерением оптической плотности азопигмента в нейтральной или слабокислой среде при зеленом светофильтре (530 нм).

Методом выбора может служить щелочной способ с измерением оптической плотности зеленого (или синего) азопигмента при красном светофильтре (600—610 нм).

Отечественной промышленностью освоено широкое производст-

во наборов для определения билирубина в сыворотке крови по методу Йендрашика, Клеггорна, Грофа.

Помимо выбора наиболее приемлемого метода определения билирубина необходимо было унифицировать и построение калибровочных кривых. В качестве стандарта принято использовать билирубин фирмы «Мерк» (ФРГ), «Лахема» (ЧССР).

На окраску билирубина оказывает существенное влияние наличие белка в пробе, поэтому все стандартные растворы билирубина должны содержать белок. Правда, в поддержании постоянной концентрации белка нет особой необходимости, поскольку окраска азобилирубина не меняется даже при 50-кратном разведении белка. Цвет азобилирубина в белковых растворах оказывается интенсивнее, чем окраска билирубина в слабых щелочных растворах. Вот почему способы приготовления стандартных проб билирубина на белковых растворах являются наиболее правильными. К ним относится получение билирубинового стандартного раствора в буферированной сыворотке человека по Шеллону и Венде.

Очень простой и удобный способ приготовления билирубинового стандарта предложила Комиссия по стандартизации и автоматизации биохимических исследовательских методов Чехословакии.

Фирма «Лахема» выпускает готовые наборы реактивов, предназначенные для определения билирубина («Билирубин») и построения калибровочной кривой («Билирубин-эталон»). Последние содержат препараты лиофилизированного билирубина и альбумина.

Построение калибровочной кривой по Шеллону и Венде и способом, предложенным Комиссией по стандартизации в ЧССР, приводится при изложении метода колориметрического определения билирубина и его фракций.

Наиболее высокой чувствительностью обладает флюориметрический способ исследования билирубина.

#### **Определение содержания билирубина и его фракций в сыворотке крови колориметрическим диазометодом (по Йендрашику, Клеггорну, Грофу)**

**Принцип.** При взаимодействии сульфаниловой кислоты с азотистокислым натрием образуется диазофенилсульфовая кислота, которая, реагируя со связанным билирубином сыворотки, дает розово-фиолетовое окрашивание. По интенсивности его судят о концентрации билирубина, вступающего в прямую реакцию. При добавлении к сыворотке крови кофенинового реактива несвязанный билирубин переходит в растворимое диссоциированное состояние, благодаря чему он также вызывает розово-фиолетовое окрашивание раствора со смесью диазореактивов. По интенсивности последнего фотокolorиметрически определяют концентрацию общего билирубина. По разнице между общим и связанным билирубином находят содержание несвязанного билирубина, дающего непрямую реакцию.

**Реактивы.** 1. Кофениновый реактив. 5 г чистого кофенина, 7,5 г бензойнокислого натрия ( $C_6H_5COONa$ ), 12,5 г кристаллического уксуснокислого натрия ( $CH_3COONa$ ) растворяют в 90 мл дистиллированной воды, нагревают содержимое колбы до  $+50-60^\circ C$  и хорошо перемешивают. После охлаждения доводят дистиллированной водой до 100 мл (некоторые авторы рекомендуют доводить объем до 200 мл или до 1 л). Раствор годен в течение двух недель.

2. Физиологический раствор (раствор NaCl, 9 г/л).

3. Диазосмесь: а) диазореактив I. 5 г сульфаниловой кислоты растворяют при подогревании в 300—400 мл дистиллированной воды, прибавляют 15 мл концентрированной соляной кислоты (плотность 1,19 кг/л). Если часть сульфаниловой кислоты остается в осадке, колбу помещают в теплую воду и ее содержимое помешивают. Только после полного растворения сульфаниловой кислоты и охлаждения раствора объем колбы доводят дистиллированной водой до 1 л. Реактив стойкий, хранится в посуде из темного стекла; б) диазореактив II. Раствор азотистокислого натрия ( $\text{NaNO}_2$ , 0,5 г/100 мл). Реактив нестойкий, содержится в склянке темного стекла около 2—3 недель. Первый признак его непригодности — появление желтого оттенка.

Перед работой смешивают 10 мл диазореактива I и 0,3 мл диазореактива II.

Ход определения. В три пробирки (для определения общего билирубина, связанного билирубина и постановки контрольной реакции на цвет сыворотки) вводят реактивы согласно схеме (табл. 34).

Табл. 34. Данные для определения билирубина в сыворотке крови

Реактив	Общий билирубин	Связанный билирубин	Контрольная проба
Сыворотка	0,50	0,50	0,50
Кофеиновый реактив	1,75	—	1,75
Физиологический раствор	—	1,75	0,25
Диазосмесь	0,25	0,25	—

При определении общего билирубина пробу для развития окраски оставляют стоять на 20 мин. При дальнейшем стоянии пробы окраска не изменяется.

Для исследования связанного билирубина колориметрирование осуществляют спустя 5—10 мин после добавления диазосмеси, так как при длительном стоянии пробы в реакцию вступает свободный билирубин.

Контрольную пробу на мутность сыворотки ставят для каждой опытной пробы.

Колориметрируют растворы на фотоэлектроколориметре при зеленом светофильтре (длина волны 500—560 нм) в кювете с шириной слоя 5 мм.

Расчет производят по калибровочному графику, построение которого дано в подразделе «Построение калибровочной кривой для определения билирубина сыворотки крови». Находят содержание общего и связанного билирубина в мкмоль/л. Для определения уровня несвязанного (свободного) билирубина из цифры общего его содержания вычитают показатель связанного билирубина (прямого).

Содержание общего билирубина составляет в норме 8,55—20,52 мкмоль/л (0,5—1,2 мг/100 мл). 75 % приходится на долю свободного билирубина.

Средние величины содержания различных фракций билирубина:  
 общий билирубин — 11,12 мкмоль/л (0,65 мг/100 мл)  
 связанный билирубин — 2,57 мкмоль/л (0,15 мг/100 мл)  
 свободный билирубин — 8,56 мкмоль/л (0,50 мг/100 мл)

Примечания: 1. Некоторые авторы рекомендуют после развития окраски (перед этапом колориметрирования) добавлять в пробы по три капли раствора NaOH, 300 г/л: цвет раствора при этом изменяется на зеленый (при большой концентрации щелочи — на синий), часто наблюдается исчезновение мутности. Пробы с полученной окраской следует колориметрировать при красном светофильтре.

2. В случае большой концентрации билирубина сыворотку нужно развести физиологическим раствором в два раза.

### Определение билирубина в малом объеме сыворотки крови

При выявлении гипербилирубинемии у новорожденных в роддомах, в детских учреждениях можно применять микрометод в модификации Т. Б. Доброседовой и А. С. Циркиной.

Количество сыворотки, необходимое для исследования общего, связанного и свободного билирубина, составляет 0,4 мл. Сыворотку разводят равным объемом физиологического раствора. Дальнейшее определение проводят согласно схеме (табл. 35).

Табл. 35. Данные для определения билирубина в малом объеме сыворотки крови

Реактивы	Общий билирубин	Билирубин связанный	Контрольная проба
Сыворотка, разведенная физиологическим раствором 1:1	0,25	0,25	0,25
Кофеиновый реактив	2,00	—	2,00
Физиологический раствор	—	2,00	0,25
Диазосмесь	0,25	0,25	—
Итого ...	2,50	2,50	2,50

Колориметрию и расчет производят так же, как это рекомендуется в унифицированном методе; поскольку сыворотки взято в опыт 0,125 мл, полученный результат умножают на 4 (при учете разведения).

Норма — до 20,52 мкмоль/л (1,2 мг/100 мл) общего билирубина, из которого до 25 % может составлять связанный билирубин.

Примечание. Реактивы готовят так же, как и в унифицированном методе Исидрашика, Клегорна, Грофа.

В связи с тем что билирубин сыворотки крови обладает характерной зоной поглощения в области 450 нм, в последние годы были предложены прямые фотометрические методы его определения. Их использование особенно важно в практике экспресс-анализа гипербилирубинемий. Л. Г. Чеховской и А. С. Циркиной был предло-

жён колориметрический экспресс-метод без применения каких-либо реактивов, состоящий в установлении содержания билирубина путем фотометрии проб на ФЭКе с синим светофильтром (длина волны 450 нм является оптимальной). Этот способ может быть эффективным для быстрой ориентировочной оценки уровня билирубина в сыворотке крови при массовых обследованиях населения.

Hefel (1978), исследовав визуально 1691 сыворотку, нашёл, что вначале необходимо провести тщательную визуальную оценку сыворотки и что количественно билирубин следует определять только в иктеричных сыворотках.

Для полуколичественного установления билирубина в сыворотке крови Schufz разработал «Bilur Test» (ФРГ). В основе его лежит цветная реакция взаимодействия билирубина с диазоиновой солью 2,6-дихлор-бензол-флюоборатдиазония. Через 1 мин после пропитывания полоски сывороткой появляющуюся окраску сравнивают с приданной цветной шкалой. С помощью этих полосок можно быстро ориентироваться в степени гипербилирубинемии.

### *Построение калибровочной кривой для определения билирубина сыворотки крови*

1. Метод Шеллонга и Венде (1960) с использованием стабилизирующего свойства белка сыворотки крови.

Реактивы для построения калибровочной кривой. 1. 15 мл свежей негемоллизированной сыворотки практически здорового человека (или смесь сывороток здоровых доноров).

2. Основной стандартный раствор билирубина. В колбе ёмкостью 50 мл растворяют 40 мг билирубина (имеющийся в продаже билирубин реагирует непрямо) в 30—35 мл 0,1 моль/л раствора углекислого натрия (10,6 г безводного  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  доводят до 1 л дистиллированной водой). Содержимое колбы хорошо взбалтывают, не допуская образования пузырьков, доводят до метки 0,1 моль/л раствором  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  и все несколько раз перемешивают. Полученный раствор (80 мг/100 мл) стоек в течение 10 мин от начала приготовления. В дальнейшем происходит окисление билирубина.

3. Рабочий раствор билирубина. К 7 мл свежей негемоллизированной сыворотки доливают 1,0 мл свежеприготовленного раствора билирубина (80 мг/100 мл или 1370 мкмоль/л) и 0,05 мл (1 каплю) 4 н раствора уксусной кислоты (22,6 мл ледяной уксусной кислоты доводят до 100 мл дистиллированной водой). Все тщательно перемешивают. При этом выделяются пузырьки углекислого газа. Рабочий раствор стоек в холодильнике не более суток. Он содержит точно на 10 мг/100 мл (171 мкмоль/л) билирубина больше, чем в сыворотке, взятой для приготовления раствора. Чтобы исключить при расчете количество билирубина, содержащееся в этой сыворотке, в процессе стандартизации пользуются соответствующей компенсационной жидкостью.

Для приготовления компенсационной жидкости смешивают 7 мл той сыворотки, которую использовали для получения рабочего стандартного раствора билирубина, 1,0 мл 0,1 моль/л раствора  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  и 0,05 мл (1 каплю) 4 н раствора уксусной кислоты.

Для построения калибровочных кривых обычно делают 5—6 разведённых с различным содержанием билирубина (табл. 36).

Табл. 36. Данные для построения калибровочной кривой по методу Шеллонга и Венде

№ пробирок	Рабочий раствор билирубина (мл)	Физиологический раствор (мл)	Количество билирубина (мг) в пробе (0,5 мл)	Концентрация билирубина (мг/100 мл, мкмоль/л)
1	0,05	0,45	0,005	1 17
2	0,10	0,40	0,010	2 34
3	0,15	0,35	0,015	3 51
4	0,20	0,30	0,020	4 68
5	0,25	0,25	0,025	5 85

Стандартные пробы (0,5 мл) обрабатывают параллельно, по вышеописанному методу, причем пробы одинаковой концентрации исследуют 4—5 раз. Из данных всех определений выводят среднее значение экстинкции для рабочего раствора билирубина какой-либо одной концентрации.

При построении калибровочного графика к каждой пробе добавляют по 1,75 мл кофеинового реактива, так как в качестве стандартного используют свободный билирубин. Контролем служит компенсационная жидкость, из которой готовят разведения аналогично стандартным пробам, то есть берут 0,05; 0,10; 0,15; 0,20; 0,25 мл ее и доводят физиологическим раствором до объема 0,5 мл. Далее контрольные пробы обрабатывают так же, как опытные (или стандартные) пробы.

Калибровочную кривую строят, откладывая на оси ординат разность оптических плотностей опытных и контрольных проб, а на оси абсцисс — соответствующие цифры концентрации билирубина в мкмоль/л.

II. Построение калибровочной кривой по способу, предложенному Комиссией по стандартизации и автоматизации биохимических методов (ЧССР), осуществляется согласно инструкции, прилагаемой к набору реактивов. Для перевода значений концентрации билирубина из размерности мг/100 мл в мкмоль/л пользуются фактором пересчета 17,104.

#### Ультрамикрометод определения билирубина в капиллярной крови (по Rote)

Кровь берут из прокола пальца обследуемого в микрогематокритную трубку, обработанную гепарином, и центрифугируют. Трубку разламывают в том месте, где находится граница между эритроцитами и плазмой, и плазму отсасывают. Для проведения анализа 0,01 мл плазмы добавляют к 0,04 мл 4 г/100 мл раствора сывороточного альбумина, смешивают с 0,6 мл 85 г/100 мл  $H_3PO_4$ . После инкубации пробы при 0° С в течение 3 мин к ней добавляют 3 мл воды и не позднее чем через 15 мин измеряют флюоресценцию с длиной волны возбуждения 420 нм и длиной волны эмиссии 480 нм. Уста-



новлено, что при тщательной работе можно избежать ошибочного занижения результатов, вызываемого гемолизом проб. Показано, что содержание билирубина в капиллярной крови увеличивается после рождения младенца, достигая максимального значения 137—308 мкмоль/л на 3—6-й день жизни, и затем быстро снижается.

### *Клинико-диагностическое значение определения билирубина в сыворотке (плазме) крови*

Определение общего билирубина и его фракций имеет большое клиническое значение. Отмечено, что желтуха появляется тогда, когда уровень билирубина в крови превышает 27—34 мкмоль/л (Тодоров, 1968).

Возрастание содержания свободного билирубина в крови наблюдается при так называемых надпеченочных желтухах, к которым относятся гемолитические анемии разнообразного происхождения, а также функциональные гипербилирубинемии: постгепатитная гипербилирубинемия, болезнь Жильбера, желтуха новорожденных (физиологическая), семейная негемолитическая желтуха новорожденных (синдром Криглера—Найара). Свободный билирубин в моче не появляется. Содержание уробилина в моче и стеркобилина в кале при гемолитических анемиях повышено, при остальных формах надпеченочных желтух оно нормально или понижено.

У больных с печеночными желтухами в крови повышен уровень связанного билирубина. Как известно, печеночные желтухи, паренхиматозные повреждения печени с их исходами — это и синдром Дубина—Джонсона и синдром Ротора. В моче появляется билирубин. Количество стеркобилина в кале понижено. Характер уробилинурии различен.

При подпеченочных желтухах, к которым относится механическая желтуха, в крови возрастает содержание как связанного, так и свободного (в меньшей степени) билирубина, в моче обнаруживается билирубин, в кале понижено содержание стеркобилина.

В настоящее время широко известно понятие «функциональные гипербилирубинемии», под которыми понимают несколько типов желтух, отличающихся доброкачественным течением и протекающих без выраженного поражения паренхимы печени, без признаков вне- или внутрипеченочной закупорки желчных ходов, а также без повышенного гемолиза. В зависимости от того, на каком этапе нарушается обмен билирубина, различают две основные формы гипербилирубинемий, характеризующихся:

- 1) увеличением содержания в сыворотке крови свободного билирубина;
- 2) накоплением в сыворотке крови преимущественно связанного билирубина.

К первому типу функциональных гипербилирубинемий, сопровождающихся повышенном концентрации свободного билирубина, относится форма, описанная Жильбером, а также постгепатитная гипербилирубинемия, физиологическая желтуха новорожденных и семейная негемолитическая желтуха новорожденных Криглера—Найара. Эти заболевания протекают без повышенного гемолиза, с пониженным содержанием стеркобилина и уробилина.

Полагают, что при указанном виде гипербилирубинемии ухуд-

шается конъюгация билирубина в печеночной клетке вследствие снижения активности глюкуроноилловой трансферазы или нарушения захвата билирубина печеночной клеткой. Последнее может быть обусловлено и внепеченочными факторами.

Увеличение концентрации связанного и отчасти свободного билирубина свойственно желтухам, возникающим в результате поражения паренхимы печени факторами инфекционного и токсического характера. Помимо нарушения экскреции связанного билирубина в желчные капилляры, вследствие чего он попадает непосредственно в кровь, отмечается ослабление конъюгации свободного билирубина и поступление его в печеночную клетку. Это влечет за собой повышение уровня и свободного билирубина в плазме крови у таких больных.

Характерно возрастание связанного билирубина для второй группы функциональных гипербилирубинемий, к которым относятся болезнь Дубина — Джонсона и синдром Ротора. Развитие подобных желтух вызвано нарушением транспорта связанного билирубина печеночной клеткой.

## Глава XI

### ИССЛЕДОВАНИЕ МИНЕРАЛЬНОГО ОБМЕНА

Все элементы, входящие в состав человеческого тела, по предложению В. И. Вернадского, принято делить на макроэлементы, содержание которых достигает  $10^{-2}$  % и выше (калий, натрий, кальций, магний, железо, алюминий и другие), микроэлементы — от  $10^{-3}$  до  $10^{-5}$  % (цинк, медь, марганец, литий, йод и другие) и ультрамикроэлементы —  $10^{-5}$  % и менее (золото, ртуть, радий и другие радиоактивные элементы).

В диагностических целях очень важно определять в различных биологических жидкостях электролиты (катионы, анионы). Среди макроэлементов особого внимания заслуживает исследование содержания натрия и калия в эритроцитах и плазме крови. Для исследования концентрации этих электролитов используют:

1. Химические методы: а) определение натрия гравиметрическим, титриметрическим, колориметрическим способами; б) установление калия комплексометрическим титрованием, колориметрическим и другими методами.

2. Пламенная спектрофотометрия: а) атомно-эмиссионная, б) атомно-абсорбционная.

3. Рентгеновская спектроскопия.

4. Нейтронактивационный анализ.

5. Потенциметрическое определение.

6. Пламенная фотометрия.

Химические методы определения натрия, основанные на осаждении его сложной тройной солью уранилмарганцанатрияацетата или уранилмагниянатрияацетата, трудосмки и неточны.

Большинство химических способов исследования калия чаще всего базируется на образовании сложных комплексных солей калия. Калий в основном осаждают в форме: 1) кобальтинитрита, из которого затем выделяют кобальтат. Последний титруют с помощью комплекса (двунаатриевой соли этилендиаминтетраацета-

та) в присутствии мурексида; 2) купрогексанитрита — о содержании калия судят по количеству связанного итрипта.

Наиболее надежными из химических методов определения калия в биологических жидкостях являются методы комплексонометрического титрования.

Метод атомно-эмиссионной спектрофотометрии основан на испускании света атомами под действием высокой температуры.

Способ атомно-абсорбционной спектрофотометрии базируется на поглощении света атомами исследуемого элемента.

Все эти способы определения калия требуют применения дорогой аппаратуры.

Методы рентгеновской спектроскопии, нейтронактивационный анализ отличаются простотой техники и более высокой чувствительностью, чем другие, однако они не получили широкого распространения из-за необходимости использования очень высокой температуры.

Для потенциметрического определения калия и натрия отечественной промышленностью в последнее время освоен выпуск портативных приборов.

## ИССЛЕДОВАНИЕ ЭЛЕКТРОЛИТОВ В КРОВИ И МОЧЕ МЕТОДОМ ПЛАМЕННОЙ ФОТОМЕТРИИ

Метод пламенной фотометрии основан на способности элементов возбуждаться и испускать лучи света определенной длины волны при сжигании солей минеральных веществ в пламени. Излучения различных элементов выделяют посредством специальных светофильтров. Попадая на фотоэлемент, световой поток возбуждает фототок, который регистрируют гальванометром.

Пламенная фотометрия характеризуется высокой точностью, чувствительностью, быстротой (если химические методы осуществляются в течение 1,5 ч, то пламенная фотометрия — всего за 10 мин), надежностью, простотой определения, что очень важно при массовых обследованиях. Особое преимущество рассматриваемого метода заключается в том, что для реакции требуется минимальное количество исследуемого материала, которое может быть недостаточным для определения химическими методами. Благодаря этому стали возможными исследования минерального обмена в детской практике, хирургии (искусственная почка), при динамическом наблюдении за больным в процессе лечения.

Поэтому в качестве унифицированных для определения натрия и калия в биологических жидкостях предлагаются методы пламенной фотометрии (с построением калибровочных кривых). В низкотемпературном пламени ( $+1200^{\circ}\text{C}$ : смесь светильный газ-воздух) практически возбуждаются лишь атомы щелочных и щелочноземельных металлов. В высокотемпературном пламени ( $+2300^{\circ}\text{C}$ : смесь ацетилен-кислород воздуха;  $+2500-2700^{\circ}\text{C}$ : водород-кислород и  $+3000-3500^{\circ}\text{C}$ : ацетилен-кислород) возбуждаются также атомы ряда тяжелых металлов.

Определение концентрации исследуемого элемента можно осуществлять двумя способами: непосредственным — по данным измерения абсолютной интенсивности излучения или же по методу внутреннего стандарта, в котором излучение исследуемого элемента

сравнивают с излучением другого элемента, добавляемого к пробе в определенной концентрации и служащего внутренним стандартом (элементом для сравнения).

Применение метода внутреннего стандарта до некоторой степени уменьшает величину погрешностей, вызываемых различием состава анализируемого и стандартного растворов, изменением режима сгорания аэрозоля. Во все пробы и в калибровочные растворы вводят всегда одинаковое количество родственного элемента (элемента для сравнения) — лития. При построении калибровочных графиков на оси ординат откладывают не показания прибора по исследуемому катиону, а отношение показаний по этому элементу к показанию по литию; на ось абсцисс наносят значения концентрации изучаемого катиона (натрия или калия). Определение методом внутреннего стандарта можно проводить только на приборах, имеющих светофильтр для лития.

Поэтому на практике в стандартные растворы кроме исследуемого электролита вводят некоторые другие компоненты биологических жидкостей в их естественных концентрациях. Так, при приготовлении стандартных растворов для определения натрия в моче (в противоположность исследованию плазмы крови) в их состав вводят калий, так как величина отношения  $K/Na$  в моче значительно выше, чем в плазме крови.

#### Определение электролитов в крови и моче методом пламенной фотометрии

Исследование ионов  $K$  и  $Na$  в цельной крови не может служить достаточно достоверным показателем минерального обмена, так как сдвиги, происходящие в содержании электролитов в форменных элементах и в сыворотке крови, часто идут в противоположных направлениях. В связи с этим для постановки анализа более правильно определять концентрацию электролитов в плазме крови.

Как известно, концентрация калия в эритроцитах значительно превышает таковую в плазме крови. Поэтому калий выходит из эритроцитов даже через неповрежденную оболочку. Исходя из этого определять уровень калия в плазме нужно не позже  $3/4-1$  ч после взятия у обследуемого крови. Содержание калия и натрия в эритроцитах можно исследовать двумя способами — прямым и косвенным.

При косвенном вычисляют разницу между содержанием электролитов в цельной крови и плазме. Предпочтительнее электролиты определять непосредственно в эритроцитах (прямым путем).

Подготовка биологического материала к анализу. Установление интересующих компонентов проводят в разведенных водных растворах плазмы крови и отцентрифугированной суточной моче. При этом допустимо применять следующие разведения: для определения в крови натрия —  $1:100$ ; калия —  $1:10$ ,  $1:20$  и  $1:100$ ; кальция —  $1:10$  или  $1:20$ ; уровня натрия и калия в моче —  $1:200$ . Спинномозговую жидкость, экссудаты, трансудаты разводят так же, как плазму. Желудочный сок разбавляют дистиллированной водой в 50 раз и затем делают разведения, как и при анализе плазмы крови.

При определении электролитов в эритроцитах в качестве антикоагулянта обычно применяют гепарин, добавляемый из расчета 1 капля (0,02 мг) на 5—10 мл крови; можно также распылять мелко-

дисперсный порошок шавелевокислого аммония (оксалата аммония) на стенках центрифужной пробирки.

Гепаринизированную кровь центрифугируют, отделяют плазму, эритроциты гемолизируют и используют для анализа.

Существует много модификаций, касающихся режимов центрифугирования и способов гемолиза эритроцитов. Последний вызывают различными методами: 1) дистиллированной водой; 2) раствором уксусной кислоты с последующим разведением дистиллированной водой; 3) замораживанием в холодильнике с быстрым размораживанием. После двух замораживаний наступает полный гемолиз.

В зависимости от времени и скорости центрифугирования концентрация ионов калия и натрия в эритроцитах меняется в широких пределах: для калия — от 76,8 (нижние границы) до 205,3 ммоль/л (верхние границы); для натрия — от 11,3 до 34,8 ммоль/л.

Центрифугирование необходимо проводить в строго определенных условиях (количество оборотов в минуту, продолжительность процесса). Оптимальный режим — центрифугирование в течение 15 мин при 3000 об/мин; затем плазму с верхним слоем эритроцитов отсасывают и осуществляют вторичное центрифугирование на протяжении 30 мин при 3000 об/мин.

Следует заметить, что рекомендации относительно режима центрифугирования зачастую не могут быть использованы из-за указания не величины фактора разделения, а скорости вращения ротора центрифуги. Данное обстоятельство усугубляется и тем, что в лабораториях, как правило, отсутствует постоянный тахометрический контроль за режимом работы центрифуг.

Для выбора оптимального режима центрифугирования крови можно рекомендовать простой методический прием, апробированный в лаборатории биохимии Харьковского НИИ общей и неотложной хирургии В. И. Губским и В. И. Проценко. Сущность его состоит в построении графика зависимости концентрации электролитов в эритроцитах от частоты вращения ротора центрифуги при постоянной экспозиции, равной 30 мин. Оказалось, что частота вращения ротора центрифуги, достаточная для максимально полного отделения плазмы и получения стабильных результатов при определении натрия, должна быть не менее 4000 об/мин.

Для измерения концентрации калия в эритроцитах режим центрифугирования не должен превышать 5000 об/мин, поскольку при больших скоростях вращения регистрируется снижение эритроцитарного содержания калия.

После первичного отделения эритроцитов удается установить для каждой центрифуги режим работы, достаточный для окончательного отделения эритроцитов от плазмы, и одновременно избежать разрушения клеток. Работа на выявленном плато позволяет получить стабильные результаты и предотвратить ошибки, обусловленные недостаточной обработкой крови. При обследовании доноров авторами были найдены средние значения концентрации натрия в эритроцитах, равные  $14,14 \pm 0,45$  ммоль/л, с индивидуальными колебаниями от 12,5 до 16,6 ммоль/л и средние величины концентрации калия, составившие  $83,91 \pm 1,00$  ммоль/л, с индивидуальными колебаниями от 73,0 до 91,0 ммоль/л.

Эритроциты гемолизируют дистиллированной водой и разводят для исследования натрия 1:26, калия — 1:260.

Приготовление стандартных растворов для определения электролитов. Основные стандартные растворы получают из дважды перекристаллизованных химически чистых солей хлористого натрия, хлористого калия и углекислого кальция, высушенных до постоянного веса ( $\text{NaCl}$  можно прокалить и охладить в эксикаторе).

Стандартные растворы готовят исходя из используемого разведения биологической жидкости. Для компенсации ионного воздействия в стандартные растворы для калия добавляют натрий. Указанные растворы для натрия однокомпонентны, так как содержание калия и кальция после разведения практически не влияет на результаты исследования.

Приготовление основных стандартных растворов: 1) раствор соли натрия — 1 г/л. 2,5418 г хлористого натрия х. ч., высушенного до постоянного веса, вносят в мерную колбу емкостью 1000 мл, растворяют и доводят до метки дистиллированной водой. 1 мл раствора содержит 1 мг натрия;

2) раствор соли калия — 1 г/л. 1,9069 г хлористого калия х. ч., высушенного до постоянного веса, помещают в мерную колбу емкостью 1000 мл, растворяют и доливают до метки дистиллированной водой. 1 мл раствора содержит 1 мг калия;

3) раствор соли кальция — 1 г/л. 2,4970 г углекислого кальция х. ч., высушенного при  $+100-120^{\circ}\text{C}$  до постоянного веса, растворяют в 50 мл 1 н раствора соляной кислоты и доводят дистиллированной водой до 1000 мл в мерной колбе. 1 мл этого раствора содержит 1 мг кальция.

Рабочие стандартные растворы для определения калия в плазме крови готовят, беря за основу средний уровень калия (18 мг/100 мл; 4,62 ммоль/л) и натрия в плазме (310 мг/100 мл; 134,8 ммоль/л), а также используя разведение плазмы (1:20). В 5 мерных колб емкостью 100 мл вносят соответственно 0,6; 0,8; 1,0; 1,2; 1,4 мл раствора калия, а затем в каждую из них добавляют по 16,5 мл основного стандартного раствора хлористого натрия и указанное в табл. 37 количество раствора углекислого кальция.

Рабочие стандартные растворы для определения натрия в плазме крови готовят, учитывая применяемое разведение плазмы (1:100) и средний уровень в ней натрия (134,8 ммоль/л). В 7 мерных колб емкостью 100 мл вносят соответственно 2,6; 2,8; 3,0; 3,4; 3,8; 4,0; 4,2 мл раствора натрия и доводят объем до метки дистиллированной водой (табл. 38).

Однокомпонентный характер рабочих стандартных растворов натрия объясняется тем, что в плазме крови калия и кальция содержится значительно меньше, чем натрия, и их присутствие практически не влияет на результаты исследования.

Приготовление рабочих стандартных растворов для установления калия и натрия в эритроцитах показано в табл. 39,40.

Для исследования электролитов в моче из отмеренного суточного ее количества отбирают около 100—150 мл. Мочу центрифугируют и разводят в 200 раз.

Рабочие стандартные растворы для определения калия в моче готовят, используя применяемое разведение мочи (1:200) и средний уровень в ней калия (200 мг/100 мл; 51,2 ммоль/л) и натрия (350 мг/100 мл; 152,2 ммоль/л). В 5 мерных колб емкостью 100 мл вносят соответственно 0,2; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 мл раствора калия, в каж-

Табл. 37. Данные к приготовлению рабочих стандартных растворов для определения калия в плазме крови

Основные стандартные растворы (мл)			Дистилли- рованная вода до 100 мл	Концентрация					
				калия			кальция		
KCl	NaCl	CaCO <sub>3</sub>		в рабочем растворе (мг/100 мл)	в плазме с учетом разведения 1 : 20 (мг/100 мл, ммоль/л)		в рабочем растворе (мг/100 мл)	в плазме с учетом разведения 1 : 20 (мг/100 мл, ммоль/л)	
0,6	16,5	0,2	82,7	0,6	12	3,07	0,2	4	1,0
0,8	16,5	0,4	82,3	0,8	16	4,10	0,4	8	2,0
1,0	16,5	0,5	82,0	1,0	20	5,12	0,5	10	2,5
1,2	16,5	0,6	81,7	1,2	24	6,15	0,6	12	3,0
1,4	16,5	0,8	81,3	1,4	28	7,17	0,8	16	4,0

Примечание. Стандартные растворы электролитов желательно содержать в полиэтиленовой посуде (бутылях, стаканчиках).



**Табл. 38.** Данные к приготовлению рабочих стандартных растворов для определения натрия в плазме крови

Основной стандартный раствор NaCl (мл)	Дистиллированная вода (мл)	Концентрация натрия		
		в стандартном растворе (мг/100 мл)	с учетом разведения плазмы в 100 раз (мг/100 мл, ммоль/л)	
2,6	97,4	2,6	260	113,1
2,8	97,2	2,8	280	121,8
3,0	97,0	3,0	300	130,5
3,4	96,6	3,4	340	147,9
3,8	96,2	3,8	380	165,3
4,0	96,0	4,0	400	174,0
4,2	95,8	4,2	420	182,6

**Табл. 39.** Данные к приготовлению рабочих стандартных растворов для определения калия в эритроцитах

Основной стандартный раствор (мл)	Дистиллированная вода (до 100 мл)	Концентрация калия		
		в стандартном растворе (мг/100 мл)	с учетом разведения эритроцитов 1 : 260 (мг/100 мл, ммоль/л)	
1,1	98,9	1,1	286	73,2
1,2	98,8	1,2	312	79,8
1,3	98,7	1,3	338	86,5
1,4	98,6	1,4	354	90,8
1,5	98,5	1,5	390	100,0
1,6	98,4	1,6	416	106,1

**Табл. 40.** Данные к приготовлению рабочих стандартных растворов для определения натрия в эритроцитах

Основной стандартный раствор NaCl (мл)	Основной стандартный раствор KCl (мл)	Дистиллированная вода до 100 мл	Концентрация натрия		
			в стандартном растворе (мг/100 мл)	с учетом разведения эритроцитов 1 : 26 (мг/100 мл, ммоль/л)	
0,4	14	85,6	0,4	10,4	4,5
0,5	14	85,5	0,5	13,0	5,6
1,0	14	85,0	1,0	26,0	11,3
1,5	14	84,5	1,5	39,0	16,9
2,0	14	84,0	2,0	52,0	22,6
2,5	14	83,5	2,5	65,0	28,3

дую из них добавляют по 1,75 мл раствора натрия, после чего доводят объем дистиллированной водой до метки (табл. 41).

Рабочие стандартные растворы для исследования натрия в моче получают исходя из разведения мочи (1:200) и среднего содержания в ней натрия (350 мг/100 мл; 152,2 ммоль/л) и калия (200 мг/100 мл; 51,2 ммоль/л). В 6 мерных колб емкостью 100 мл вливают соответственно 0,2; 0,5; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 мл раствора натрия, в каждую добавляют по 1,0 мл раствора калия и доводят до метки дистиллированной водой (табл. 42).

Для повседневного построения калибровочных кривых с учетом разных биологических жидкостей требуется много времени и определенных навыков. Это неудобно при проведении срочных анализов в плазме, эритроцитах, моче, диализате и т. д.

В. Г. Баринов (1973) предложил упрощенный вариант калибровки пламенного фотометра. Метод заключается в следующем.

**Табл. 41.** Данные к приготовлению рабочих стандартных растворов для определения калия в моче

Основной стандартный раствор KCl (мл)	Основной стандартный раствор NaCl (мл)	H <sub>2</sub> O до 100 мл	Концентрация калия		
			в стандартном растворе (мг/100 мл)	с учетом разведения мочи 1 : 200 (мг/100 мл, ммоль/л)	
0,2	1,75	98,05	0,2	40	10,2
0,5	1,75	97,75	0,5	100	25,6
1,0	1,75	97,25	1,0	200	51,2
1,5	1,75	96,75	1,5	300	76,8
2,0	1,75	96,25	2,0	400	102,4

**Табл. 42.** Данные к приготовлению рабочих стандартных растворов для определения натрия в моче

Основной стандартный раствор NaCl (мл)	Основной стандартный раствор KCl (мл)	H <sub>2</sub> O до 100 мл	Концентрация натрия		
			в стандартном растворе (мг/100 мл)	с учетом разведения мочи 1 : 200 (мг/100 мл, ммоль/л)	
0,2	1,0	98,8	0,2	40	17,4
0,5	1,0	98,5	0,5	100	43,0
1,0	1,0	98,0	1,0	200	87,0
2,0	1,0	97,0	2,0	400	174,0
3,0	1,0	96,0	3,0	600	261,0
4,0	1,0	95,0	4,0	800	348,0

Ход исследования. Для каждой из биологических жидкостей (плазмы, эритроцитов, мочи) готовят основные и рабочие стандартные растворы по общепринятым способам. Аппарат настраивают на стандартный режим, поочередно пропускают рабочие растворы для определения калия и натрия в плазме, эритроцитах и моче. Однократно строят кривые для перечисленных жидкостей. Эти кривые взаимно контролируют друг друга и отражают настройку аппарата, что дает возможность в дальнейшем отказаться от выведения повседневных кривых для каждого биологического субстрата отдельно и пользоваться только стандартным раствором для плазмы. Таким образом, чтобы исследовать электролиты в плазме, эритроцитах и моче, достаточно осуществить юстировку аппарата по стандартному раствору для плазмы, после чего произвести определение солей в соответствующей биологической жидкости.

В норме концентрация калия у взрослых практически здоровых людей составляет: в цельной крови — 38,4—64,0 ммоль/л (150—250 мг/100 мл), в плазме (сыворотке) — 3,6—6,2 ммоль/л (14—24 мг/100 мл), в эритроцитах — 79,4—112,6 ммоль/л (310—440 мг/100 мл).

Поскольку содержание калия в эритроцитах намного выше, чем в плазме, исследуемая плазма (сыворотка) не должна иметь даже следов гемолиза. При этом сыворотку выделяют не позже чем через 2 ч после взятия крови.

По данным исследований Р. М. Заславской, Л. П. Радченко (1976) и других авторов, у здоровых лиц разного возраста существует определенная ритмичность суточных колебаний показателей натрия и калия. У здоровых людей молодого (от 20 до 27 лет) возраста установлено статистически достоверное повышение содержания калия в плазме днем ( $4,74 \pm 0,14$  ммоль/л против  $3,91 \pm 0,21$  ммоль/л в 2 ч ночи) и в эритроцитах вечером ( $93,85 \pm 1,22$  ммоль/л против  $88,32 \pm 1,60$  ммоль/л в 7 ч утра). Экскреция натрия и калия минимальная в ночные часы (соответственно  $134,48 \pm 8,28$  и  $35,85 \pm 4,36$  ммоль/л против  $176,96 \pm 6,67$  и  $44,10 \pm 5,11$  ммоль/л в 12 ч дня).

У здоровых людей зрелого, среднего и пожилого (от 36 до 76 лет) возраста выявлено снижение в плазме крови содержания калия в ночные часы ( $4,36 \pm 0,14$  ммоль/л против  $4,82 \pm 0,16$  ммоль/л в 7 ч утра). Колебания уровня натрия в плазме в течение суток несущественны. В эритроцитах концентрация натрия значительно снижается в дневные и вечерние часы ( $14,02 \pm 1,02$  ммоль/л и  $13,36 \pm 0,98$  ммоль/л против  $17,97 \pm 1,45$  ммоль/л в 7 ч утра и  $18,11 \pm 0,29$  ммоль/л в 2 ч ночи).

Отмеченные различия в суточном ритме обмена калия и натрия у здоровых лиц разного возраста, по-видимому, связаны с возрастными особенностями нейро-эндокринных механизмов, и прежде всего с функцией надпочечников.

#### *Клинико-диагностическое значение исследования содержания калия и натрия в крови*

Гипокалиемия приводит к тяжелым нарушениям в организме человека. При ней наступают слабость и гипотония мышечной ткани, а в некоторых тяжелых случаях исчезают рефлексы, появляются

ся вялые параличи. Наблюдаются нарушения в области пищеварительного тракта (потеря аппетита, рвота, ослабление перистальтики вплоть до паралитического плеуса). Сердечно-сосудистая система реагирует расширением сердца, тахикардией, возникновением систолического шума.

Гиперкалиемия сопровождается сердечными симптомами: коллапсом, тахи- и брадикардией, часто аритмиями. При концентрации калия 10 ммоль/л наступает внутрижелудочковая блокада с мерцанием желудочков. При гиперкалиемии порядка 13 ммоль/л сердце останавливается в диастоле. Изменения выявляются в электрокардиограмме, когда концентрация калия падает ниже 3 ммоль/л или поднимается выше 6—7 ммоль/л. Гиперкалиемия представляет собой большую опасность, чем гипокалиемия, так как может быстро наступить прекращение деятельности сердца.

Гипокалиемии отмечают:

1. При недостаточном приеме калия с пищей, например после тяжелых операций.

2. При усиленном выделении калия с мочой, например при гиперфункции коры надпочечников и передней доли гипофиза, первичном альдостеронизме (синдром Конна), вторичном альдостеронизме, при усиленной секреции антидиуретического гормона, передозировке АКТГ, препаратов коры надпочечников и других.

3. При рвотах и алкалозе. Желудочный сок содержит калия в 3—5 раз больше, чем сыворотка крови, поэтому при рвотах наступает значительная потеря калия, которая приводит к гипокалиемическому состоянию (до 1,5 ммоль/л). Сопутствующий алкалоз увеличивает эту гипокалиемию. При алкалозах, для того чтобы сохранить  $H^+$ -ион, организм усиленно выделяет с мочой  $K^+$ .

4. При поносах и ацидозах. При тяжелых поносах, особенно при токсикозах, организм теряет много внеклеточной жидкости. Для сохранения осмотического давления из клеток начинают поступать ионы калия, которые быстро выделяются почками, вследствие чего и происходит гипокалия. Место вышедшего из клетки калия занимает натрий и наступает ацидоз. Оценивая результаты, следует помнить о том, что гипокалиемия не всегда отождествляется с гипокалией, то есть уровень калия в крови не всегда показывает содержание калия в тканях: при гипокалии допустимо существование и гиперкалиемии. Это обусловлено тем, что при сгущении крови может возникнуть относительная гиперкалиемия; к тому же при нарушении функции почек (уменьшение объема плазмы) и олигурии выделение  $K^+$  еще более затрудняется, что ведет к гиперкалиемии.

Токсикозы детского возраста, как правило, протекают со значительной гипокалиемией. Поэтому при них рекомендуется вводить в организм калий, но только после восстановления функции почек, так как введение калия при нарушенной функции почек способствует развитию гиперкалиемии. Гипокалиемию вызывает не только ацидоз, сопутствующий токсикозам, но и другие формы ацидоза, так как в этом случае происходит переход  $H^+$ -иона в клетку, выделение  $K^+$  в экстрацеллюлярную (внеклеточную) жидкость с последующим выведением его из организма.

5. При сахарном диабете. В этих случаях гипокалиемия возникает вследствие нескольких причин. С одной стороны, это ацидоз и обезвоживание, с другой — нарушение углеводного обмена клетки, поскольку для нормального обмена углеводов необходим калий, а

он выходит в экстрацеллюлярную жидкость. Введение в организм инсулина при диабете только увеличивает существующую гипокалиемию — за счет улучшения углеводного обмена в клетке. Однако из-за поглощения дополнительного количества калия и без того бедной этим элементом крови наступает резкая гипокалиемия. Некоторые авторы наблюдали падения уровня калия до 0,51 ммоль/л, приводившие к смерти. Поэтому необходимо вместе с инсулином вводить достаточное количество калия.

6. При парентеральном введении жидкостей, не содержащих калий, как, например, растворов поваренной соли, глюкозы и других. Это способствует «вымыванию» калия из клеток и развитию гипокалиемии.

7. При гормонально обусловленной гипокалиемии вследствие повышенного выделения альдостерона, АКТГ, антидиуретина.

8. При пароксизмальном параличе мышц гипокалиемия тесно связана с заболеванием. В этих случаях отмечали падение калия до 2,05 ммоль/л (8 мг/100 мл).

Гиперкалиемия встречается реже гипокалиемии. Наиболее важные состояния, связанные с гиперкалиемией, следующие:

1. Увеличенный прием калия, приводящий к гиперкалиемии только при нарушенной функции почек. Поэтому впрыскивание растворов, богатых калием, особенно опасно для больных с недостаточностью почек.

2. Повышенный распад клеток и тканей (гемолитические анемии, опухоли, некрозы). При этом калий разрушенных клеток поступает в кровь.

3. Почечная недостаточность, например различные формы олигурии, анурии, хронических нефритов. В этих случаях гиперкалиемия появляется из-за нарушенного выделения калия.

4. Обезвоживание. Концентрация калия в крови увеличивается.

5. Анафилактический шок, возникающий, вероятно, вследствие нарушения ионного обмена мембраны клеток.

6. Гипофункция коры надпочечников (болезнь Аддисона).

Гиперкалиемия может сопровождаться гиперкалией (почечная недостаточность, гипокортицизм) или гипокалией (дегидратация).

Количество натрия в крови у взрослых и детей практически одинаково. Оно составляет 70,0—98,0 ммоль/л для цельной крови; 135,0—152,0 ммоль/л для сыворотки (плазмы) и 17,4—21,7 ммоль/л для эритроцитов. Клиническими симптомами гипонатриемии являются апатия, потеря аппетита, тошнота, рвота, нарушение рефлексов, тахикардия, психоз, анурия, гипотония с потерей сознания.

Различают абсолютные и относительные гипонатриемии.

Абсолютные гипонатриемии являются причиной так называемого синдрома солевой недостаточности. Встречается при поносе, рвоте, усиленном потении, недостаточности почек, при выделении отечной жидкости, острой недостаточности надпочечников, кровоизлиянии, диабетном ацидозе.

Относительная гипонатриемия бывает при введении в организм большого количества жидкости, не содержащей электролитов, что способствует разведению плазмы. Наступлению такого состояния содействуют недостаток поваренной соли в пище и нарушение функции почек.

Гипернатриемия клинически сопровождается тяжелым состоянием, повышением температуры и тахикардией.

Первичной при появлении гипернатриемии чаще всего является потеря воды. Встречается при больших диурезах, неконтролируемом сахарном диабете, ограниченном приеме жидкости, гиперкортицизме.

## МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ КАЛЬЦИЯ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ

Кальций сыворотки крови находится в формах: 1) свободного ионизированного кальция; 2) связанного с белками, недиффундирующего кальция; 3) кальция недиссоциированного, но способного к диффузии через полупроницаемые мембраны.

Эритроциты содержат приблизительно 0,5 ммоль/л Са, лейкоциты — около 2,5 ммоль/л, сыворотка — 4,5—6,0 ммоль/л, цельная кровь — 2,5—3,5 ммоль/л. Диагностическое значение имеет определение кальция только в плазме (сыворотке), где его концентрация более постоянна.

Химические методы исследования общего кальция в сыворотке крови можно разделить на две большие группы: прямые и непрямые, состоящие в предварительном осаждении кальция в виде труднорастворимых в воде соединений.

Большинство применявшихся ранее методов определения общего кальция в крови основывалось на выделении его оксалатом аммония в форме щавелевокислой соли, а также на осаждении кальция пикролоновой, хлоранилиновой кислотами (либо пикролонатом, хлоранилатом) с последующим исследованием осадка гравиметрическим, колориметрическим или чаще всего титрометрическим (например, перманганатометрическим) способами. Методы этой группы отличаются плохой воспроизводимостью результатов, большой трудоемкостью, многочисленными источниками ошибок, обусловленных необходимостью многократного промывания осадка, его высушивания, прокалывания, растворения в минеральных кислотах и т. д.

В этой связи несравненно больший интерес представляют прямые методы определения общего кальция: колориметрические (с глиоксальбис [2-оксанилом] — реактивом ГБОА, с о-крезолфталеинкомплексом — о-КФК; с мурексидом, с метил-тимоловым сипим и другими реактивами), флюориметрические, пламенно-фотометрические, титрометрические (комплексометрические), а также способ атомно-абсорбционной спектроскопии, признанный всеми как референтный.

Предприятие «Лахема» (ЧССР) предлагает использовать для исследования общего кальция спектрофотометрический метод, основанный на цветной реакции с глиоксальбис[2-оксанилом]. Проведение ее затрудняется малой растворимостью ГБОА в воде, а также нестабильностью образующегося комплекса в щелочной среде (оптимальные условия для протекания реакции создаются при pH 11,0—12,6). Достаточную растворимость ГБОА в щелочных растворах обеспечивает добавка метанола или этанола. В неводных средах разрушение комплекса происходит несколько позднее, чем в воде: считают, что он стабилен в течение 15 мин. Фирма «Лахема» (ЧССР) поставляет в нашу страну наборы реактивов для определения кальция указанным методом.

о-Крезолфталенкомплексон в отличие от реактива ГБОА формирует комплекс, стабильный в течение нескольких часов и нечувствительный к температурным воздействиям. К сожалению, метод, основанный на использовании о-КФК, недостаточно специфичен, поскольку магний и соли тяжелых металлов мешают определению кальция данным способом. Правда, эта интерференция может быть подавлена цианистым калием (ядовит) и некоторыми другими реактивами, например сульфатом, ацетатом натрия.

Колориметрические способы с применением мурексида или метил-тимолового синего не получили широкого распространения главным образом потому, что цветной комплекс кальция с мурексидом неустойчив, а таковой с метил-тимоловым синим обнаруживает малый предел линейности калибровочной кривой (несмотря на высокую чувствительность метода, специфичность и стабильную окраску комплекса).

Определение кальция сыворотки на пламенном фотометре не так удобно, как пламенфотометрическое исследование калия и натрия. Оно требует более высоких температур и в большей степени, чем определение  $K^+$  и  $Na^+$ , зависит от содержания других ионов в сыворотке, прежде всего натрия, карбонат- и сульфат-ионов. Флюориметрические методы точны, но для их исполнения необходима дорогостоящая аппаратура.

В настоящее время наиболее распространенным в клинике методом является комплексометрическое определение кальция в сыворотке крови. В большинстве случаев оно сводится к прямому титрованию разведенной сыворотки комплексонным раствором при подходящих реакции (рН) среды и индикаторе.

При исследовании кальция в качестве комплексона чаще всего используют динатриевую соль этилендиаминтетрауксусной кислоты (трилон Б, комплексон III, хелатон III, версен), этиленгликольбисаминноэтилтетрауксусную кислоту (обладающую большим сродством к кальцию, чем к магнию), а в качестве индикаторов — мурексид (дает нечеткий переход окраски), флюорексон, кальред, эриохром черный Т (этот реактив неустойчив в растворах) и некоторые другие.

Основное неудобство титриметрических методов состоит в том, что индикаторный переход не всегда удается зафиксировать точно. Для объективизации этого процесса некоторые авторы предлагают проводить титрование фотометрически. Однако различие в окраске опытных и контрольных проб само по себе служит источником ошибок при фотометрической регистрации процесса титрования.

Используют также методы, базирующиеся на физических свойствах кальция: полярографический, спектрографический, нейтронно-активационный анализ, абсорбционная пламенная фотометрия.

Наиболее точным является способ атомно-абсорбционной спектроскопии, принятый в ряде стран в качестве референтного для оценки надежности других методов определения кальция.

Определение физиологически активного, ионизированного кальция стало возможно с применением ионоселективных электродов, для чего используют метод прямого потенциометрического измерения.



**Определение общего кальция в сыворотке крови  
фотометрическим методом, основанным  
на реакции с глиоксальбис[2-оксианилом]**

**Принцип.** Раствор ГБОА образует с ионами кальция в щелочной среде комплекс красного цвета, интенсивность которого определяют фотометрически.

**Реактивы.** 1. 0,4 н раствор NaOH (готовят из фиксанала или из крепкого раствора NaOH точно известной концентрации, например, 500 г/л).

2. Метанол, очищенный дистилляцией.

3. Раствор глиоксальбис[2-оксианила] в метаноле — 0,1 г/100 мл.

4. Эталонный (стандартный) раствор кальция — 100 мг/л, или 2,50 ммоль/л. Углекислый кальций ( $\text{CaCO}_3$ ) высушивают при температуре +100—120° С. 0,125 г.  $\text{CaCO}_3$  растворяют при нагревании в 30—40 мл 0,1 н раствора HCl. Охлаждают, переливают в колбу на 500 мл и доводят объем до метки водой.

**Ход определения.** В чистую пробирку вносят 1 мл дистиллированной воды, 0,02 мл свежей сыворотки и добавляют 2 мл раствора ГБОА. Содержимое пробирки перемешивают и оставляют на 30 мин (более длительное стояние также не мешает определению) при комнатной температуре. Затем в нее доливают 0,5 мл раствора едкого натра и содержимое вновь перемешивают. Одновременно ставят контрольную пробу на реактивы (что необязательно) и пробу со стандартным раствором (0,02 мл его проводят через все этапы методики). Измерение осуществляют в промежутке между 5 и 15 мин с момента добавления щелочи. Экстинкцию опытного и стандартного растворов измеряют по отношению к дистиллированной воде (или контрольной пробе) на ФЭКе с зеленым светофильтром (длина волны 540 нм) в кюветах с шириной слоя 10 мм. Результаты оценивают по формуле:

$$\frac{E_{\text{оп.}}}{E_{\text{ст.}}} \cdot 2,50 = a \text{ ммоль/л Ca}^{++},$$

где 2,50 — показатель концентрации стандартного раствора кальция в ммоль/л (10 мг/100 мл).

Расчет можно производить и по калибровочной кривой, построенной для интервала концентраций 0,25—3,00 ммоль/л (1—12 мг/100 мл). Верность калибровочной кривой необходимо периодически контролировать.

**Норма.** 2,25—3,00 ммоль/л (4,50—6,00 мг-экв/л; 9,0—12,0 мг/100 мл).

**Определение общего кальция  
в сыворотке и плазме крови по цветной реакции с о-КФК**

**Принцип.** Раствор о-КФК образует с кальцием в щелочной среде комплекс красно-фиолетового цвета. Интенсивность окраски пропорциональна концентрации кальция.

**Реактивы.** 1. Калий-боратный буфер. В мерной колбе вместимостью 1 л к 300 мл дистиллированной воды добавляют 200 г борной кислоты, доливают 580 мл 5 н едкого кали и растворяют при +56° С. Объем доводят до 1 л дистиллированной водой.

2. Глициноый буфер — 2 моль/л. В мерной колбе вместимостью 50 мл растворяют 7,5 г глицина в 40 мл дистиллированной воды и доливают объем до метки. Добавляют 2 капли хлороформа. Хранят в холодильнике.

3. Раствор 8-оксихинолина (оксина) в абсолютном спирте — 1 г/100 мл.

4. Оксидный буфер. В мерную колбу вместимостью 500 мл вносят 12,5 мл калий-боратного буфера, приливают 5 мл глицинового буфера, 300 мл дистиллированной воды; 5 мл едким кали доводят pH раствора до 10,5—10,6, добавляют 50 мл 1 г/100 мл раствора 8-оксихинолина и доводят объем до метки дистиллированной водой. Проверяют pH.

5. Рабочий крезолфталеиновый раствор. 10 мг о-КФК растворяют в 100 мл оксидного буфера. Реактив хранят в холодильнике 2—3 дня.

6. Основной калибровочный раствор. 0,2497 г высушенного углекислого кальция растворяют в 5 мл 1 н соляной кислоты в мерной колбе вместимостью 100 мл, доливают объем до метки дистиллированной водой, накапывают несколько капель хлороформа. 1 мл раствора содержит 1 мг кальция (100 мг/100 мл раствора). Из него готовят рабочие калибровочные (стандартные) растворы, содержащие по 5,0; 7,5; 10,0; 12,5; 15,0 мг кальция в 100 мл и по 3 мг магния. Для этого к 5—15 мл основного калибровочного раствора добавляют по 1 мл раствора, содержащего 3 мг магния в 1 мл (2,5 г  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$  растворяют в дистиллированной воде в мерной колбе вместимостью 100 мл), доводят объем водой до 100 мл и доливают еще несколько капель хлороформа.

Ход определения. В пробирку с 3 мл рабочего раствора вносят 0,05 мл сыворотки, содержимое перемешивают. Через 5 мин измеряют оптическую плотность раствора на ФЭКе с зеленым светофильтром (длина волны 500—560 нм) в кювете с толщиной слоя 5 мм. Результаты сравнивают с аналогичными данными контрольной пробы. Окраска стабильна в течение нескольких часов после добавления сыворотки. Параллельно с опытной пробой ставят стандартную. В контрольную пробу вместо сыворотки добавляют дистиллированную воду.

Расчет ведут по правилу пропорций или по калибровочному графику.

Примечания: 1. Из-за узких пределов нормы небольшие колебания экстинкции стандартной пробы могут влиять на результаты исследования. Поэтому предпочтительно параллельно с опытной проводить стандартную пробу (10 мг/100 мл).

2. Посуду моют обычным способом, затем кипятят несколько минут в слабом растворе соляной кислоты и ополаскивают дистиллированной водой.

### *Клинико-диагностическое значение определения кальция в сыворотке крови*

В цельной крови практически здоровых взрослых людей минимальное значение содержания кальция составляет 2,25, максимальное — 3,00 ммоль/л; в сыворотке здоровых людей в среднем — 2,4—2,9 ммоль/л (9,6—11,6 мг/100 мл). В крови у здоровых новорожденных нижний предел концентрации кальция равен 1,75 ммоль/л (у недоношенных он более низкий — 1,25 ммоль/л); у более взрослых

детей содержание кальция такое же, как и у взрослых. Пол не оказывает существенного влияния на рассматриваемый показатель крови.

Содержание кальция зависит также от возраста, уменьшаясь с повышением его: до 20 лет уровень кальция составляет в среднем 2,9 ммоль/л, от 20 до 45 лет — 2,85—2,87 ммоль/л, выше 50 лет — 2,7 ммоль/л.

Гиперкальциемия бывает физиологической и патологической. Физиологическая гиперкальциемия имеет место у новорожденных после 4-го дня жизни, у недоношенных, а также у некоторых лиц после принятия пищи (алиментарная гиперкальциемия).

В патологических условиях гиперкальциемия встречается при гиперпаратиреозе (до 7,25 ммоль/л), гипервитаминозе D, особенно при назначении чрезмерных доз витамина D, аддисоновой болезни, синдроме Иценко — Кушинга, акромегалии, лейкозе, гангрене, перитоните (вследствие распада клеток, содержащих кальций), при сердечной недостаточности (из-за повышения содержания углекислоты в крови), желтухе и других патологических состояниях.

Выделяется также идиопатическая гиперкальциемия у грудных детей (3,0—4,25 ммоль/л).

Гипокальциемия отмечается гораздо чаще, чем гиперкальциемия. Особенно большое значение в детском возрасте имеет гипокальциемия при спазмофилии (тетании). При явной спазмофилии уровень кальция в крови падает до 1,5 ммоль/л и ниже. При скрытой форме заболевания уровень кальция варьирует между 1,5—2,0 ммоль/л. Необходимо также помнить, что некоторые формы спазмофилии протекают без уменьшения количества кальция в сыворотке. При спазмофилии падение уровня кальция в сыворотке происходит главным образом за счет ионизированного кальция.

Нередко обнаруживается гипокальциемия в раннем детском возрасте при рахите. Однако снижение концентрации кальция в сыворотке крови в этих случаях, как правило, весьма умеренное (до 2,12 ммоль/л), в связи с чем оно не имеет большого клинического значения.

Гипокальциемией сопровождаются и некоторые заболевания почек, особенно хронические. При нефрозах гипокальциемия возникает вследствие резкого уменьшения количества белка в плазме (гипопротеинемическая гипокальциемия). Уровень кальция в крови больных может упасть до 1,25—1,5 ммоль/л, и возможно появление симптомов тетании. При хронических нефритах уменьшение концентрации кальция до 1,25—1,75 ммоль/л объясняется повышением уровня фосфора (до 5,0 ммоль/л), вызываемого задержкой в организме фосфатов. Гипокальциемия встречается также при гипопаратиреозе, поносе, целиакии, остром панкреатите, гипонатриемии и т. д.

Следует заметить, что гипокальциемия при бронхопневмонии — почти постоянный симптом, причем степень ее соответствует тяжести процесса.

#### ИССЛЕДОВАНИЕ МАГНИЯ В СЫВОРОТКЕ (ПЛАЗМЕ) КРОВИ, ЭРИТРОЦИТАХ, МОЧЕ

Методы определения содержания магния можно разбить на следующие группы:

I. Химические: 1) титрометрические: комплексометрическое титрование, которое подразделяется на визуальное и фотоэлектрическое; 2) колориметрические, основывающиеся на реакциях с молибдатом, титановым желтым и с магоном.

II. Методы пламенной фотометрии.

III. Способ пламенной спектрофотометрии (атомно-абсорбционный).

IV. Спектрографические.

V. Флюориметрические.

В методах комплексометрического титрования используют комплексон III (трилон Б); в качестве индикатора применяют эриохром черный, хром темно-синий, мурексид, кальцени.

Методом комплексометрического титрования определяют суммарное содержание кальция и магния и количество кальция; концентрацию магния находят по разности двух определений. Эти методы (визуальные и фотометрические) неточны, а потому не могут применяться в качестве унифицированных.

Колориметрические методы можно разделить на прямые и непрямые. Первые основаны на образовании окрашенных соединений магния в щелочных растворах с титановым желтым и другими веществами.

В непрямых методах содержание магния рассчитывают по количеству связанного реактива. По точности и простоте прямые методы предпочтительнее непрямых. Из прямых способов наиболее чувствительны те, которые базируются на цветной реакции магния с титановым желтым (Колгофф, 1927) и магоном (Боон, 1962).

Методы этой группы различаются по способу осаждения белков.

Определение магния способом фотометрии пламени не получило распространения, так как оно возможно лишь на фотометрах, имеющих светофильтр для магния; присутствие других щелочных и щелочноземельных металлов мешает исследованию этого элемента.

В последние годы для определения магния пользуются атомно-абсорбционным методом. Одним из основных преимуществ его является простота и высокая чувствительность. Однако в клинических исследованиях этот способ используется еще сравнительно мало из-за дороговизны аппаратуры.

Спектрографический и люминесцентный методы исследования магния с 8-оксихинолином, реактивом «люмомагнесон ИРЕА» и другими труднодоступны для применения в широкой клинической практике.

Таким образом, в качестве унифицированных рекомендуются два метода определения магния: по цветной реакции с титановым желтым и магоном.

#### Определение магния в сыворотке (плазме) крови и эритроцитах по цветной реакции с титановым желтым

Принцип. Магний реагирует с титановым желтым в щелочной среде с образованием окрашенных соединений. Интенсивность окраски пропорциональна концентрации магния.

Реактивы. 1. Раствор вольфрамвокислого натрия — 10 г/100 мл.

2. 0,67 н раствор серной кислоты.
3. Раствор едкого натра — 6 г/100 мл.
4. 0,2 н раствор едкого натра.
5. Раствор солянокислого гидроксиламина (2 г/100 мл). Хранят в склянке из темного стекла.
6. Раствор титанового желтого — 0,075 г/100 мл. 18,7 мг титанового желтого растворяют в небольшом количестве дистиллированной воды в мерной колбе на 25 мл и доводят дистиллированной водой до метки. Держат в склянке из темного стекла в холодильнике, срок хранения — 10 дней.

7. Раствор метилового красного в 96° этаноле — 0,1 г/100 мл.

8. Стандартный раствор. 0,2026 г кристаллического сернокислого магния ( $MgSO_4 \cdot 6H_2O$ ) растворяют в небольшом количестве дистиллированной воды в мерной колбе на 1 л и доливают дистиллированной водой до метки. 1 мл раствора содержит 0,02 мг магния.

**Ход определения.** В центрифужную пробирку вносят 2 мл дистиллированной воды, 1 мл сыворотки (плазмы), 1 мл раствора вольфрамОВОкислого натрия, содержимое пробирки смешивают, добавляют 1 мл раствора серной кислоты и вновь тщательно перемешивают стеклянной палочкой. Через 15 мин пробу центрифугируют при 3,5—4 тыс. об/мин в течение 10 мин (или фильтруют через бумажный фильтр). Центрифугат (фильтрат) должен быть прозрачным. К 2,5 мл центрифугата (фильтрата), перенесенным в мерную центрифужную пробирку на 10 мл, вносят 1 каплю индикатора — метилового красного и нейтрализуют 0,2 н раствором едкого натра до появления желтой окраски.

К содержимому пробирки добавляют 1 мл 2 г/100 мл гидроксиламина, 1 мл раствора титанового желтого и 2 мл реактива 3 — едкого натра. Затем объем раствора доводят до 10 мл дистиллированной водой, пробу фотометрируют на ФЭКе с зеленым светофильтром при длине волны 500—560 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. Результаты сравнивают с данными контрольной пробы.

Контрольную пробу ставят параллельно опытной, беря вместо сыворотки дистиллированную воду.

Расчет производят по калибровочному графику. Из основного стандартного раствора готовят разведения (табл. 43).

Табл. 43. Данные для построения калибровочного графика

Основной стандартный раствор (мл)	Количество Mg в основном стандартном растворе (мг)	Дистиллированная вода до 6 мл	Концентрация Mg в пробе (мг/100 мл, ммоль/л)
0,25	0,005	5,75	1 0,41
0,50	0,010	5,50	2 0,82
0,75	0,015	5,25	3 1,23
1,00	0,020	5,00	4 1,65
1,25	0,025	4,75	5 2,06
1,50	0,030	4,50	6 2,47

Добавляют 1 мл раствора гидроксиламинна, 1 мл раствора титанового желтого и 2 мл реактива едкого натра (3).

Измеряют оптическую плотность стандартных проб в условиях, описанных для фотометрирования опытной пробы.

По литературным данным, содержание магния в сыворотке и плазме в норме составляет 0,78—0,91 ммоль/л (1,9—2,2 мг/100 мл) (для преобразования размерности мг/100 мл в мг-экв/л пользуются показателем 0,822, а для превращения ее из мг/100 мл в ммоль/л — коэффициентом 0,411).

### Определение магния в эритроцитах

Гепаринизированную кровь центрифугируют в течение 30 мин при 3000 об/мин. К 0,5 мл (1 объем) эритроцитной массы доливают 2,5 мл (5 объемов) дистиллированной воды; после гемолиза добавляют 1 мл (2 объема) 0,67 н  $H_2SO_4$ , 1 мл (2 объема) раствора вольфрамвокислого натрия (10 г/100 мл). Содержимое пробирки тщательно перемешивают, через 15 мин фильтруют. Далее определение ведут так же, как в центрифугате (фильтрате) сыворотки (плазмы).

Исследование магния в сыворотке (плазме) крови и моче по цветной реакции с магоном производят готовым набором реактивов, выпускаемым фирмой «Лаксма» (ЧССР). При этом концентрацию магния в биологических жидкостях следует выражать в ммоль/л, используя для этого необходимый коэффициент пересчета.

### *Клинико-диагностическое значение определения магния в сыворотке (плазме) крови*

При токсемии беременных, раке, хронической сердечной недостаточности, остром и хроническом панкреатите наблюдается выраженное снижение содержания магния в сыворотке крови.

Увеличение содержания магния в сыворотке отмечается при анурии, хронической почечной недостаточности и поражении почек, сопровождаемом гиперкальциемией. Суточная потребность организма человека в магнии составляет около 10 мг/кг массы тела и обычно покрывается за счет пищевых продуктов.

### МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ХЛОРИД-ИОНОВ В КРОВИ, МОЧЕ И СПИННОМОЗГОВОЙ ЖИДКОСТИ

Хлор находится в организме в ионизированном состоянии, преимущественно в виде аниона солей Na, K, Ca, Mg и играет большую роль в создании осмотического давления, участвует в регуляции кислотно-щелочного состояния организма. В крови хлор встречается главным образом в виде хлористого натрия. Его содержание в эритроцитах почти в 2 раза меньше, чем в плазме крови. Хлориды выводятся из организма в основном (на 90 %) с мочой, а также с потом и калом.

Для установления содержания хлорид-ионов в биологических жидкостях используются способы исследования, которые в зависи-

мости от принципа определения можно объединить в несколько групп.

I. Осадочные методы (аргентометрические) основаны на способности ионов серебра образовывать с ионами хлора нерастворимые соли. Количество осаждающего вещества эквивалентно содержанию хлорид-ионов. Конец реакции устанавливают по прекращению выпадения осадка или с помощью индикатора.

Осадочные методы включают в себя: удаление белка, осаждение ионов хлора и взаимодействие специального реактива с индикатором. В зависимости от того, какое вещество применяют в качестве осаждающего реагента или индикатора, осадочные методы можно разделить на следующие группы:

1. Методы, базирующиеся на принципе Мора. Белок осаждают спиртом, ионы хлора связывают азотнокислым серебром; индикатором является хромат калия. В конечной точке титрования формируется осадок красного цвета  $Ag_2CrO_4$ .

2. Методы обратного титрования, основанные на принципе Фольгарда. Белок осаждают любым кислым осадителем, ионы хлора — серебром, его избыток титруют раствором роданистой соли; индикатор — железозаммиачные квасцы. В конечной точке титрования жидкость окрашивается в красноватый цвет.

3. Методы, базирующиеся на осаждении ионов хлора йоднокислым серебром. Белок удаляют фосфорной, вольфрамовой и другими кислотами, смесь встряхивают с избытком твердого йодата серебра и фильтруют. Образуется осадок  $AgCl$ , а растворенный йод определяют титрометрически или колориметрически.

4. Методы с применением адсорбционных индикаторов (дихлорфлюоресцеин, эозин). Эти индикаторы адсорбируются в виде анионов на положительно заряженной поверхности хлорида серебра. Адсорбированный индикатор и тот же индикатор в растворе отличаются по цвету.

II. Ртутнометрические методы, в которых хлориды титруют непосредственно азотнокислой ртутью. По израсходованному количеству ее исследуют концентрацию хлорид-ионов.

Из способов этой группы наиболее широкое распространение получил метод Шэlsa (1941) и его модификации.

III. Колориметрические методы, основанные на образовании цветных соединений хлора с различными реактивами: тиоцианатом ртути и ртутным хлоранилатом.

IV. Электрохимические методы исследования.

V. Способы, базирующиеся на окислительно-восстановительных реакциях.

VI. Изотопные методы.

Метод Мора (1856) основан на формировании в конечной точке титрования хромата серебра (красного цвета).

Недостатки методов, использующих принцип Мора, состоят в том, что: 1) окраска, появляющаяся в конечной точке титрования, нечеткая; 2) титрование лучше проводить в нейтральной среде; 3) моча не должна содержать белок и органические вещества, например пурины, которые тоже осаждаются азотнокислым серебром. Методы, базирующиеся на принципе Фольгарда, в отличие от способа Мора дают возможность титровать даже сравнительно сильнокислые растворы. Однако им также присущи многие недостатки.

Йодометрические способы более чувствительны, чем метод Фоль-



гарда, однако на окраску раствора и способность йодата серебра к растворению могут влиять изменения концентрации, кислотности, температуры растворов, наличие небольшой примеси хлоридов в воде, реактивах и т. д.

Из методов с адсорбционным индикатором наибольшее распространение получили способы с применением дихлорфлюоресцеина (Франко, Клейн, 1951). Преимущество метода заключается в контрастном переходе окраски из зеленой в розовую при титровании азотнокислым серебром.

Недостатки: 1) при использовании адсорбционных индикаторов важным условием является величина рН; 2) для получения более точных результатов необходимо проводить титрование при минимальном освещении; 3) требуется точная концентрация индикатора, так как при его излишке раствор окрашивается в желтый цвет, что делает неясным изменение окраски.

Из группы ртутнометрических методов широко применяется метод О. Шэлса и С. Шэлса (1941), в котором в качестве индикатора используют спиртовой раствор дифенилкарбазона. Способ технически прост, точен, занимает мало времени, а потому наиболее удобен для клинико-диагностических лабораторий.

Очень точны и удобны электрохимические методы исследования хлора, однако они требуют специальной аппаратуры, что затрудняет их распространение в практике.

Методы, основанные на окислительно-восстановительных реакциях, микродиффузионный способ Конвея (1950), изотопные способы не применяются широко в практике.

В качестве унифицированного предложен меркуриметрический метод определения хлора в сыворотке крови, моче и спинномозговой жидкости с применением в качестве индикатора дифенилкарбазона.

#### Определение ионов хлора в сыворотке крови, моче и спинномозговой жидкости меркуриметрическим методом с индикатором дифенилкарбазоном

**Принцип.** Хлориды биологических жидкостей титруют нитратом ртути, используя в качестве индикатора дифенилкарбазон. В эквивалентной точке избыток нитрата ртути образует с индикатором комплекс, окрашенный в сине-лиловый цвет.

**Реактивы.** 1. Раствор азотнокислой ртути. 2,0 г азотнокислой ртути  $Hg(NO_3)_2 \cdot 2H_2O$  х. ч. растворяют в 200 мл дистиллированной воды, добавляют точно 20 мл 2 н  $HNO_3$  и разводят водой до 1 л. Реактив стойкий.

2. Раствор индикатора. 100 мг дифенилкарбазона растворяют в 100 мл 96° этанола. Хранят в темной склянке в течение месяца.

3. 2 н раствор азотной кислоты. Готовят из фиксанала или разбавлением 14 мл концентрированной  $HNO_3$  до 100 мл дистиллированной водой.

4. 0,01 н стандартный раствор хлора. 584,5 мг  $NaCl$  х. ч., высушенного до постоянного веса при температуре  $+120^\circ C$ , растворяют в небольшом количестве дистиллированной воды и доливают объем до 1 л. 1 мл этого раствора содержит 0,01 ммоль хлора.

**Ход определения.** В небольшой стаканчик помещают 1,8 мл дистиллированной воды, добавляют 0,2 мл исследуемой биологической

жидкости, 4 капли индикатора и титруют смесь азотнокислой ртутью из 2-миллилитровой пипетки (или лучше из микробюретки с делениями на 0,01 мл) до появления сине-фиолетового окрашивания (перемена окраски в конечной точке титрования отчетливо заметна).

Для стандартизации раствора азотнокислой ртути к 2 мл стандартного раствора хлористого натрия приливают 4 капли раствора индикатора и титруют раствором азотнокислой ртути так же, как опытную пробу.

$$\text{а ммоль хлора в 1 л} = \frac{0,02 \cdot \text{А} \cdot 5 \cdot 1000}{\text{Б}} = \frac{\text{А} \cdot 100}{\text{Б}},$$

где 0,02 — ммоль хлора в 2 мл стандартного раствора хлористого натрия;  $5 \cdot 1000$  — коэффициент пересчета на 1000 мл биологической жидкости; А — количество раствора азотнокислой ртути, пошедшее на титрование опытной пробы; Б — количество азотнокислой ртути, пошедшее на титрование стандартного раствора хлористого натрия (мл).

Для удобства в работе количество раствора азотнокислой ртути, необходимое для титрования опытной пробы (А), можно умножить на фактор Ф, который равен  $100/\text{Б}$ , так как количество раствора азотнокислой ртути, пошедшее на титрование стандартного раствора NaCl, является постоянной величиной в течение нескольких дней.

**Примечания:** 1. Раствор азотнокислой ртути готовят и из красной окиси ртути. Для этого 1,083 г красной окиси ртути растворяют в 11,0 мл концентрированной азотной кислоты и доливают водой до 1000 мл. Раствор стойкий.

2. Раствор индикатора должен иметь оранжево-красную окраску. Реактив нужно менять, если окраска становится желтой или вишнево-красной, так как в этом случае он не дает отчетливой конечной точки титрования.

3. Удаление белков усиливает изменение цвета в конечной точке титрования, но оно не является обязательным. При этом результаты определения на 1—2 ммоль/л превышают те, которые получаются с фильтратом сыворотки.

4. Если моча имеет щелочную реакцию ( $\text{pH} > 8$ ), необходимо ее подкислить разведенной азотной кислотой до слабо кислой реакции.

Содержание хлора (хлорид-ионов) в сыворотке крови практически здоровых людей в норме составляет 95—110 ммоль/л (337—390 мг/100 мл), в спинномозговой жидкости — 120—130 ммоль/л (425—460 мг/100 мл), в моче — 170—210 ммоль/л (600—740 мг/100 мл). В плазме и сыворотке крови грудных детей концентрация хлорид-ионов в норме равна 80—140 ммоль/л (290—500 мг/100 мл). Экскреция хлорид-ионов с мочой составляет у новорожденных 0,3—1,4 ммоль (10—50 мг), у детей в возрасте 1—2 мес — 1,0—3,0 ммоль (40—100 мг), 2—6 мес — 3,0—14,0 ммоль (100—500 мг), 6—12 мес — 3—30 ммоль (100—1000 мг), 1—2 года — 14—40 ммоль (500—1500 мг) за сутки.

Исследование в биологических жидкостях хлоридов титрометрическим методом с индикатором дифенилкарбазоном очень удобно производить с использованием набора реактивов фирмы «Лакхема» (ЧССР), рассчитанного на 1000 микроопределений хлор-ионов (см. прилагаемую к реактивам инструкцию).

В нашу страну поставляют также из ЧССР наборы реактивов для спектрофотометрического определения хлорид-ионов. Метод основывается на способности хлорид-ионов освобождать из хлорангидрохлоридной ртути хлорангидрохлоридную кислоту в количестве, пропорциональном содержанию ионов хлора в исследуемом образце. описа-

ние метода подробно изложено в прилагаемой к набору инструкции. Объем исследуемого материала варьирует в пределах от 0,025 до 0,05 мл. Нормативы те же.

### *Клинико-диагностическое значение определения хлорид-ионов в биологических жидкостях*

Относительная гиперхлоремия отмечается при обезвоживании, вызванном недостаточным поступлением жидкости (но не при дегидратации, обусловленной потерей жидкости при поносах и рвоте).

При заболеваниях почек (нефритах, нефрозах, нефросклерозах) наступает задержка хлоридов вследствие недостаточной депурационной способности почек. В целях снижения осмотического давления организм стремится увеличить количество внеклеточной жидкости (развиваются отеки), выделить большое количество соли вместе с потом, увеличить поступление хлоридов во внутриклеточное пространство, задержать их в костной системе, в коже и других тканях (сухая форма задержки). В случае, если компенсационные механизмы перестают справляться со своей задачей, наступает не относительная, а абсолютная гиперхлоремия.

Гиперхлоремия наблюдается также при приеме с пищей больших доз хлоридов, при гиперхлоремических ацидозах, респираторном алкалозе, декомпенсации сердца и т. д.

Гипохлоремия отмечается при формах обезвоживания, связанных с поносами, особенно рвотой. Любая продолжительная рвота, даже если она не вызывает обезвоживания, доводит до гипохлоремии. Особенно ярко выражено уменьшение содержания хлоридов при стенозе привратника. В этих случаях уровень хлоридов в сыворотке обычно падает до 300 мг/100 мл (85 ммоль/л).

При почечных заболеваниях (особенно почечном диабете) также возможно появление тяжелой гипохлоремии.

Любая значительная гипохлоремия может привести к компенсационному повышению остаточноазотных фракций (хлоропривная азотемия) из-за стремления организма сохранить постоянство осмотического давления.

Гипохлоремии вызывают также респираторный ацидоз, отеки и экссудаты (отечная задержка), пневмонии (сухая задержка), инфекционные заболевания (токсическая дифтерия, колиты), диабетический кетоз, водное отравление и другие патологические состояния.

Отравление сулемой влечет за собой переход хлоридов из крови в ткани, при этом развивается гипохлоремия, не связанная с обеднением организма хлором.

При бронхопневмонии гипохлоремия ярче всего выражена в кульминационной фазе заболевания. Во время кризиса количество хлоридов увеличивается и приходит к норме одновременно с выздоровлением.

### **НЕОРГАНИЧЕСКИЙ ФОСФОР**

Общий фосфор крови представлен кислоторастворимой и кислотонерастворимой фракциями. Первая образована неорганическим фосфором, пирофосфатами (АТФ, АДФ и другими), гексозофосфатами, глицерофосфатами и т. д. В состав минерального кислотоне-

растворимого фосфора входят фосфор фосфолипидов и нуклеопротеидов. При определении липидного и нуклеинового фосфора органический фосфор путем минерализации переводят в неорганический. Для исследования последнего предложены спектрофотометрические, колориметрические, пламеннотометрические, комплексометрические методы. Из них наибольшее распространение получили колориметрические методики, основанные на определении фосфора в виде синего фосфорномолибденового комплекса, получившего название молибденовой сини. Принцип метода заключается во взаимодействии фосфора с молибденовой кислотой с образованием фосфорномолибденовой кислоты, которая восстанавливается в присутствии избытка молибдата до синего фосфорномолибденового комплекса. Реакция, приводящая к появлению молибденовой сини, до сих пор еще окончательно не изучена.

В качестве восстановителей, необходимых для образования молибденовой сини, применяются гидрохинон, эйконоген (1-амино-2-нафтол-4-сульфоновая кислота), двухлористое олово, амидол (2,4-диаминофеполгидрохлорид), аскорбиновая кислота, тиомочевина.

В нашей стране чаще пользуются методами с употреблением в качестве восстанавливающих веществ гидрохинона, аскорбиновой кислоты и эйконогена, за рубежом — методами с использованием эйконогена и двухлористого олова.

Самый чувствительный — это способ с применением двухлористого олова. Недостатком указанного метода является неудобство работы с этим восстановителем из-за узких пределов допустимой кислотности. Кроме того, по сравнению с другими способами он более сложен, иногда наблюдается помутнение молибденовой сини.

Метод с использованием аскорбиновой кислоты в качестве восстановителя обладает большей точностью и чувствительностью. Недостаток его в том, что некоторые вещества (уксуснокислый, сернокислый Na, хлористый Na, соли мышьяка и другие) в определенных концентрациях могут инактивировать аскорбиновую кислоту, менять кислотность среды и мешать образованию фосфорномолибденового комплекса. Кроме того, при отклонении от хода выполнения методики аскорбиновая кислота восстанавливает молибденовую и в отсутствие фосфора.

Из методов, базирующихся на применении в качестве восстанавливающего вещества эйконогена, обращает на себя внимание способ Фишке, Субарова (1925) и его модификация. Этот метод точный, его можно использовать для установления концентрации фосфора, варьирующей в широких пределах; окраска возникает быстро и держится долго. Он наиболее приемлем для определения неорганического фосфора в сыворотке крови.

Метод с гидрохиноном несколько уступает предыдущему в отношении точности, а также стабильности реактива (гидрохинон быстро разлагается, в связи с чем реактив нужно готовить перед употреблением).

Распространен также отличающийся высокой чувствительностью метод, основанный на образовании окрашенного комплекса неорганического фосфата с катионной формой малахитового зеленого в присутствии молибдата аммония.

В качестве унифицированного рекомендован колориметрический метод определения неорганического фосфора с восстанавливающим веществом эйконогеном.

**Определение неорганического фосфора  
в сыворотке крови и моче по восстановлению  
фосфорномолибденовой кислоты**

**Принцип.** После осаждения белков в центрифугате остается неорганический фосфор, который при взаимодействии с молибденовой кислотой образует фосфорномолибденовую кислоту. Последняя восстанавливается эйконогеном до синего фосфорномолибденового комплекса. Интенсивность окраски прямо пропорциональна концентрации неорганического фосфора в биологическом субстрате.

**Реактивы.** 1. Раствор трихлоруксусной кислоты — 10 г/100 мл.

2. Раствор молибденовокислого аммония. 5 г молибденовокислого аммония доводят до 100 мл 5 н раствором серной кислоты при постоянном помешивании содержимого склянки до полного растворения.

3. 5 н  $H_2SO_4$ . Готовят добавлением к 860 мл дистиллированной воды 140 мл концентрированной  $H_2SO_4$ ,  $\rho$  1,84 кг/л.

4. Раствор аминафтолсульфоновой кислоты (эйконогена). 6 г кислого сернистокислого натрия (гидросульфита натрия) или метабисульфита натрия ( $Na_2S_2O_5$ ) растворяют полностью в 20—25 мл воды, после чего в раствор добавляют 0,1 г эйконогена. Эйконоген переходит в водную фазу медленно, при помешивании стеклянной палочкой. Отдельно в небольшом количестве воды растворяют 1,2 г безводного сернистокислого натрия (сульфита натрия). Оба раствора смешивают и объем доводят до 50 мл дистиллированной водой. Через 2—3 ч реактив фильтруют. Хранят в холодильнике в посуде из темного стекла.

5. Основной стандартный раствор однозамещенного фосфорнокислого калия, высушенного до постоянного веса при  $+120^\circ C$ . 0,4389 г  $KH_2PO_4$  растворяют в дистиллированной воде в мерной колбе на 100 мл. 1 мл этого раствора содержит 1 мг фосфора.

Из основного готовят рабочий раствор с содержанием 0,02 мг фосфора в 1 мл. Для этого 2 мл основного стандартного раствора фосфора доводят дистиллированной водой в мерной колбе до 100 мл.

**Ход определения.** 1 мл сыворотки смешивают с 4 мл дистиллированной воды и 5 мл трихлоруксусной кислоты. Через 10 мин пробу центрифугируют. К 5 мл центрифугата приливают 1 мл молибденовокислого аммония, 0,2 мл раствора эйконогена и 1,8 мл дистиллированной воды. Через 20 мин стояния при комнатной температуре пробу колориметрируют на ФЭКе с красным светофильтром (длина волн — 660—680 нм) в кювете с шириной слоя 10 мм. Результаты сравнивают с данными контрольной пробы.

Контрольную пробу ставят так же, как опытную, но вместо центрифугата берут 2,5 мл трихлоруксусной кислоты и 2,5 мл дистиллированной воды.

Расчет производят по калибровочной кривой. Из рабочего стандартного раствора готовят разведения (табл. 44).

После 20-минутного стояния пробы колориметрируют так же, как опытные. Результаты сравнивают с данными контрольной пробы на реактивы.

**Примечания:** 1. При отсутствии эйконогена можно использовать раствор аскорбиновой кислоты (1 г/100 мл), приготовленный перед работой ии 0,1 н растворе соляной кислоты.

2. При определении неорганического фосфора в моче ее разводят в 10 раз и дальнейшую обработку разведенной мочи осуществляют аналогично сыворотке.

Нормальное содержание неорганического фосфора в сыворотке крови взрослого человека составляет 0,81—1,45 ммоль/л (2,5—4,5 мг/100 мл), в моче — 0,8—1,5 г/сут (25,8—48,4 ммоль/сут). У новорожденных концентрация неорганического фосфора в сыворотке крови равна 1,13—2,78 ммоль/л (3,5—8,6 мг/100 мл), у детей дошкольного возраста — 1,45—2,10 ммоль/л (4,5—6,5 мг/100 мл), у детей школьного возраста — 1,45—1,78 ммоль/л (4,5—5,5 мг/100 мл).

Летом содержание фосфора несколько больше, чем зимой.

В настоящее время в нашу страну поставляют наборы реактивов (фирма «Лаксма», ЧССР), позволяющие определять по интенсивности образования молибденованадатофосфорной кислоты содержание как неорганического, так и липидного (после минерализации сгустка крови) фосфора (см. прилагаемую к наборам инструкцию).

Табл. 44. Данные для построения калибровочной кривой

№ пробирок	Рабочий стандартный раствор (мл)	Раствор трихлоруксусной кислоты (мл)	Раствор молибденово-кислого аммония (мл)	Раствор эйконогена (мл)	Дистиллированная вода (мл)	Содержание фосфора в пробе		
						мг	мг/100 мл, ммоль/л	
1	0,5	2,5	1,0	0,2	3,8	0,01	2	0,65
2	1,0	2,5	1,0	0,2	3,3	0,02	4	1,29
3	1,5	2,5	1,0	0,2	2,8	0,03	6	1,94
4	2,0	2,5	1,0	0,2	2,3	0,04	8	2,58
5	2,5	2,5	1,0	0,2	1,8	0,05	10	3,23

*Клинико-диагностическое значение определения неорганического фосфора в сыворотке крови и моче*

Уровень фосфора зависит: 1) от функции паращитовидных желез, 2) щитовидных желез, 3) регулирующего действия витамина D, 4) функции почек.

Гиперфосфатемия встречается при почечной недостаточности, гипопаратиреоидизме, акромегалии, диабете, кетозе, приеме больших доз витамина D, ультрафиолетовом облучении, в некоторых случаях при аддисоновой болезни, спазмофилии, болезни Иценко — Кушинга. Гиперфосфатемия при нефритах и нефрозах (3,23—6,46 ммоль/л) является одним из неблагоприятных прогностических признаков. Эти заболевания часто сопровождаются понижением резервной щелочности. Увеличение содержания фосфатов в крови наблюдается при токсикозах беременности. Гиперфосфатемия свойственна периоду заживления костных переломов (это благоприятный признак). Мышечная работа сопровождается повышением содержа-

ния неорганических фосфатов в результате расщепления органических фосфорных соединений (АТФ).

Гипофосфатемия в детском возрасте часто бывает при рахите. Очень важно, что снижение уровня неорганического фосфора в сыворотке крови отмечается в ранней стадии рахита (0,19—0,97 ммоль/л), когда клинические симптомы еще недостаточно выражены. Гипофосфатемия при рахите может перейти в гиперфосфатемию, что нередко сопровождается явлениями спазмофилии. Снижение содержания фосфатов в крови наблюдается при остеомаляции, пеллагре, длительном лечении инсулином и хлористым кальцием. Гипофосфатемия нередко наблюдается у новорожденных, при гиперпаратиреонизме, гиперипсулизме, микседеме. Гипофосфатемия может быть и алиментарного происхождения — вследствие потребления бедной фосфатами пищи и нарушения всасывания фосфатов в кишечнике.

Для диагностики различных патологических состояний важное значение имеет установление количественного соотношения между содержанием кальция и неорганического фосфора в крови. При рахите количество выделяемого с мочой фосфора увеличивается в 2—10 раз по сравнению с нормой. Повышение выделения фосфатов с мочой отмечается при распаде клеток (например, при лейкозах, гипертиреозе, диабете, менингите).

Снижение выделения фосфатов с мочой можно наблюдать при туберкулезе, лихорадочных состояниях, острой желтой атрофии печени, недостаточной функции почек, акромегалии.

### МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЖЕЛЕЗА И ЖЕЛЕЗОСВЯЗЫВАЮЩЕЙ СПОСОБНОСТИ СЫВОРОТКИ КРОВИ

Первым реактивом, примененным в 1927 г. для исследования железа в сыворотке крови, был роданит калия. Метод, основанный на его использовании, оказался очень несовершенным: интенсивность окраски комплексного соединения железа с роданитом уменьшалась уже через 15 мин, а само окрашивание во многом зависело от примесей (например, фосфатов). В дальнейшем для определения железа был применен ортофенаントролин. Этот органический реагент дает с железом комплекс, который сохраняется в растворе несколько месяцев.

В 1951 г. Казе предложил новый реактив на железо — батофенаントролин, по чувствительности в 2 раза превышающий ортофенаントролин.

Известен ряд методов с использованием батофенантиролина в качестве комплексообразователя. Они отличаются друг от друга приготовлением батофенантиролинового реактива, способами выделения железа из белкового комплекса, доведением необходимой для цветной реакции концентрации водородных ионов, а также методами восстановления железа.

Для выделения железа из связанного состояния часто рекомендуют 0,3 н или 2 н соляную кислоту. Однако она разбавляет раствор, снижая концентрацию железа и, следовательно, уменьшает точность способа. Прогревание смеси сыворотки с трихлоруксусной кислотой до +95 °С приводит к полному отделению железа от



трансферрина, поэтому предварительное добавление соляной кислоты излишне.

Необходимую концентрацию водородных ионов (рН 4,8—5,0) создают, как правило, ацетатом аммония или ацетатом натрия. В качестве восстановителя могут быть использованы гидроксилламин, тиогликолевая кислота, гидрохинон, гидразин. Генри с соавт., стремясь к уменьшению объемов смеси, применяют насыщенный раствор сульфата гидразина, характеризующийся стойкостью.

Батофенантролин нерастворим в воде. Поэтому его либо растворяют в алкоголе, либо используют сульфонированное производное, способное растворяться в воде. Триггер (1956), применив в своей работе сульфонированное соединение батофенантролина, показал, что молярный коэффициент погашения этого комплекса выше молярного коэффициента комплекса железа с нессульфонированным батофенантролином. По методу Генри с соавт., сульфонирование батофенантролина производят при помощи хлорсульфановой кислоты.

Известны также динитридилловые и тринитридилловые способы определения железа. Однако по своей чувствительности они не превосходят орто- и батофенантролиновые.

В 1979 г. Гарчик (ЧССР) описал простой высокочувствительный метод исследования железа и железосвязывающей способности сыворотки крови, основанный на свойстве ионов железа реагировать с хромазулом В и цетилтриметиламмонийбромидом; при этом образуется тройной окрашенный комплекс. Его максимальная абсорбция наблюдается при 630 нм. Интерференция с другими компонентами сыворотки отсутствует.

Атомная абсорбционная спектрофотометрия дает ненадежные результаты из-за нередко возникающей интерференции веществ.

Весьма чувствительные, специфичные радионуклидный и иммунологический методы определения железа и железосвязывающей способности сыворотки крови редко применяются в клинико-биохимических лабораториях, так как требуют специальной аппаратуры, дефицитных реактивов и длительного времени для выполнения исследований.

В лабораторной практике более широко используются фотометрические способы исследования. Один из них, базирующийся на реакции с батофенантролином, и предложен в качестве унифицированного для установления содержания железа в сыворотке крови.

Фирма «Лаксма» (ЧССР) выпускает наборы реактивов, с помощью которых становится возможным исследование содержания сывороточного железа.

### **Батофенантролиновый метод определения железа сыворотки крови**

**Принцип.** Определение сывороточного железа основано на его освобождении из белкового комплекса и проведении последующей реакции с батофенантролином.

**Реактивы.** 1. Раствор трихлоруксусной кислоты — 20 г/100 мл.  
2. Раствор уксуснокислого аммония — 70 г/100 мл. К 70 г ацетата аммония добавляют 30 мл воды.

3. Насыщенный раствор сульфата гидразина. Для его пригото-

ления 2,5 г соли растворяют в 100 мл воды. Хранят при комнатной температуре в посуде из темного стекла.

4. Раствор батофенагролина (4,7-дифенил-1,10-фенантролин). 100 мг батофенагролина помещают в пробирку, в которую прибавляют 0,5 мл хлорсульфоновой кислоты. Смесь кипятят 30 с, охлаждают и медленно приливают 10 мл дважды дистиллированной воды. После 20-минутного прогрева в кипящей водяной бане смесь переносят в 200-миллилитровую колбу, в которую доливают 100 мл воды, pH раствора доводят до 4,0 раствором едкого натра с концентрацией 20 г/100 мл и добавляют бидистиллированной воды до объема мерной колбы (200 мл).

5. Стандартный раствор с содержанием 100 мкг железа в 1 мл (1,8 ммоль/л). Готовят из соли Мора  $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ . 0,7032 г соли растворяют в 5 мл 0,3 н раствора HCl, после чего доводят объем до 1 л бидистиллированной водой, подкисленной 1 мл концентрированной, взятой из фиксанола  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . Рабочий стандартный раствор железа получают разведением основного в 50 раз подкисленной водой. Он содержит 2 мкг/мл железа (35,8 ммоль/л).

Ход определения. В пробирку вносят 2 мл сыворотки, 2,5 мл бидистиллированной воды и 1,5 мл раствора трихлоруксусной кислоты, свободной от примеси железа. После перемешивания содержимое пробирки помещают на 15 мин в водяную баню при температуре +90—95 °С. Смесь центрифугируют при 2000 об/мин в течение 20 мин и отделяют 4 мл верхнего слоя, к нему прибавляют 0,35 мл раствора ацетата аммония и 0,3 мл насыщенного раствора сульфата гидразина. Экстинкцию измеряют на ФЭКе с зеленым светофильтром (при длине волн 500—560 нм) или на спектрофотометре (при длине волн 535 нм) в кювете с толщиной слоя 10 мм. Затем в пробирку приливают 0,4 мл раствора батофенагролина. Повторную фотометрию проводят через 40 мин. В случаях, если не удастся отобрать 4 мл надосадочной жидкости, к полученному количеству центрифугата добавляют необходимый (для доведения до 4 мл) объем бидистиллированной воды.

Параллельно ставят контрольную пробу. Смешивают 1 мл трихлоруксусной кислоты, 3 мл воды, доливают 0,35 мл раствора уксуснокислого аммония, 0,3 мл насыщенного раствора сернокислого гидразина. Экстинкцию измеряют в условиях фотометрирования опытных проб. Через 40 мин к контрольной пробе так же, как и к опытной, добавляют 0,4 мл раствора батофенагролина и повторно измеряют экстинкцию.

Стандартную пробу проводят следующим образом. К 2 мл рабочего стандартного раствора (с концентрацией железа 2 мкг/мл и общим его содержанием во взятом объеме 4 мкг) доливают 1 мл бидистиллированной воды, 1 мл раствора трихлоруксусной кислоты, 0,35 мл раствора уксуснокислого аммония, 0,3 мл насыщенного раствора сернокислого гидразина. Далее стандартную пробу обрабатывают и измеряют так же, как опытную.

Из результатов отчета, полученного после прибавления батофенагролина, вычитают результаты исследования до прилипания этого реактива. Расчет производят по формуле:

$$(A_{\text{оп.}} - A_{\text{к.}}) / (A_{\text{ст.}} - A_{\text{к.}}) \cdot 300 = a \text{ мкг/100 мл (1)},$$

где  $A_{\text{оп.}}$  — разность между окончательным и предварительным отсчетом в проводимом исследовании;  $A_{\text{ст.}}$  — то же самое для стан-

дартного раствора;  $A_k$  — то же самое для контрольной пробы; 300 — коэффициент пересчета на 100 мл сыворотки  $(4 \cdot 100)/1,33$ ; 4 — количество мкг железа в стандартной пробе; 1,33 — фактический объем (мл) исследуемой сыворотки; 100 — коэффициент пересчета на 100 мл сыворотки крови.

Если после центрифугирования не удастся получить 4 мл надосадочной жидкости, имеющееся количество доводят бидистиллированной водой до 4 мл. В этих случаях вместо коэффициента 300 используют другой коэффициент расчета:

$$K = 300 + 50(4,0 - V),$$

где  $K$  — коэффициент расчета;  $V$  — количество мл центрифугата, взятое для реакции.

Общая формула расчета следующая:

$$\frac{A_{\text{оп.}} - A_k}{A_{\text{ст.}} - A_k} \cdot 300 + (4,0 - V) \cdot 50 \quad (2).$$

Прямолинейная зависимость между оптической плотностью и концентрацией железа сохраняется до концентрации раствора 179 мкмоль/л (1000 мкг/100 мл).

В соответствии с требованиями системы СИ значения концентрации железа сыворотки крови следует выражать в размерности мкмоль/л. Для этого показатель содержания железа в мкг/100 мл следует умножить на коэффициент 0,179 или же при пользовании формулой (1) вместо коэффициента 300 применять коэффициент 53,7:

$$\frac{A_{\text{оп.}} - A_k}{A_{\text{ст.}} - A_k} \cdot 53,7 = a \text{ мкмоль/л.}$$

В норме содержание железа сыворотки колеблется от 12,5 до 30,4 мкмоль/л (70—170 мкг/100 мл). В среднем оно равно  $22,7 \pm 1,3$  мкмоль/л. У женщин содержание железа сыворотки несколько ниже, чем у мужчин.

**Примечания:** 1. Железо нужно исследовать лишь в сыворотке, не содержащей следов гемолита.

2. Кровь следует брать в специальную пробирку, обработанную паром или тщательно вымытую (сначала хромовой смесью либо азотной кислотой, затем бидистиллированной водой), высушенную и прикрытую фольгой.

3. Посуду промывают 5 и раствором HCl и ополаскивают бидистиллированной водой.

4. Больной, у которого берут кровь, не должен принимать препаратов железа по крайней мере 5 дней (!). В противном случае могут быть завышенные результаты.

5. Не следует забывать о необходимости употреблять в раствор только дважды дистиллированную воду.

В педиатрической практике может быть использована модификация батофенагроинового метода, предложенная К. Р. Джуманиязовой и П. А. Гафаровой (1980). Метод позволяет определить концентрацию железа в 0,3 мл сыворотки крови.

Реактивы те же, что и в предыдущем методе.

**Ход определения.** Для проведения опытной пробы в центрифужную пробирку вносят 0,3 мл сыворотки, 0,4 мл бидистиллированной воды и 0,5 мл раствора трихлоруксусной кислоты, содержимое пробирки перемешивают и помещают на 15 мин в водяную баню при температуре  $+95^\circ\text{C}$ . Охлаждают и центрифугируют 20 мин при

2000 об/мин. Отделяют в центрифужную пробирку 0,6 мл центрифугата.

Контрольную пробу ставят следующим образом. В центрифужной пробирке смешивают 0,35 мл бидистиллированной воды и 0,25 мл раствора трихлоруксусной кислоты.

Для подготовки стандартной пробы в центрифужную пробирку помещают 0,15 мл рабочего стандартного реактива с содержанием железа 2 мкг/мл (35,8 мкмоль/л), 0,2 мл бидистиллированной воды и 0,25 мл раствора трихлоруксусной кислоты. Затем во все пробы доливают по 0,1 мл раствора уксуснокислого аммония, по 0,1 мл насыщенного раствора сернистого гидразина и по 0,1 мл раствора батофенантролина. Содержимое каждой пробирки перемешивают и оставляют в темном месте на 40 мин, колориметрируют на ФЭКе с зеленым фильтром (длина волны 500—560 нм) в кювете с толщиной слоя 3 мм. Компенсационной жидкостью служит дистиллированная вода.

Содержание железа в опытной пробе:

$$\frac{E_{\text{оп.}} - E_{\text{к.}}}{E_{\text{ст.}} - E_{\text{к.}}} \cdot 35,8 = a \text{ мкмоль/л,}$$

где 35,8 — показатель концентрации железа в рабочем стандартном растворе (мкмоль/л).

Концентрация сывороточного железа у практически здоровых взрослых людей составляет в среднем 17,9 (14,3—21,5) мкмоль/л.

#### Определение общей и ненасыщенной железосвязывающей способности сыворотки (ОЖСС, НЖСС) крови

Находящееся в плазме железо связано с особым белком  $\beta_1$ -глобулиновой фракции трансферрином. В норме этот белок насыщен железом лишь на 30 %. Максимальное количество железа, которое может присоединять трансферрин до своего насыщения, обозначают как *общую железосвязывающую способность сыворотки крови*. Она дает представление о содержании трансферрина в организме. Очевидно, ОЖСС складывается из насыщенной железом части трансферрина (содержание сывороточного железа) и ненасыщенной — НЖСС. Отношение связанного в трансферрине железа к общему представляет собой коэффициент насыщения трансферрина. Определение сывороточного железа, ОЖСС, НЖСС и коэффициента насыщения трансферрина помогает оценить функциональное состояние больного.

Все указанные показатели могут быть найдены при параллельном исследовании содержания сывороточного железа и трансферрина по приводимой методике.

**Реактивы.** 1. Исходный раствор соли Мора с содержанием 100 мкг железа в 1 мл готовят следующим образом. 0,7032 г соли Мора растворяют в 1 л бидистиллированной воды, подкисленной 1 мл фиксанальной серной кислоты. 1 мл основного раствора включает 100 мкг железа.

2. Раствор соли Мора с содержанием 5 мкг железа в 1 мл. В колбу на 100 мл вносят 5 мл исходного раствора соли Мора и объем доводят 0,005 н раствором HCl до метки (или приливают 95 мл 0,005 н раствора HCl).

3. 0,005 н НСІ. К 5 мл 0,1 н раствора НСІ добавляют 95 мл бидистиллированной воды.

4. Порошок  $MgCO_3$  (вносят по 100 мг в пробу).

**Ход определения.** В пробирку помещают 1 мл сыворотки крови и 2 мл рабочего раствора соли Мора. Содержимое ее тщательно перемешивают и через 3 мин добавляют 100 мг  $MgCO_3$  (для адсорбции несвязавшегося железа). Полученную взвесь в течение 1 ч встряхивают в шуттель-аппарате. Пробу центрифугируют 5 мин при 3000 об/мин. Центрифугат сливают в чистую пробирку и в 2 мл его исследуют железо по унифицированной методике.

**Примечание.** Фирма «Лаксма» (ЧССР) поставляет в нашу страну наборы реактивов для определения как сывороточного железа, так и общей связывающей способности сыворотки крови. После насыщения сыворотки ионами железа и удаления их избытка (что достигается применением находящихся в наборе реактивов) общее содержание железа в сыворотке крови устанавливают с помощью набора.

Следует, однако, пользуясь коэффициентом пересчета 0,179, переводить получаемые согласно инструкции значения (мкг/100 мл) в показатели требуемой размерности (мкмоль/л).

По данным ряда авторов, содержание сывороточного железа в норме составляет 14,3—21,5 мкмоль/л (80—120 мкг/100 мл), свободного трансферрина (НЖСС) — 26,9—41,2 мкмоль/л (150—230 мкг/100 мл), общего трансферрина (ОЖСС) — 54—72 мкмоль/л (300—400 мкг/100 мл).

#### *Клинико-диагностическое значение определения железа и железосвязывающей способности сыворотки крови*

Содержание железа сыворотки значительно снижается при железодефицитной анемии, независимо от причины, ее вызывающей. ОЖСС либо нормальна, либо несколько выше нормы (за счет компенсаторно повышенного синтеза трансферрина и некоторого удлинения продолжительности жизни этого белка). НЖСС сыворотки резко увеличена. Процент насыщения железом трансферрина уменьшается.

Снижение содержания железа сыворотки наблюдается также при анемиях, связанных с воспалением, гнойной септической инфекцией и интоксикацией, с остеомелитом, ревматизмом, ревматоидным полиартритом. Однако в перечисленных случаях уровень сывороточного железа падает менее значительно, составляя 40—60 % от нормы. ОЖСС нормальна, в тяжелых случаях несколько снижена. НЖСС, как правило, увеличивается. В связи с указанными изменениями общей и ненасыщенной железосвязывающей способности сыворотки процент насыщения железом трансферрина часто снижен.

При анемии Аддисона — Бирмера, большинстве гемолитических анемий содержание железа сыворотки нормально или несколько выше нормы. Исключение составляет гемолитическая анемия Маркиава — Микели, при которой уровень железа сыворотки понижен. При данном заболевании из-за усиленного внутрисосудистого гемолиза имеется постоянное выведение железа с мочой.

Содержание железа в плазме (сыворотке) крови уменьшено при ахиллесской анемии, уремии, карциноматозе, гнойном и септическом заболевании, а также инфаркте миокарда.

Высокое содержание железа сыворотки имеет место либо при недостаточном использовании железа, либо при его повышенном поступлении в организм. Последнее отмечается при первичном гемохроматозе, когда из-за наследственного нарушения механизма, ограничивающего всасывание железа в желудочно-кишечном тракте, в организм поступает огромное количество железа. Поэтому при гемохроматозе содержание железа в сыворотке оказывается резко увеличенным. ОЖСС несколько снижена. ИЖСС часто почти не выявляется. Процент насыщения велик — обычно составляет 85 %.

Недостаточное использование железа для образования ферритина наблюдается при заболеваниях печени (хронических гепатитах, циррозах), при которых, как правило, повышено содержание сывороточного железа.

Высокое содержание железа в сыворотке отмечается при так называемых сидероахрестических анемиях: в этих случаях поступающее в костный мозг железо не используется в должной мере для эритропоэза.

Недостаточное расходование железа чаще всего связано с ферментативными нарушениями синтеза гема (наследственная сидероахрестическая анемия, рефрактерная сидеробластная приобретенная анемия, вызванная свинцовой интоксикацией).

Высокий уровень сывороточного железа бывает также при талассемиях, повышение его — при всех формах желтух. Концентрацию сывороточного железа следует проверять во всех случаях гипохромных анемий для дифференциации железодефицитных анемий от сидероахрестических, которые протекают так же, как и железодефицитные — с гипохромией.

Содержание железа является также важным показателем для суждения о динамике лечения больных железодефицитной анемией.

## МЕДЬ И ЦЕРУЛОПЛАЗМИН

Микроэлемент медь встречается как в эритроцитах, так и в плазме крови. В последней около 90 % меди входит в состав церулоплазмينا (Cu-альфа<sub>2</sub>-глобулинового комплекса), незначительная же часть меди находится в свободном состоянии. Медь играет важную биологическую роль, так как она является составной частью ряда ферментов, участвуя в обмене витаминов, гормонов, белков (в том числе и гемоглобина), углеводов, а также в некоторых иммунных процессах.

Определение меди в сыворотке крови методом Шмидта в модификации А. Г. Рахманкулова и И. А. Коптевой

**Принцип.** Содержание меди в сыворотке крови устанавливают по интенсивности желтой окраски, развивающейся при взаимодействии меди с комплексообразователем — диэтилдитиокарбаматом натрия.

- Реактивы.** 1. Раствор трихлоруксусной кислоты — 20 г/100 мл.  
2. Раствор пиррофосфата натрия ( $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ ) — 4 г/100 мл.  
3. Концентрированный раствор  $\text{NH}_4\text{OH}$  — 25 г/100 мл.  
4. Раствор диэтилдитиокарбамата натрия — 1 г/100 мл.

1 г диэтилдитиокарбамата вносят в мерную колбу емкостью 100 мл, в которую затем добавляют дистиллированную воду до мет-

ки (комплексобразователь растворяется плохо). Раствор фильтруют, переливают в темную бутылку и хранят в холодильнике не более месяца.

**Ход определения.** К 2 мл сыворотки доливают 5 мл дважды дистиллированной воды, 3 мл раствора трихлоруксусной кислоты, все перемешивают и через 10 мин центрифугируют в течение 30 мин при 4000—5000 об/мин до получения прозрачного центрифугата. Отсасывают 5 мл надосадочной жидкости и добавляют к ней 1 мл раствора пиродифосфата натрия, 0,5 мл концентрированного раствора аммиака, 1 мл раствора диэтилдитиокарбамата и содержимое колбы встряхивают в течение 15—20 с. Окрашенный в желтый цвет раствор колориметрируют на ФЭКе с синим светофильтром в кювете с толщиной слоя 20 мм. Параллельно ставят одну на всю серию опытных проб контрольную пробу, в которой вместо 2 мл сыворотки используют 2 мл воды.

Расчет производят по формуле или по калибровочной кривой. Для получения данных к построению графика 0,3928 г кристаллической сернокислой меди ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ ) растворяют в 1 л бидистиллированной воды. 1 мл такого раствора содержит 100 мкг меди. Из этого основного готовят рабочий раствор (разбавлением водой 1 : 100) для расчета данных по формуле или серию разведений (в 125—50 раз) для построения калибровочной кривой. Содержание меди в полученных растворах колеблется в пределах от 0,8 до 2,0 мкг/мл (12,6—31,5 мкмоль/л).

Норма у женщин — 13,4—24,4 мкмоль/л (85—155 мкг/100 мл), у мужчин — 11,0—22,0 мкмоль/л (70—140 мкг/100 мл), у поворожденных — 3,1—9,4 мкмоль/л (20—60 мкг/100 мл).

К исходу первого месяца жизни показатели содержания сывороточной меди не отличаются от таковых у взрослых.

**Примечание.** Фирма «Лаксма» (ЧССР) поставляет в нашу страну наборы реактивов для определения меди в сыворотке крови фотометрическим способом, основанным на реакции образования оранжевого комплекса при взаимодействии меди с одним из производных фенантролина.

### **Определение активности церулоплазмينا в сыворотке крови модифицированным методом Ревина (С. В. Бестужева, В. Г. Колб)**

**Принцип метода** базируется на окислении р-фенилендиамина при участии церулоплазмينا. Ферментативную реакцию останавливают добавлением фтористого натрия. По оптической плотности образующихся продуктов судят о концентрации церулоплазмينا.

**Реактивы.** 1. Водный раствор солянокислого р-фенилендиамина. Готовят из препарата, имеющегося в продаже. Хранят в холодильнике в склянке из темного стекла — 0,5 г/100 мл.

2. 0,4 моль/л ацетатного буфера, рН 5,5. Получают из двух исходных растворов («а» и «б»):

а) 54,44 г ацетата натрия растворяют в 1 л дистиллированной воды;

б) 22,6 мл ледяной уксусной кислоты доводят дистиллированной водой до 1 л.

Описанные растворы смешивают в отношении 9 : 1. Буфер рекомендуется готовить в большом количестве, например, в объеме 1 л,



добавленном к 900 мл раствора «а» 100 мл раствора «б». Буферный раствор держат в холодильнике.

3. Раствор фтористого натрия — 3 г/100 мл. Препарат, имеющийся в продаже, растворяют в дистиллированной воде, осадок отфильтровывают. Нужен в небольшом количестве.

**Ход определения.** В обычные химические пробирки вносят по 0,1 мл сыворотки (без следов гемолиза). В одну из пробирок, служащую контрольной (она может содержать любую другую сыворотку), добавляют 2 мл раствора фтористого натрия (с целью инактивации ферментативной активности церулоплазмينا). Затем во все пробирки помещают по 8 мл ацетатного буфера и по 1 мл раствора р-фенилэндиамина (используемого в качестве субстрата). Пробирки встряхивают и ставят на 1 ч в водяную баню с температурой +37 °С. После инкубации во все пробирки, за исключением контрольной, доливают по 2 мл раствора фтористого натрия. Содержимое пробирок перемешивают и переносят в холодильник, где выдерживают в течение 30 мин при +4 °С. Пробы колориметрируют на ФЭКе с зеленым светофильтром (530 нм) в кюветах с шириной слоя 10 мм. Результаты сравнивают с данными контрольной пробы (бледно-розовая окраска).

Умножая значения оптической плотности на коэффициент пересчета 875, получают величину концентрации церулоплазмينا в мг/л.

Норма — 300—380 мг/л.

**Примечание.** Сыворотку можно хранить в холодильнике в течение нескольких дней без изменения активности церулоплазмينا.

### *Клинико-диагностическое значение определения меди и церулоплазмينا в сыворотке крови*

Резкое нарушение обмена меди наблюдается при анемиях, когда значительно повышается ее содержание в крови при уменьшении количества депонированной меди в печеночной ткани. Во время лечения гипохромной анемии у детей, а также анемии от кровопотерь и хронической анемии у женщин медь в сочетании с кобальтом является ценным лечебным препаратом. В ряде случаев возникновение и развитие анемии связано с недостатком меди в продуктах питания. При этом обычно отмечают весьма заметное обеднение медью печени и увеличение концентрации меди в крови.

Педиатрам хорошо известна физиологическая анемия детей на первом году их жизни, зависящая от одностороннего молочного вскармливания. В этом периоде у детей снижается уровень гемоглобина, падает количество эритроцитов, уменьшается цветной показатель. Позднее, когда ребенок начинает получать более разнообразную пищу с достаточным содержанием железа и меди, явления гипохромной анемии обычно проходят. Алиментарная анемия, вызванная недостатком меди и железа в диете, может встречаться у детей и в более позднем возрасте.

Показано, что при функциональных маточных кровотечениях последние прекращаются, как правило, с момента насыщения организма медью.

Гиперкупремия и гиперцерулоплазминемия бывают у лиц, страдающих пернициозной анемией, в остром периоде инфекций, протек-

кающих с лихорадкой и распадом клеточных элементов, при заболеваниях печени: гепатитах, циррозах и механических (но не парасхиматозных) желтухах, экссудатах, у больных с лейкозами, ревматизмом, инфекционным неспецифическим полиартритом, пневмонией, острой дизентерией, злокачественными опухолями, туберкулезом, а также у беременных женщин. Отмечено 2—3-кратное повышение в крови церулоплазмينا у больных сифилисом нервной системы. Изменение метаболизма меди выявлено и при других заболеваниях центральной нервной системы. Наиболее яркой иллюстрацией причастности меди к патологии нервной системы может служить болезнь Вильсона — гепатолентикулярная дегенерация. Заметно возрастает содержание меди в печени, головном мозге, а также ее выведение с мочой. Одновременно в плазме крови уменьшается общее содержание меди, и особенно церулоплазмينا. Многие авторы болезнь Вильсона объясняют нарушением обмена меди, а падение уровня церулоплазмينا в крови связывают с врожденной недостаточностью синтеза этого металлопротеида в печени. Всасывание меди при этом заболевании увеличено, и медь в токсичной форме наводит ткани. Избыток ионов меди становится этиопатогенетическим фактором заболевания.

При шизофрении также обнаружено нарушение обмена меди, связанное с накоплением ее в некоторых тканях.

Гипоцерулоплазминемия имеет место не только при болезни Вильсона, но и при нефротическом синдроме, а также у новорожденных.

## Глава XII

### ИССЛЕДОВАНИЕ

### ГОРМОНАЛЬНО-МЕДИАТОРНОГО ОБМЕНА

Изучение метаболизма гормонов и медиаторов имеет большое значение для диагностики эндокринных расстройств, а также оценки функционального состояния организма при многих других формах патологии, связанных с поражением центральной, вегетативной нервной системы, сердца, печени, почек и других паренхиматозных органов.

Любое нарушение в системе гипоталамус — гипофиз — кора надпочечников неизбежно сказывается в изменении продукции гормонов надпочечниковой железой.

### ГОРМОНЫ НАДПОЧЕЧНИКОВ

Надпочечники представляют собой парные эндокринные железы, расположенные у верхних полюсов почек. Их вес у человека составляет 6—12 г. Каждая надпочечная железа имеет два слоя — внутренний, мозговой, возникающий из симпатического ганглия и в онтогенетическом отношении представляющий часть симпатической нервной системы, и наружный, корковый, образующийся из мезодермальной ткани, из которой развивается также закладка гонад. Этим и объясняется химическое сродство гормонов коры надпочечников с половыми гормонами. Таким образом, надпочечник — это соедине-

ние двух самостоятельных эндокринных желез, гормоны которых по химическому строению и действию резко отличаются друг от друга.

На корковый слой надпочечников приходится более половины ( $\frac{2}{3}$ ) веса железы. Вырабатываемые ею гормоны обеспечивают нормальный ход процессов углеводного, жирового, белкового обмена, равновесие электролитов в организме и половую функцию. Они также участвуют в регуляции деятельности почек, кровяного давления, функции центральной нервной системы, реакции организма на «стресс» (вызванной, например, травмой, инфекцией, колебаниями температуры), в формировании воспалительной реакции тканей.

По своей химической природе гормоны коры надпочечников являются стероидами. В их основе лежит углеводород циклопентанпергидрофенантрен, состоящий из трех шестичленных и одного пятичленного колец. Это и обуславливает схожесть химического строения с половыми гормонами, холестерином, провитаминами D, желчными кислотами, также являющимися производными циклопентанпергидрофенантрена. Общее название гормонов коры надпочечников — кортикоиды (или кортикоидные гормоны, кортикостероиды). В настоящее время число выделенных из надпочечников стероидов достигло свыше 40. Однако в большинстве своем эти стероиды — биологически неактивные, и лишь 8 соединений обладают способностью в той или иной степени воспроизводить действие экстракта коры надпочечников. Так, наружный слой (клубочковый) продуцирует минералокортикоиды, средний (пучковый) — глюкокортикоиды, внутренний (сетчатый) слой — половые гормоны (преимущественно мужские).

Вещества, вырабатываемые внутренней зоной коры надпочечников, в частности прогестерон, являются промежуточными продуктами обмена кортикостероидов. Продуцируемые корой надпочечников стероидные гормоны можно разделить на 3 большие группы: 1) так называемые собственные гормоны, 2) 17-кетостероиды андрогенного действия, 3) женские половые гормоны.

Собственно гормоны коры надпочечников немногочисленны. Они представлены двумя группами: 1) глюкокортикоидами; 2) минералокортикоидами. Все они — производные прегнана и аллопрегнана.

В первую группу входят кортикостерон, дегидрокортикостерон, гидрокортизон и кортизон. Все натуральные адренкортикостероидные гормоны, за исключением альдостерона, имеют ту же самую основную структуру, что и кортикостерон. Они отличаются лишь наличием или отсутствием кислорода либо OH-группы у C-11 и C-17.

Эти гормоны влияют не только на углеводный, но и на белковый и водно-минеральный обмен.

Вторую группу составляют минералокортикоиды альдостерон и дезоксикортикостерон (ДОК), оказывающие выраженное воздействие на водно-солевой обмен. Причем альдостерон (электростерин, регулирующий электролитный обмен) в 30—100 раз активнее ДОКа в отношении минерального обмена, на углеводный же обмен он влияет лишь в 3 раза слабее, чем кортизон. Таким образом, альдостерону принадлежит ведущая роль в регуляции натриевого обмена.

По данным ряда авторов, до 80 % общего количества кортикостероидов, выделяемых надпочечниками, приходится на долю двух стероидов — кортикостерона и 17-оксикортикостерона; около 1—2 % — на долю постоянно присутствующего в надпочечниковой крови альдостерона.

## МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ 17-КЕТОСТЕРОИДОВ В МОЧЕ

Наиболее доступным в лабораториях тестом для суждения о функциях коры надпочечников является исследование нейтральных 17-кетостероидов (17-КС) в моче. К этой группе кортикоидов относятся производные андростана. Их объединяет общий признак — наличие кетонной группировки у углеродного атома в 17 положении.

$\frac{1}{3}$  общего количества 17-КС у мужчин происходит из тестостерона (образующегося в интерстициальных клетках семенников),  $\frac{2}{3}$  синтезируется в сетчатой зоне коры надпочечников. У женщин они в основном секретируются корой надпочечников. Поэтому у мужчин отмечается большая продукция 17-КС, чем у женщин. Следовательно, изучение экскреции с мочой только общих нейтральных 17-КС не позволяет судить о глюкокортикоидной функции коры надпочечников. Вместе с тем определение общих 17-кетостероидов в моче не может полностью характеризовать интенсивность андрогенной функции половых желез. И все же для суммарной оценки деятельности коры надпочечников, особенно при динамическом наблюдении за ее функцией в процессе лечения стероидными гормонами, эта проба в сочетании с тестом определения экскреции 17-оксикортикостероидов может быть использована в клинике. Более точные сведения получают, блокируя функцию коры надпочечников дексаметазоном и стимулируя ее АКТГ.

Методы исследования 17-КС включают следующие этапы: 1) сбор и хранение материала, 2) гидролиз связанных 17-КС, 3) экстракцию освобожденных 17-КС, 4) очистку экстракта, 5) сравнение растворов, 6) количественное определение.

Существующие способы исследования 17-кетостероидов различаются в основном на последнем своем этапе. В зависимости от этого их можно разделить на: 1) биологические и 2) химические (колориметрические).

Для определения фракционного состава 17-КС могут быть использованы другие методы, базирующиеся на: 1) осаждении 3- $\beta$ -фракции дигитонином, 2) полирографии, 3) распределительной колончатой хроматографии, 4) бумажной хроматографии, 5) тонкослойной хроматографии, 6) газожидкостной хроматографии.

Материалом для исследования служит суточная моча, поскольку выделение 17-кетостероидов в физиологических условиях подвержено значительным колебаниям. Суточный (циркадный) ритм состоит в наиболее высоком их выделении утром, более низком — вечером и минимальном — ночью. Для определения гормонов мочу собирают без консерванта и хранят в холодном месте (в холодильнике при 0—12° С). Хорошими консервантами для предохранения ее от развития микрофлоры являются добавляемые из расчета на 100 мл мочи 10 мг тиомерсала, 1 мл водного раствора мертиолата (10 г/100 мл), 1 мл хлороформа, 10 мл толуола.

В лабораториях лечебно-профилактических учреждений наиболее часто применяемым консервантом служит хлороформ.

Считают, что в таких условиях моча может сохраняться в течение нескольких недель.

В практической работе клинко-диагностических лабораторий наиболее пригодным способом для высвобождения связанных форм 17-КС является метод горячего кислотного гидролиза с использованием концентрированной соляной и ледяной уксусной кислот.

Свободные и освобожденные при помощи гидролиза 17-кетостероиды экстрагируются из исследуемого материала при помощи органических растворителей: этилацетата, этиленхлорида, бензола, тетрагидрофурана, тетрахлорметана, дихлорэтана, диэтилового эфира, метилхлорида. Из всех перечисленных органических растворителей, применяемых для экстракции 17-КС, особого внимания заслуживает этиловый эфир: он дешев, с трудом образует эмульсии, не требует для выпаривания интенсивного нагревания, хорошо экстрагирует 17-кетостероиды, наименее токсичен. Экстракцию можно проводить в делительных воронках, в эрленмейеровских колбах с притертыми пробками (что проще и доступнее), а также в специальных экстракторах (последние не имеют особых преимуществ).

Кроме «истинных» 17-кетостероидов в моче содержится большое количество неспецифических хромогенов, которые экстрагируются органическими растворителями вместе со стероидами.

Для их удаления экстракт обрабатывают чаще всего раствором  $\text{NaOH}$  (10 мл 2—3 н  $\text{NaOH}$ ) либо добавленным к экстракту кусочков щелочи в количестве 2—5 г с последующим фильтрованием жидкой фазы. Удобнее пользоваться не сухим  $\text{NaOH}$ , а его раствором, так как при этом исключается этап фильтрования.

Щелочную фазу устраняют промыванием экстракта дистиллированной водой.

Наилучшим способом освобождения от неспецифического материала при определении 17-КС в моче является доливание в нее перед гидролизом формалина и очистка экстракта раствором  $\text{NaOH}$ .

Очищенные экстракты 17-КС выпаривают. В сухом остатке осуществляют количественное определение 17-КС.

Наиболее распространенный химический способ количественной оценки содержания 17-КС — это колориметрические методы.

Колориметрическое исследование нейтральных 17-КС основано на взаимодействии последних с метадинитробензолом в щелочной среде (реакция Циммермана), что приводит к образованию комплексов фиолетовой или красно-фиолетовой окраски с максимумом поглощения света при длине волны 520 нм.

Существует множество модификаций реакции Циммермана. Можно выделить три ее варианта:

1) Метод Каллоу с соавт. (1938), в котором используют растворы, приготовленные на абсолютном спирте.

2) Метод Голтофа и Коха (1940) с применением водно-алкогольных растворителей и разведением реакционной смеси спиртом.

3) Метод Циммермана (1952) с использованием водно-алкогольных растворителей и проведением экстракции цветного комплекса в органический растворитель (хлороформ или эфир) с последующим фильтрованием раствора через бумажный фильтр для освобождения от эмульсии.

Реакция с метадинитробензолом зависит от щелочности среды, концентрации метадинитробензола, температуры и времени протекания реакции. Наилучшие условия для нее создаются при инкубации смеси этанольного экстракта, метадинитробензола и спиртового раствора  $\text{KOH}$  в темноте в водяной бане с температурой  $+25^\circ\text{C}$  или при комнатной температуре в течение 1 ч.

Основным недостатком реакции Циммермана с экстракцией комплекса органическим растворителем является образование в экстракте стойких эмульсий, для избавления от которых требует-

ся фильтрование раствора через бумажный фильтр или центрифугирование. М. А. Крехова модифицировала эту реакцию, подобрав оптимальные количества реактивов, спирта и хлороформа; она заменила процедуру фильтрования хлороформного экстракта через бумажный фильтр смешиванием его с небольшим количеством спирта, что, правда, не позволяет освободиться от эмульсии, но повышает стабильность окраски. Специфические хромогены, окрашенные в лиловый цвет, переходят в хлороформный (нижний) слой, а неспецифическая окраска (желто-коричневая, коричневая) остается в верхнем, водно-спиртовом слое, который затем удаляют.

Таким образом, наиболее специфичной и доступной для исполнения является реакция Циммермана в модификации М. А. Креховой. Ее используют в унифицированном варианте метода исследования 17-КС в моче (Н. В. Самосудова, Ж. Ж. Басс, 1967).

### Определение 17-кетостероидов в моче по реакции с метадинитробензолом

Принцип метода базируется на количественном измерении специфически окрашенных в фиолетовый цвет экстрагированных хромогенов, образующихся в результате реакции 17-кетостероидов с метадинитробензолом в щелочной среде.

**Реактивы.** 1. Этиловый эфир, свободный от перекисей (можно использовать эфир для паркоза).

Ставят пробу на наличие перекисей. 200 мл эфира выпаривают на водяной бане, остаток растворяют в 2 мл абсолютного этанола. К 0,2 мл полученного раствора добавляют 0,2 мл спиртового раствора метадинитробензола (реактив 7) и 3 мл спиртового раствора едкого кали. При отсутствии перекисей не должно появляться более интенсивной окраски, чем при добавлении 0,005 г (5 мг) кристаллического 17-кетостероида. Обнаруженные перекиси удаляют перемешиванием эфира с серным железом (10 г/100 мл) в 1 мл растворе соляной кислоты с последующим промыванием органической фазы водой. Эфир хранят в доверху наполненных флаконах из темного стекла.

2. Абсолютный этанол, очищенный от альдегидов и кетонов, свежесделанный.

Абсолютный этанол готовят в колбе с обратным холодильником из 90—96° этанола кипячением его в течение 12 ч с негашеной известью (СаО) или окисью бария (BaO), добавляемых из расчета 10 г на каждые 100 мл жидкости. Полученный путем последующей отгонки (с применением прямого холодильника) абсолютный этанол должен иметь температуру кипения +78,3° С.

Описание способа абсолютирования этанола с использованием безводного сульфата меди дано в рубрике «Реактивы» к методу определения общего холестерина в сыворотке крови, основанному на реакции Либермана — Бурхарда (метод Ильяка).

Абсолютный этанол хранят в сосуде с притертой пробкой в эксикаторе над поглотителем.

Для проверки этанола на наличие в нем альдегидов к 5 мл этилового спирта доливают 0,2 мл раствора марганцевокислого калия (1 : 5000). После перемешивания содержимое склянки, имеющее розовую окраску, оставляют стоять 20 мин. Исчезновение розовой окраски указывает на присутствие альдегидов.

Освобождаются от альдегидов двумя способами: а) к 1 л абсолютного этанола добавляют 2 г солянокислого 2,4-динитрофенилгидразина и 0,5 мл концентрированной соляной кислоты, колбу закрывают пробкой, оставляют стоять 48 ч в темноте при периодическом ее встряхивании, после чего этанол отгоняют;

б) отдельно растворяют 7 г азотнокислого серебра и 15 г едкого кали в 100 мл горячего этанола. Полученный раствор прибавляют к 4 л абсолютного этанола, встряхивают и оставляют в защищенном от света месте. Отгоняют, первые 70 мл и последние 200 мл дистиллата отбрасывают.

3. Концентрированная соляная кислота,  $\rho$  1,19 кг/л.

4. Ледяная укусуная кислота.

5. Раствор едкого натра — 10 г/100 мл.

6. 5 н раствор едкого кали в метаноле (применяемый в качестве растворителя метиловый спирт делает реактив более устойчивым при хранении). 28 г едкого кали доводят до 100 мл метиловым спиртом, после чего раствор немедленно фильтруют (щелочь нельзя оставлять неотфильтрованной, потому что при этом в спиртовом растворе щелочи образуются желтоокрашенные продукты, в результате чего получаются очень высокие значения контрольной пробы). После фильтрования щелочь титруют 0,1 н соляной кислотой с индикатором метилоранжем. Реактив хранят в темной запарафинированной склянке в холодильнике. Он годен на протяжении 1—1,5 мес.

7. Спиртовой раствор перекристаллизованного метадинитробензола — 2 г/100 мл.

Для перекристаллизации метадинитробензола 10 г этого препарата растворяют в 375 мл 96° этанола и нагревают до +40° С. К раствору доливают около 50 мл 2 н едкого натра и смесь оставляют на 5 мин. Затем ее охлаждают и прибавляют к ней при помешивании 1,25 л дистиллированной воды. Раствор фильтруют через воронку Бюхнера и промывают метадинитробензол на фильтре абсолютным этанолом (1 раз — 60 мл и 2 раза — по 40 мл).

Метадинитробензол считается чистым, если он имеет точку плавления +90,5—91° С.

Реактив 1,3-dinitrobenzole(meta)reinst фирмы «Veb-Berlin-Chemie-Berlin-Adershof» не нуждается в перекристаллизации.

**Примечание.** Кристаллизацию следует осуществлять очень быстро, чтобы образовывались мелкие кристаллы (так как большие плохо растворяются в спирте). Полученные мелкие игловидные кристаллы должны иметь указанную температуру плавления.

Пробу на чистоту метадинитробензола ставят следующим образом. Спиртовой раствор метадинитробензола (400 мг реагента растворяют в 20 мл абсолютного этанола) не должен давать окраски в течение 1 ч после прибавления к нему равного объема 3 н раствора едкого кали. Используемый в качестве реактива спиртовой раствор метадинитробензола держат в темной склянке с притертой пробкой.

8. Метанол, дважды перегнанный.

9. Хлороформ свежеприготовленный. Можно применять хлороформ для наркоза. Очистка хлороформа — способом Н. А. Юдаева. В темную бутылку или коническую колбу на 2 л помещают 1 л хлороформа и 50 мл концентрированной серной кислоты. Если очистку проводят в колбе, ее закрывают светонепроницаемым колпаком. Содержимое склянки встряхивают на протяжении 5—6 ч. Серую



кислоту отсасывают, добавляют 50—100 мл воды, несколько раз взбалтывают жидкость в бутылки круговыми движениями и затем воду отсасывают пипеткой, присоединенной к водоструйному насосу. Отмытый таким способом хлороформ можно оставить на ночь. На следующий день в бутылку с хлороформом вливают 50—100 мл концентрированного раствора аммиака, ее содержимое встряхивают несколько часов, аммиак отсасывают и хлороформ вновь промывают водой. Добавляют в бутылку 50—70 мл раствора серной кислоты (50 г/100 мл) и взбалтывают ее в течение 1,5—3 ч. Кислоту отсасывают, хлороформ промывают водой и 60 мин перемешивают с насыщенным раствором углекислого натрия (все материалы для промывания берут в объеме, в 10 раз меньшем, чем объем хлороформа). Раствор соды тщательно отсасывают и осушают хлороформ безводной содой или сернокислым натрием, вносимыми из расчета 30—40 г на 1 л хлороформа, на протяжении 12—18 ч. Осушенный раствор дважды перегоняют, нагревая хлороформ на водяной бане (желательно использовать перегонный аппарат на шлифах). При отсутствии такого аппарата все соединения делают на корковых пробках, тщательно обернув их станиолюю. Первые и последние 30—40 мл хлороформа при перегонке удаляют.

Если после перегонки хлороформ остается мутным, это значит, что перед дистилляцией он был плохо осушен. Небольшое количество безводного углекислого натрия просветляет его, и такой хлороформ можно использовать для экстракции. Всю обработку следует осуществлять в полной темноте, для чего стеклянную посуду обертывают черной светонепроницаемой бумагой. Очищенный этим способом хлороформ можно держать в темноте в течение месяца.

10. Раствор формальдегида — 40 г/100 мл (формалин). Раствор разводят в отношении 1 : 5 дистиллированной водой.

11. Стандартные растворы кетостероидов — кристаллические дегидроэпиандростерон и андростерон.

Стандартные растворы готовят в концентрации 100 мкг/мл, для чего 5 мг дегидроэпиандростерона или андростерона растворяют в 50 мл абсолютного этанола. Хранят в холодильнике в темной склянке с притертой пробкой. Эталон устойчив в течение нескольких месяцев.

Ход определения включает в себя несколько этапов.

Первый этап — гидролиз мочи. К помещенным в коническую (на 70—100 мл) колбу 20 мл мочи (взятой из суточного ее количества) прибавляют 3 мл концентрированной соляной кислоты, 1 мл ледяной уксусной кислоты и 0,2 мл раствора формальдегида. Содержимое колбы перемешивают, накрывают ее воронкой (или лучше каплеуловителем) и ставят в кипящую водяную баню на 15 мин. После этого колбу охлаждают под струей холодной водопроводной воды и содержимое ее переносят в делительную воронку.

Второй этап — экстракция и очистка экстракта. Экстракцию производят эфиром (2 раза по 10 мл) в течение 1—1,5 мин. Нижний слой мочи удаляют. Эфирные экстракты объединяют, промывают тремя порциями по 10 мл раствора едкого натра (по 3 мин). Можно использовать и сухой едкий натр, добавляя его в количестве 2—5 г. В этом случае экстракт необходимо либо профильтровать, либо слить в другую колбу. Щелочную фазу, содержащую эстрогены и кислые вещества, убирают и экстракт промывают 1 раз 10 мл дистиллированной воды. Воду тщательно отделяют, эфирный

экстракт порциями переносят в центрифужную пробирку и выпаривают на теплой (не выше +50° С) водяной бане. Сухие экстракты (при формальдегидном способе они должны быть бесцветными) на этом этапе можно оставить до следующего дня в холодильнике.

Количественное определение основано на реакции Циммермана в модификации М. А. Креховой.

К сухому остатку доливают 0,2 мл абсолютного этанола, 0,2 мл раствора едкого кали в метаноле и 0,2 мл спиртового раствора метадинитробензола. Содержимое пробирки тщательно перемешивают и оставляют для развития окраски на 1 ч (в темноте!) при комнатной температуре. По окончании инкубации добавляют 3 мл водного этанола (50 г/100 мл) и 2 мл хлороформа, смесь энергично встряхивают. Окрашенные в лиловый цвет продукты переходят в нижний, хлороформный слой, а продукты с неспецифической окраской — желто-коричневой или коричневой — остаются в верхнем спирт-водном слое. Через 1—2 мин верхний слой удаляют отсасыванием его пастеровской пипеткой с помощью водоструйного насоса или (при отсутствии последнего) другим способом. Делают это аккуратно, тщательно собирая капли водного слоя со стенок пробирки. Необходимо соблюдать осторожность, чтобы не засосать в капилляр хлороформный слой.

В хлороформный слой добавляют 1 мл абсолютного этанола. После перемешивания интенсивность окраски раствора измеряют на ФЭКе с зеленым светофильтром при длине волны 500—560 нм в кювете с толщиной слоя 5 мм, которую закрывают крышкой. Результаты сравнивают с аналогичными данными контрольной пробы.

Окраска стабильна в течение 1 ч, однако со временем интенсивность ее несколько снижается. По данным М. А. Креховой, через 1 ч она оказывается слабее уже на 10—15%. В связи с этим на одно определение следует брать не более 10—15 проб.

Контрольную пробу готовят следующим образом. В 2 пробирки приливают по 0,2 мл абсолютного этанола, по 0,2 мл раствора едкого кали в метаноле и по 0,2 мл спиртового раствора метадинитробензола. Все перемешивают и далее обрабатывают так же, как опытные пробы.

Расчет ведут по формуле или по калибровочному графику. Для получения данных к расчету по формуле параллельно опытным пробам через процедуру анализа пропускают 0,5 мл основного стандартного раствора, содержащего 50 мкг андростерона или дегидроэпандростерона.

Для получения данных к построению калибровочного графика через все этапы анализа проводят стандартный раствор андростерона (дегидроэпандростерона) в количестве от 0,1 до 1,0 мл основного раствора (10 мкг, 20 мкг, 30 мкг и т. д. до 100 мкг). Линейная зависимость сохраняется до концентрации стандартного раствора 100 мкг/мл.

Расчет по формуле:

$$x = \frac{E_{\text{оп.}} \cdot a \cdot 50}{E_{\text{ст.}} \cdot 20 \cdot 1000},$$

где  $x$  — экскреция 17-КС с мочой (мг/сут); 50 — содержание (мкг) андростерона или дегидроэпандростерона в стандартной пробе;  $a$  — диурез (мл/сут); 20 — количество взятой в опыт мочи (мл); 1000 — коэффициент пересчета, используемый для перевода мкг в мг.

После сокращения получаем упрощенную формулу:

$$x = (E_{оп.} \cdot a) / (E_{ст.} \cdot 400).$$

Расчет по калибровочному графику:

$$x = (C \cdot a) / (20 \cdot 1000),$$

где  $C$  — найденное по калибровочному графику содержание 17-КС в пробе (мкг стандартного вещества андростерона или дегидроэпиандростерона).

Для перевода полученных по формуле значений из мг в мкмоль первое из них умножают на коэффициент 3,467.

При больших концентрациях 17-КС (свыше 100 мкг в пробе) дальнейший ход исследования может сводиться к тому, чтобы:

1) провести установку фотометрического прибора по оптической плотности контрольной пробы и измерить экстинкцию опытной пробы в кюветах с толщиной слоя не 5, а 1 мм, чем как бы достигается разведение мочи в 5 раз;

2) развести мочу физиологическим раствором.

В формулу расчета следует ввести поправочный на разведение коэффициент.

Экскреция 17-КС в норме составляет: у мужчин —  $12,83 \pm 0,8$  мг/сут (45 мкмоль/сут) с колебаниями от 6,6 до 23,4 мг/сут (22,9—82,0 мкмоль/сут); у женщин —  $10,61 \pm 0,66$  мг/сут (35 мкмоль/сут) с колебаниями от 6,4 до 18,02 мг/сут (22,2—62,0 мкмоль/сут).

Приводим зависимость экскреции 17-КС от возраста (у мальчиков).

Новорожденные — 0,1—0,5 мг/сут (0,35—1,73 мкмоль/сут); 4—7 лет — 0,7—2,4 мг/сут (2,43—8,30 мкмоль/сут); 7—12 лет — 1,8—5,0 мг/сут (6,2—17,3 мкмоль/сут); 12—15 лет — 5,0—10,0 мг/сут (17,3—35,0 мкмоль/сут).

Примечания: 1. Возможно проведение исследования и без добавления формальдегида перед гидролизом, но при этом получают окрашенные экстракты.

2. Перед исследованием 17-КС необходимо исключить не менее чем за 2 нед прием тестостерона.

Мепробамат, хлордиазепексид (либриум, элениум), метиприлон (нолудар), паральдегид, феназопиридин гидрохлорид (пиридиум), хлорпромазан, апрезолин, декамфетамин, диамокс, ацеталамид, дигитоксин, хлоргназид и некоторые другие могут обусловить ошибки при исследовании функции коры надпочечников у пациентов.

3. Мочу можно собирать без консервантов, ее держат в холодильнике. К точному количеству мочи для предотвращения развития микрофлоры рекомендуется добавлять 1 мл хлороформа или 10 мл толуола.

В этих случаях моча до анализа может храниться в течение нескольких недель.

### *Клинико-диагностическое значение определения 17-кетостероидов в моче*

Уровень экскреции 17-КС у девочек и мальчиков до 6-летнего возраста не превышает 3—4 мг (10,4—13,9 мкмоль) в сутки. К 12 годам она достигает приблизительно 5—10 мг (17,3—35,0 мкмоль), причем у мальчиков оказывается несколько выше, чем у девочек. Максимальной величины экскреция у мужчин и женщин наблю-

дается в 25 лет, после чего начинается медленное ее снижение. В 80-летнем возрасте она становится равной экскреции детей в 12 лет.

Выделение 17-КС несколько выше в часы бодрствования, чем в часы сна. Всякого рода состояния напряжения (стресс) характеризуются возрастанием экскреции 17-КС, однако оно значительно менее выражено, чем наблюдаемое в этих случаях повышение выделения кортикостероидов.

Следовательно, при определении содержания 17-КС в моче полученные результаты необходимо всегда сравнивать с соответствующей возрастной нормой. При этом следует учитывать недавно перенесенные травмы, ослабление общего состояния организма и другие факторы, могущие повлиять на содержание 17-КС.

При болезни Аддисона экскреция 17-КС очень низка и составляет не более  $\frac{1}{3}$ — $\frac{1}{5}$  нормальной величины.

Уровень 17-КС понижен при гипотиреозе, тяжелых формах болезни печени (циррозе), синдроме остаточных гонад, анорхизме.

Содержание 17-КС практически равно нулю при пангипопитуитаризме (болезнь Симмондса), гипофизарном карликовом росте и, как уже отмечалось, очень часто при аддисоновой болезни.

Опухоль надпочечников, которая может проявиться как синдром Иценко — Кушинга или как вирильный (адреногенитальный) синдром, характеризуется, как правило, повышенным содержанием в моче 17-КС, особенно если опухоли свойственно вирилизирующее действие. В этих случаях величины экскреции около 100 мг/сут (350 мкмоль/сут) являются обычными. При раке коры надпочечников уровень общих 17-КС чаще всего возрастает в 2—10 раз, достигая иногда 300 мг/сут (1040 мкмоль/сут). Метастазирующая раковая опухоль надпочечников может обусловить экскрецию, равную 1000 мг (3500 мкмоль) 17-КС в сутки. Если же раковая опухоль надпочечников обнаруживает себя синдромом Иценко — Кушинга, повышение экскреции 17-КС выражено значительно слабее, чем при вирильном синдроме.

Гиперплазия надпочечников, под которой подразумевают увеличение желез без неопластических образований, также может проявляться или вирильным синдромом и повышенной экскрецией 17-КС (30—100 мг/сут, 104—350 мкмоль/сут) или синдромом Иценко — Кушинга. В последнем случае экскреция 17-КС, как правило, находится в пределах нормы или слегка увеличена. Для этого вида патологии характерно повышение экскреции кортикостероидов. Различают, кроме того, врожденную гиперплазию, встречающуюся у больных обоих полов, чаще у девочек. Нарушения возникают в период эмбриональной жизни. Характеризуются они повышенным выделением 17-КС и нарушением путей синтеза кортикостероидов.

Синдром Иценко — Кушинга без анатомических изменений в надпочечнике, как правило, сопровождается нормальными величинами экскреции 17-КС.

## ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОРТИКОСТЕРОИДОВ В МОЧЕ

Кортикостероиды выделяются с мочой в свободном виде лишь в небольшом количестве, составляющем примерно 3,7 % всего объема экскреции стероидных гормонов и их производных. Большая часть гормонов экскретируется в виде метаболитов, представленных глав-

ным образом конъюгатами кортикостероидов с глюкуроновой, серной, фосфорной кислотами и липидами.

Методы исследования содержания кортикостероидов можно разделить на две большие группы: биологические и физико-химические. Они основываются либо на 1) определении отдельной группировки в структуре кортикостероидов и их метаболитов, либо на 2) установлении каждого из кортикостероидов или их метаболитов.

Клинико-диагностической лаборатории под силу выполнение лишь части методов первой группы. Для определения кортикостероидов в моче используют, как правило, физико-химические способы исследования, в частности фотометрические.

Наиболее распространенными и ценными из колориметрических методов являются те, которые базируются на реакции 17,21-диокси-20-кетостероидов с фенолгидразином, приводящей к образованию окрашенных соединений — гидразонов-хромогенов Porter — Silber. Группа этих стероидов составляет основную часть метаболитов (80—90 %), экскретируемых с мочой. Она включает в себя главным образом гидрокортизон (кортизол), кортизон, 17-окси-11-дезоксикортикостерон, а также тетрагидропроизводные кортикостероидов — тетрагидрокортизол и тетрагидрокортизон. Эти соединения находятся в моче как в свободной, так и в связанной форме. Их определение позволяет судить о количестве глюкокортикоидов, вырабатываемых корой надпочечников за сутки, и о степени их связывания в печени.

Существует множество модификаций методов определения 17-оксикортикостероидов (17-ОКС) в моче. Все они включают следующие этапы: 1) сбор и хранение материала, 2) экстракцию стероидов из мочи, 3) очистку экстрактов, 4) количественное определение.

Для оценки глюкокортикоидной функции коры надпочечников необходимо проводить исследование в порции мочи, взятой из суточного ее количества. Колебания экскреции 17-ОКС в течение дня очень велики. Показано, что наивысшая концентрация 17-ОКС в моче обнаруживается в 8, 11 и 14 ч, а наименьшая — в 2 и 5 ч (суточный ритм выделения 17-ОКС).

При исследовании концентрации 17-ОКС рекомендуется исключить из применения следующие лекарства: феноптиазин, дигиталис, барбитураты, мепробамат, транквилизаторы гидразинового строения, амфетамины, олеандомицин, ингибиторы моноаминоксидазы, поскольку они мешают цветной реакции с фенолгидразином.

Для консервации мочи в нее добавляют бактериостатические агенты (предпочтительнее хлороформ) в количествах, указанных в методе определения 17-ОКС. Для исследования мочу хранят в холодильнике (при температуре +2—4°C), ее можно замораживать. Двух- и трехкратное оттаивание мочи не влияет на величину исследования суммарных 17-ОКС.

Для освобождения кортикостероидов из связанных форм используют: а) ферментативный гидролиз и б) кислотный гидролиз на холоде и при нагревании пробы мочи. Кислотный гидролиз приводит к очень быстрому разрушению 17-ОКС. Кроме того, при нем очень часто образуются соединения-артефакты.

Наиболее специфичным считается ферментативный гидролиз β-глюкуронидазой.

Свободные и освобожденные в результате гидролиза из конъюгированного состояния 17-ОКС хорошо экстрагируются хлороформом,

этилацетатом, этилендихлоридом, метилендихлоридом. При экстракции эти растворители легко образуют эмульсии, поэтому их применяют в значительно больших количествах по отношению к объему мочи, например, в следующих соотношениях — 2 : 1, 3 : 1.

Предпочтительнее использовать метилендихлорид, так как он более стабилен, долго сохраняется при комнатной температуре, в то время как этилендихлорид, хлороформ годны без очистки в течение нескольких дней.

Очищают экстракт чаще всего слабым раствором щелочи, которая удаляет эстрогены, пигменты и кислоты. Экстракцию следует проводить очень быстро, так как при длительном взаимодействии со щелочью часть стероидов разрушается. Избыток щелочи удаляется промывкой экстракта водой, от следов которой освобождаются встряхиванием содержимого склянки с безводным сульфатом натрия.

Из всех способов количественного определения кортикостероидов наилучшим является метод, основанный на реакции 17,21-диокси-20-кетостероидов с фенилгидразином.

**Определение 17-оксикортикостероидов в моче по реакции с фенилгидразином после ферментативного гидролиза (метод Silber, Porter, 1957, в модификации Н. А. Юдаева и М. А. Креховой, 1960)**

Принцип метода основан на измерении количества окрашенных веществ, образующихся в результате реакции между фенилгидразином и 17,21-диокси-ацетоновой группировкой молекулы стероида в кислой среде. Глюкуроныды 17,21-диокси-20-кетостероидов освобождаются из связанного состояния путем ферментативного гидролиза  $\beta$ -глюкуронидазой.

**Реактивы.** 1. Хлороформ х. ч., свежеперегнанный.

Вместо хлороформа можно использовать в тех же количествах метилендихлорид.

Лучшие результаты достигаются при применении хлороформа для наркоза. Для определения 17-ОКС в моче бывает достаточно одной перегонки этого хлороформа над безводным углекислым натрием (добавляемым в количестве 30—40 г на 1 л хлороформа). Первые и последние 30—40 мл хлороформа при перегонке удаляют.

2. 0,1 н раствор едкого натра.

3. 2 н раствор едкого натра.

4. Солянокислый фенилгидразин, дважды перекристаллизованный из спирта, последнюю перекристаллизацию проводят из очищенного этилового спирта. 5—10 г вещества растворяют в 30—40 мл этанола при нагревании, непрерывно встряхивая сосуд круговыми движениями и периодически делая перерывы на 20—30 с. Охлаждают содержимое вначале при комнатной температуре, а затем в холодильнике (не менее 1 ч) до полной кристаллизации. Кристаллы переносят в бюхнеровскую воронку с двумя бумажными фильтрами, высушивают под вакуумом, который создают в колбе Бунзена. Процедуру повторяют от начала до конца второй раз. Высушивают фенилгидразин до постоянного веса, хранят в темноте в эксикаторе на протяжении 2—3 мес.

5. Разбавленная серная кислота. 310 мл концентрированной серной кислоты (выдерживающей пробу Савалы) приливают осторожно к 190 мл дистиллированной воды.

6. Серносернистой реактив. 100 мл разбавленной серной кислоты смешивают с 150 мл абсолютного, свежееотогнанного этилового спирта.

7. Этиловый спирт очищенный. Способ очистки и проверки этанола на пригодность приводится в описании предыдущего метода (рубрика «Реактивы»).

8. Фенилгидразинный реактив. 21,7 мг солянокислого фенилгидразина, дважды перекристаллизованного из спирта, растворяют в 50 мл спиртового раствора серной кислоты.

9. Ацетатный буфер, pH 4,5. 5,79 г уксуснокислого натрия ( $\text{CH}_3\text{COONa}$ ) растворяют в 10 мл дистиллированной воды, добавляя 3,25 мл ледяной уксусной кислоты и смесь доводят до 1 л дистиллированной водой.

10. Стандартный раствор кортизона или гидрокортизона (20 мкг в 1 мл). Навеску в 1 мг стандарта растворяют в 50 мл дважды отогнанного метанола или хлороформа. Стандартный раствор держат в стеклянной посуде, обернутой черной светонепроницаемой бумагой, в холодильнике.

11. Безводный сернокислый натрий ч. д. а. или х. ч.

12. 2 н раствор соляной кислоты.

13. Метанол, дважды отогнанный.

14.  $\beta$ -глюкуронидаза с активностью не менее 100 000 ед. в 1 г препарата.

Перед анализом навеску порошка  $\beta$ -глюкуронидазы, содержащую 500 ед. активности на 1 мл мочи, растворяют в центрифужной пробирке в 11 мл дистиллированной воды, периодически помешивая ее содержимое в течение 30 мин. Центрифугированием при 3000 об/мин на протяжении 1—2 мин отделяют осадок. Раствор готовят перед применением в соответствии с количеством мочи, подлежащей обработке. Порошок хранят в холодильнике в посуде с притертой пробкой.

Ход определения. Измеряют суточное количество мочи и отбирают 50 мл ее. pH мочи доводят до 6,5, добавляя каплями в пробу 2 н едкий натр или 2 н соляную кислоту (при этом допустимо пользоваться универсальной индикаторной бумагой). Из этой пробы в две эрленмейеровские колбы вносят по 10 мл подкисленной мочи (для установления свободных 17-ОКС). К ним доливают по 5 мл ацетатного буфера и пробы помещают до следующего дня в холодильник для дальнейшей обработки. Затем в две эрленмейеровские колбы приливают еще по 5 мл подкисленной мочи (для определения связанных 17-ОКС). Эти пробы кипятят (на электрической плитке) в течение 5 мин для удаления ингибитора фермента, прикрывая их воронками, чтобы не выпаривалась вода. После этого охлаждают их до комнатной температуры и добавляют в каждую колбу по 5 мл ацетатного буфера, по 5 мл раствора  $\beta$ -глюкуронидазы. Пробы ставят в термостат на 16—18—20 ч при температуре  $+37^\circ\text{C}$ .

Для экстракции кортикостероидов из мочи хлороформом все 4 пробы (2 колбы мочи без гидролиза и 2 — после гидролиза) переносят в делительные воронки (емкостью 150 мл) и доливают к ним по 75 мл (5-кратный объем) очищенного и дважды перегнанного хлороформа. При отсутствии делительных воронок экстракционные процедуры можно проводить в самих колбах. Хлороформ вливают порциями, обмывая им внутренние стенки колбы (для более полного использования мочи). Делительные воронки плотно закрывают пробками, энергично встряхивают в течение 2 мин и оставляют в штати-



вах для расслаивания фаз. Затем удаляют верхний слой мочи обычным сливанием (если экстракцию осуществляют в делительных воронках) или осторожным отсасыванием капиллярной пипеткой с помощью водоструйного насоса, начиная с проб без гидролиза. Энергичным встряхиванием промывают хлороформные экстракты сначала 7,5 мл 0,1 н раствора едкого натра, а затем (после расслаивания фаз) 3 мл воды. После встряхивания в течение 15 с верхний слой удаляют. Для освобождения от остатков воды к пробам прибавляют по 2 г безводного сернистого натрия. Колбы плотно закрывают пробками и вновь встряхивают. Ставят в холодильник на 2 ч (или до следующего дня). После этого отмеривают цилиндром в чистые круглодонные колбы с притертыми пробками по 50 мл каждого хлороформного экстракта ( $\frac{2}{3}$  от цельного количества), осторожно сливая хлороформ с осадка или отфильтровывая его от порошка сернистого натрия.

Экстракцию хлороформных экстрактов мочи и стандартного вещества фенилгидразинным реактивом, развитие окраски проб осуществляют исходя из того, что из имеющихся двух проб мочи без гидролиза и двух проб мочи после гидролиза каждая первая проба будет служить контрольной на неспецифическую окраску, развивающуюся от действия серной кислоты. Поэтому к каждой первой пробе прибавляют по 4 мл спиртового раствора серной кислоты без фенилгидразина, а к каждой второй пробе и стандартному раствору (1 мл стандартного раствора выпаривают досуха, а затем растворяют в 50 мл хлороформа) приливают по 4 мл спиртового раствора серной кислоты с фенилгидразином. Все колбы плотно закрывают притертыми пробками и энергично встряхивают на протяжении 2 мин. Оставляют их в штативе для расслаивания фаз, а затем капиллярной пипеткой, соединенной с водоструйным насосом, отсасывают нижний хлороформный слой (из-за опасности отсосать верхний слой перед опусканием пипетки в раствор зажимают каучуковый шланг, соединяющий пипетку с водоструйным насосом, отпускают шланг только тогда, когда пипетка коснется дна колбы). Для развития окраски все пробы с реактивами инкубируют в водяной бане при  $+60^{\circ}\text{C}$  в течение 20 мин, затем охлаждают в водопроводной воде.

Измерение интенсиности окраски производят на спектрофотометре типа СФ-26 (СФ-4, СФ-4А, СФ-16 и другие) в кюветках с толщиной слоя 10 мм (общий объем кюветы — 4 мл) при длине волны 410 нм или на ФЭКе с синим светофильтром. Компенсационной жидкостью служит чистый реактив — спиртовой раствор серной кислоты. Оптическую плотность опытных проб и стандартного раствора измеряют путем сравнения с экстинкцией спиртового раствора серной кислоты с фенилгидразином.

Сначала рассчитывают количество свободных 17-ОКС.

Содержание свободных 17-ОКС в пробе (без гидролиза) находят из соотношения:

$$\frac{C_1}{E_1 - E_2} = \frac{C}{E_3}$$

где  $C_1$  — количество 17-ОКС в пробе без гидролиза (мкг);  $E_1$  — оптическая плотность опытной пробы без гидролиза;  $E_2$  — оптическая плотность контрольной пробы без гидролиза;  $E_3$  — оптическая плотность стандартного раствора (за вычетом экстинкции контрольной пробы к стандартной);  $C$  — количество стандарта (мкг).

Если отношение  $\frac{C}{E}$  выразить через  $Q$ , то формула приобретет вид:

$$C_1 = (E_1 - E_2) \cdot Q.$$

Количество свободных 17-ОКС в суточной моче рассчитывают по формуле:

$$x = \frac{C_1 \cdot a}{10 \cdot 2/3 \cdot 1000}, \text{ или } \frac{C_1 \cdot 3 \cdot a}{10 \cdot 2 \cdot 1000},$$

где  $x$  — количество свободных 17-ОКС в суточной моче (мг);

$\frac{C_1}{10 \cdot 2/3}$  — содержание (мкг) свободных 17-ОКС в 1 мл мочи (10 — количество мочи (мл) в пробе;  $2/3$  — часть хлороформного экстракта, использованного для анализа);  $a$  — суточное количество мочи (мл); 1000 — коэффициент для перевода из мкг в мг.

Количество суммарных 17-ОКС (мкг) в пробе рассчитывают по той же формуле, что и для свободных.

$$C_2 = (E_{\text{оп. проба с гидрол.}} - E_{\text{к. проба после гидрол.}}) \cdot Q.$$

Экскрецию суммарных 17-ОКС с суточной мочой (мг) находят следующим образом:

$$x = \frac{C_2 \cdot a}{5 \cdot 2/3 \cdot 1000}, \text{ или } \frac{C_2 \cdot 3 \cdot a}{5 \cdot 2 \cdot 1000},$$

где  $x$  — количество суммарных 17-ОКС в суточной моче (мг)

$\frac{C_2}{5 \cdot 2/3}$  — содержание (мкг) суммарных 17-ОКС в 1 мл мочи.

Для перевода размерности мг/сут в мкмоль/сут первый показатель умножают на коэффициент 2,76.

Уровень суточной экскреции свободных 17-ОКС колеблется в норме от 0,04 до 0,28 мг/сут (0,11—0,77 мкмоль/сут), в среднем составляя 0,14 мг/сут (0,38 мкмоль/сут). Содержание суммарных 17-ОКС в суточной моче варьирует от 1,31 до 7,39 мг (3,6—20,4 мкмоль), в среднем 3,7 мг (10,2 мкмоль).

Как видно, на долю свободных 17-ОКС в моче приходится от 1 до 7% от общего их количества.

#### *Клинико-диагностическое значение определения свободных и суммарных 17-оксикортикостероидов в моче*

Известно, что гидрокортизон в неизмененном виде выделяется с мочой в количестве, не превышающем 1%. Основная масса экскретируется в виде различных продуктов его превращения. Методом Silber и Porter у здоровых людей определяют около 4 мг кортикостероидов в суточном количестве мочи. Однако для оценки состояния коры надпочечников исследование содержания 17-ОКС в моче должно быть проведено многократно. Это связано с тем, что у людей наблюдаются значительные колебания суточной экскреции 17-ОКС. При интерпретации результатов анализа необходимо их сравнивать с нормативами соответствующих возрастных групп.

Значительное увеличение экскреции с мочой свободных и связанных 17-ОКС (иногда до 70 мг/сут, 193 мкмоль/сут) отмечается у больных с синдромом и болезнью Иценко — Кушинга. При вирильном

синдроме (включая адреногенитальный) выделение 17-ОКС повышено, однако величины экскреции оказываются ниже, чем при синдроме и болезни Иценко — Кушинга.

При болезни Аддисона, пангипопитуитаризме выделение 17-ОКС значительно снижается, величина рассматриваемого показателя у больных с этими состояниями часто близка к нулю.

Экскреция стероидов с мочой, как и концентрация их в крови, повышается при всех видах стресса, причем степень возрастания зависит от силы воздействия, которому подвергается организм.

При бронхиальной астме, крапивнице, полиморфной эритеме, острым суставном ревматизме, генерализованной эритематозной волчанке, псориазной артропатии, анкилозирующем спондилите и ревматоидной пурпуре экскреция 17-ОКС остается в пределах нормы, за исключением таковой при ревматоидной пурпуре (повышение экскреции стероидов). Однако у обследованных больных отмечаются изменчивость величин экскреции и отсутствие реакции надпочечников на АКТГ.

Изменение соотношения экскретируемых количеств свободных и связанных кортикостероидов может свидетельствовать о наличии того или иного патологического процесса: так, при многих заболеваниях печени и почек уровень свободных 17-ОКС значительно увеличивается, а связанных уменьшается, что указывает на нарушение процессов метаболизма кортикостероидов.

Определение клиренса кортикостероидов является важным тестом при оценке функциональной активности коры надпочечников у больных с органическими или функциональными нарушениями в деятельности почек.

Изучение экскреции 17-ОКС с мочой при применении функциональных проб и нагрузок позволяет более полно оценить состояние гипофизарно-надпочечниковой системы.

Как и при исследовании кортикостероидов в крови, в сомнительных случаях диагностики следует прибегать к стимуляции надпочечников с помощью АКТГ. Обычно этот тест занимает несколько дней. В течение двух дней устанавливают секрецию без стимуляции, затем дважды в сутки больному внутримышечно вводят по 20 ед. АКТГ на протяжении 4 дней (допустимы инъекции по 40 ед. АКТГ с пролонгированным действием). Очевидно, при этом наблюдается повышение экскреции у здоровых людей, практически отсутствие возрастания уровня экскреции у больных аддисоновой болезнью и резкое повышение экскреции у больных с синдромом Иценко — Кушинга. При исследовании беременных женщин была обнаружена увеличенная экскреция 17-кетогенных стероидов, которая достигла к концу беременности 17,5 мг/сут (48,2 мкмоль/сут). В первые сутки после родов отмечался дополнительный подъем уровня рассматриваемого показателя до 40 мг/сут (110 мкмоль/сут). На вторые сутки наблюдалось его снижение до 9,9 мг/сут (27,3 мкмоль/сут).

## ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОРТИКОСТЕРОИДОВ В ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ

Весьма важным тестом в диагностике ряда эндокринных заболеваний является исследование кортикостероидов в периферической крови.

Среди физико-химических способов их определения выделяют следующие основные группы:

1. Методы исследования некопьюгированных кортикостероидов.
2. Методы определения метаболитов кортикостероидов (парных соединений с глюкуроновой кислотой).
3. Методы исследования белковосвязанных и свободных кортикостероидов.

Для изучения содержания гормонов в крови (так же как и в случае определения их в моче) применяют способы, основывающиеся на реакционной способности некоторых группировок молекул кортикостероидов, и методы выделения отдельных гормонов (гидрокортизона, кортикостерона, тетрагидросоединений и т. д.).

Обе группы способов определения концентрации кортикостероидов в плазме крови включают в себя:

1. Сбор и хранение материала.
2. Выделение из него кортикостероидов (экстракция, очистка экстракта).
3. Количественное исследование.

Для определения кортикостероидов используют плазму, а не цельную кровь (при установлении кортикостероидов в последней большие трудности представляет очистка экстракта от пигментов).

Во время взятия крови на исследование кортикостероидов необходимо соблюдать следующие условия:

1. Устранять все факторы, вызывающие состояние напряжения (стресс).

2. Перед назначением исследования на несколько дней исключать прием больными некоторых лекарств: глюкокортикоидов (на 5—7 дней), фенотиазина, дигиталиса, барбитуратов, мепробамата, транквилизаторов гидразиновой структуры, амфетамина, олеандомицина, ингибиторов моноаминоксидазы.

3. Для предотвращения влияния липидов на процесс очистки и экстракции производить взятие крови у больных натощак.

4. Ввиду имеющегося суточного ритма содержания кортикостероидов в крови следует стандартизировать время забора крови (желательно ее брать в 8—9 ч утра).

5. В качестве антикоагулянта лучше всего использовать гепарин (1—2 капли неразведенного гепарина фирмы «Рихтер»). Применение цитрата натрия может помешать количественному определению кортикостероидов по реакции Silber — Porter.

6. Если нет возможности немедленно отделять плазму, кровь следует хранить в холодильнике.

Плазму отделяют центрифугированием при 3000 об/мин в течение 30 мин. Ее можно держать в холодильнике в замороженном состоянии на протяжении 2—3 дней без потерь кортикостероидов.

7. До проведения анализа нужно иметь сведения о состоянии функции печени и почек у данного больного, что необходимо для последующей трактовки полученных результатов.

Метиллендихлоридный или хлороформенный экстракты наряду с кортикостероидами содержат значительные количества различных примесей — липидов, пигментов. Поэтому перед постановкой любого из методов количественного определения гормонов требуется дальнейшая очистка экстракта. Для этого прибегают к следующим способам:

1. Последовательная промывка экстракта слабыми растворами щелочи (0,1 н NaOH, 0,2 н Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>).

2. Разделение стероидов и примесей между полярными и неполярными растворителями.

3. Хроматографический метод выделения стероидов.

Для постановки диагноза заболевания бывает достаточным установление содержания общих кортикостероидов в плазме крови. Для этих целей используют колориметрические методы. В основе их лежат:

1. Реакция с фенилгидразином (наиболее специфичная).

2. Реакция с 2,4-динитрофенилгидразином в кислом растворе.

3. Реакция восстановления солями тетразолия (на 20,21- $\alpha$ -кетовую группу).

4. Реакция с гидразидом изоникотиновой кислоты.

Флюориметрические способы базируются на свойстве стероидов флюоресцировать в растворах крепкой серной кислоты и этилового спирта. Причем 95 % всей флюоресценции анализируемой плазмы приходится на долю кортизола и кортикостерона.

Этим методом определения кортикостероидов в плазме свойствен целый ряд преимуществ: 1) они просты, 2) обладают высокой чувствительностью: для исследования требуется небольшое количество крови, 3) позволяют в течение рабочего дня выполнить большое количество анализов, 4) ответ для клиники может быть дан в течение 3—4 ч.

Таким образом, флюориметрический метод определения суммарного количества кортизола и кортикостерона в плазме крови с успехом может быть применен для оценки состояния системы гипофиз — кора надпочечников.

Полярнографические, энзиматические способы, методы с применением радиоактивных изотопов, тонкослойной и газожидкостной хроматографии не нашли широкого распространения в клинко-диагностических лабораториях из-за своей сложности.

Для суммарной оценки функции коры надпочечников достаточно исследования неконъюгированных 11-ОКС или свободных 17-ОКС с использованием в качестве унифицированных флюориметрического метода определения суммарного содержания кортизола и кортикостерона, а также способа Silber — Porter, основанного на колориметрическом установлении содержания глюкокортикоидов по реакции с фенилгидразином.

**Определение 11-оксикортикостероидов в плазме крови по их флюоресценции в серноспиртовом реактиве (Ю. А. Панков, И. Я. Усватова, 1965)**

**Принцип.** Выделенные экстракцией из плазмы крови кортикостероиды, имеющие гидроксилы при 11-м и 21-м углеродных атомах и  $\Delta^4$ -3-кетогруппировку в кольце А, обнаруживают флюоресценцию после обработки проб смесью концентрированной серной кислоты и этилового спирта.

**Реактивы.** 1. Гексан, дважды отогнанный в колбе с дефлегматором.

2. Метилендихлорид или хлороформ (способ очистки хлороформа приводится в рубрике «Реактивы» к методике определения 17-КС по

реакции с метадинитробензолом). Очистка метилендихлорида проводится следующим образом. 1 л метилендихлорида встряхивают в течение суток со 100 мл 1 н раствора едкого натра. После разделения органическую фазу смешивают в течение 2 ч со 100 мл дистиллированной воды, а затем 2 ч—с 200 мл концентрированной серной кислоты. После промывания дистиллированной водой на протяжении часа метилендихлорид обезвоживают 12 ч безводной содой и дважды отгоняют в колбе с дефлегматором. Очищенный таким образом реактив хранят в посуде с притертой пробкой в темноте.

Если предварительная проверка показала, что метилендихлорид достаточно хороший, то его не подвергают указанной обработке, а только дважды перегоняют с дефлегматором; отбирают фракцию, кипящую при  $+48^{\circ}\text{C}$ .

Можно пользоваться и хлороформом для наркоза, поскольку он не нуждается в дополнительной очистке.

3. 0,2 н раствор углекислого натрия.

4. Этиловый спирт, дважды перегнанный.

5. Концентрированная серная кислота, выдерживающая пробу Саваяля.

6. Реактив, вызывающий флюоресценцию кортикостероидов — смесь концентрированной серной кислоты и этилового спирта в отношении 3 : 1.

7. Стандартные растворы гидрокортизона и кортикостерона. Концентрация и соотношение этих гормонов по возможности должны быть близкими к их содержанию в исследуемой плазме крови. При определении 11-оксикортикостероидов в плазме используют две стандартные пробы. Первая в 100 мл раствора содержит 20 мкг гидрокортизона и 5 мкг кортикостерона, вторая — 40 мкг гидрокортизона и 10 мкг кортикостерона. Стандартные пробы готовят следующим образом: навеску кортикостероидов растворяют в 10—15 каплях спирта, объем раствора доводят водой до получения нужных разведений и хранят в холодильнике.

Ход определения. 2,0—2,5 мл крови собирают в пробирку, содержащую гепарин в качестве антикоагулянта. Плазму отделяют от эритроцитов центрифугированием при 3000 об/мин в течение 20 мин. Ее можно держать в холодильнике в течение нескольких дней.

В мерную пробирку с притертой пробкой помещают 1,0 мл плазмы и доливают к ней 3,0 мл гексана. После энергичного встряхивания пробирки в течение 1 мин гексан отсасывают пастеровской пипеткой, соединенной с водоструйным насосом, а остаток гексана удаляют отгонкой в вакууме на водяной бане ( $+40^{\circ}\text{C}$ ). К плазме добавляют 10,0 мл метилендихлорида (или хлороформа) и после встряхивания пробирки на протяжении 1 мин плазму отсасывают тем же способом, что и гексан. Экстракт промывают сначала 0,5 мл раствора карбоната натрия (1 мин), а затем 0,5 мл дистиллированной воды (1 мин), которые также удаляют с помощью пастеровской пипетки, соединенной с вакуумным насосом.

8,0 мл метилендихлоридного (хлороформного) экстракта переносят в чистую пробирку на 15,0—20,0 мл с притертой пробкой, куда доливают 2,5 мл (или другой объем, необходимый для полного заполнения кюветы) смеси концентрированной серной кислоты и этилового спирта (3 : 1), приготовленной перед применением. После встряхивания в течение 1 мин метилендихлорид (хлороформ) удаляют и через час флюоресценцию проб измеряют на флюориметре.

Стандартные пробы выполняют как опытную, используя вместо 1,0 мл плазмы крови по 1,0 мл соответствующих стандартных растворов с концентрацией гидрокортизона и кортикостерона 25 мкг/100 мл (первая проба) и 50 мкг/100 мл (вторая проба).

Для постановки контрольной пробы вместо плазмы крови через всю методику проводят 1,0 мл воды. В качестве контрольной пробы можно пользоваться также чистой кислотнo-этанольной смесью.

Флюориметрия осуществляется при двух длинах волн: 475 нм (для возбуждения флюоресценции) и 530—550 нм (для выделения максимума спектра флюоресценции), что достигается с помощью интерференционных светофильтров.

Расчет производят по формуле:

$$x = \Phi_{\text{оп.}} \cdot \frac{C_{\text{ст.}}}{\Phi_{\text{ст.}}},$$

где  $x$  — определяемая концентрация кортикостероидов в плазме (мкг/100 мл);  $\Phi_{\text{оп.}}$  и  $\Phi_{\text{ст.}}$  — флюоресценция опытной и стандартной проб (число делений показывающего прибора);  $C_{\text{ст.}}$  — концентрация кортикостероидов в одной из двух стандартных проб (мкг/100 мл).

Обычно величину  $\frac{C_{\text{ст.}}}{\Phi_{\text{ст.}}}$  берут средней из всех определений стандартных проб.

Для преобразования размерности мкг/100 мл в мкмоль/л первый показатель умножают на коэффициент 0,0276.

В плазме периферической крови содержится в норме  $21,4 \pm \pm 0,7$  мкг/100 мл (0,590 мкмоль/л) 11-оксикортикостероидов; пределы колебаний составляют от 13 до 23 мкг/100 мл (0,358—0,635 мкмоль/л).

Содержание кортикостероидов в плазме новорожденных очень невелико, в некоторых случаях оно практически не измеримо. Но уже через 3—5 нед после рождения концентрация кортикостероидов в крови детей в основном не отличается от таковой у взрослых. По другим данным, у детей наблюдается несколько более низкий уровень 17-оксикортикостероидов при более высокой концентрации кортикостерона.

У взрослых людей уровень глюкокортикоидов в периферической крови выше, чем у детей. Зависимости содержания 11-ОКС в плазме от возраста не обнаружено.

При оценке величины содержания кортикостероидов в плазме крови необходимо учитывать возраст, пол обследуемых, а также колебания концентрации кортикостероидов в течение дня: при исследовании на протяжении суток более высокие цифры содержания 17-ОКС в плазме получены в утренние часы.

К концу нормально протекающей беременности отмечается увеличение уровня свободных 17-ОКС и неконъюгированных 11-ОКС в 2—4 раза по сравнению с их содержанием у здоровых небеременных женщин. По данным многих исследований, у женщин в третий триместр беременности наблюдается повышение содержания кортикостероидов в плазме до 0,96—1,37 мкмоль/л (35—50 мкг/100 мл). У беременных женщин, в крови которых содержание кортикостероидов достигает 1,37 мкмоль/л (50 мкг/100 мл), введение АКГГ может по-



высить уровень рассматриваемого показателя до 3,04 мкмоль/л (110 мкг/100 мл).

Концентрация 17-ОКС и 11-ОКС в плазме увеличивается в состоянии высокого напряжения (при сильных эмоциональных реакциях, волнении, нервном возбуждении). Так, у больных еще до начала операции наблюдается повышение количества кортикостероидов. В процессе хирургического вмешательства происходит дальнейшее возрастание их уровня. Величина подъема зависит от тяжести и длительности операции. Через сутки или двое после оперативного вмешательства уровень кортикостероидов крови обычно возвращается к норме. Отмечено также, что введение АКТГ сразу после операции вызывает дополнительное повышение уровня кортикостероидов в крови. Резкое возрастание кортикостероидов в крови наблюдается непосредственно перед смертью. Повышение содержания кортикостероидов в крови происходит во время мышечной работы. Максимальное его возрастание, как правило, бывает спустя 1—2 ч после начала работы.

#### *Клинико-диагностическое значение определения кортикостероидов в плазме крови*

Отмечено значительное увеличение концентрации 17-ОКС в плазме при синдроме Иценко — Кушинга, гиперплазии, аденоме, раке коры надпочечников. Синдром Иценко — Кушинга характеризуется высоким содержанием кортикостероидов, достигающим, по данным некоторых авторов, 2,95 мкмоль/л (107 мкг/100 мл). Двустороннее субтотальное удаление надпочечников приводит обычно к снижению уровня кортикостероидов до нормального. При аденобластоме, вирилизующей гиперплазии и вирилизующей опухоли надпочечника содержание как свободных, так и связанных 17-ОКС в плазме крови находится в пределах нормы и введение АКТГ не вызывает существенного подъема уровня последних. Двустороннее субтотальное удаление надпочечников у больных гиперплазией способствует тому, что реакция на АКТГ становится менее выраженной, чем до операции.

При болезни Аддисона, вторичной хронической надпочечниковой недостаточности, а также некоторых формах адреногенитального синдрома уровень 17-ОКС и 11-ОКС в плазме снижается в 2,5—3 раза по сравнению с нормой. У лиц, страдающих болезнью Аддисона, содержание кортикостероидов в крови часто оказывается близким к нулю. Вместе с тем описаны случаи аддисоновой болезни с нормальным содержанием кортикостероидов в крови. У больных с гипопункцией гипофиза и вследствие этого с недостаточностью надпочечников также наблюдается пониженный уровень кортикостероидов.

Уменьшение концентрации 11-ОКС имеет место у больных с неспецифическим инфекционным полиартритом, бронхиальной астмой.

У больных с хроническим гепатитом, циррозом печени, ревматоидным артритом, спондилитом, остеоартритом и подагрой содержание свободных 17-ОКС в плазме близко к норме, конъюгированные же 17-ОКС представлены в очень малых количествах.

Параллельное исследование свободных 17-ОКС в плазме крови и моче дает возможность более полно оценить функциональное со-

стояние коры надпочечников при хронических заболеваниях печени. При тяжелых циррозах экскреция свободных 17-ОКС с мочой повышена, в то время как концентрация их в плазме снижена.

При заболеваниях почек с развитием хронической почечной недостаточности концентрация суммарных 17-ОКС в плазме близка к нормальной, содержание же конъюгатов 17-ОКС значительно снижено. Суточная экскреция с мочой свободных 17-ОКС очень увеличена, что вызвано снижением канальцевой реабсорбции и нарушением процессов связывания 17-ОКС глюкокуроновой кислотой.

Однако не всегда по уровню кортикостероидов в крови можно судить о секреторной деятельности надпочечников. Так, при гипотиреозе и циррозах печени концентрация кортикостероидов в крови может быть нормальной, в то время как экскреция стероидов с мочой сильно понижена.

Таким образом, концентрация кортикостероидов в плазме периферической крови во многом зависит от состояния процессов метаболизма и выведения.

Исследование кортикостероидов в периферической крови является необходимым тестом для осуществления контроля за состоянием коры надпочечников при лечении больных стероидными препаратами. Следует, однако, помнить, что для правильной оценки функции коры надпочечников при данном лечении определение содержания в крови кортикостероидов можно проводить не ранее чем через 5—7 дней после отмены препарата.

## ИССЛЕДОВАНИЕ ОБМЕНА КАТЕХОЛАМИНОВ

К катехоламинам относится группа аминов, в молекулах которых содержится ядро катехола (диоксифенильное кольцо, называемое также пирокатехином, или ортодиоксibenзолом).

Наибольшее биологическое значение среди них имеют три соединения: адреналин [ $\beta$ - (3, 4-дигидроксифенил)- $\beta$ -гидрокси-N-метилэтиламин, метиламиноэтанолпирокатехин, эпинефрин]; норадреналин [ $\beta$ - (3, 4-дигидроксифенил)- $\beta$ -гидрокси-этиламин, аминоэтанолпирокатехин, называемый также артеренолом, или норэпинефрином]; дофамин [ $\beta$ -3, 4-дигидроксифенил-этиламин, окситирамин].

Адреналин уже с начала XX в. известен как гормон мозгового слоя надпочечников. Он синтезируется в особых секреторных клетках — адреналиноцитах хромаффинной ткани, включающей в себя мозговое вещество надпочечников, параганглии, органы Цуккер-кандля.

Норадреналин также вырабатывается в секреторных клетках (норадреналиноцитах) мозгового слоя надпочечников. Значительная часть его метилируется в надпочечниках в адреналин. Другим источником норадреналина является симпатическая нервная ткань, именно с ней связана функция норадреналина как медиатора симпатической нервной системы.

Дофамин — предшественник норадреналина в процессе биосинтеза. Как и норадреналин, он — медиатор симпатической нервной системы. В мозговой ткани основное количество дофамина локализуется в *corpus striatum*, в базальных ганглиях *putamen*, *nucleus caudatus*, *substantia nigra*. В центральной нервной системе дофамин выполняет роль двигательного медиатора. Большое количество дофамина содержится в легких, кишечнике, печени, то есть в органах,

имеющих слабую симпатическую иннервацию. Функциональное значение высокого его содержания в этих тканях остается пока еще не известным.

Основной путь образования катехоламинов в организме следующий: фенилаланин → тирозин → диоксифенилаланин (ДОФА) → дофамин → норадреналин → адреналин.

Содержание катехоламинов в биологических жидкостях невелико. В 1 л плазмы периферической венозной крови здорового человека находится в общей сложности около 1 мкг катехоламинов.

За сутки с мочой экскретируется до 15 мкг (82 нмоль) адреналина, 10—40 мкг (59—236 нмоль) норадреналина, 100—766 мкг (652,8—5000 нмоль) дофамина и 10—110 мкг (50—558 нмоль) ДОФА.

При нормальной функции почек изучение экскреции катехоламинов в ДОФА с мочой является адекватным методом оценки состояния системы катехоламинов — симпато-адреналовой системы. Вот почему способы определения катехоламинов в моче все шире входят в практику клинко-диагностических лабораторий.

Известны биологические, колориметрические, полярографические, хроматографические, флюориметрические и радиоизотопные методы исследования катехоламинов.

Отличающиеся большой чувствительностью и простотой технического исполнения радиоизотопные способы установления катехоламинов основываются на их ферментативном метилировании меченым S-аденозилметионином с последующим измерением радиоактивности метоксипроизводных катехоламинов. Внедрение названных методов в клиническую практику сдерживается дефицитностью некоторых реагентов и необходимостью выполнения специальных радиоизотопных исследований. Более доступны и вместе с тем весьма совершенны флюориметрические способы определения этих гормонов-медиаторов.

Первая группа флюориметрических методов, ведущая свое начало от работ Луида (1949), базируется на образовании триоксинидолов (адренолютина, норадренолютина).

Триоксинидоловый метод считается самым специфичным из всех химических способов установления концентрации катехоламинов, поскольку им исследуют только те диоксифенолы, которые имеют боковую цепь строго определенной конфигурации.

Вторая группа методов, основанная на измерении флюоресценции продуктов конденсации катехоламинов с этилендиамином (Вайль — Малербе, Боне, 1952), является гораздо менее специфичной; многие вещества катехоловой структуры, в частности окситирамин и диоксифенилуксусная кислота, также могут образовывать светящиеся конденсаты. Кстати, это обстоятельство позволило некоторым авторам по разнице между величинами, полученными при работе с этилендиаминовыми и триоксинидоловыми методами, определять дофамин.

Для дифференциации катехоламинов можно использовать как неодинаковую степень их окисления при разных значениях pH, так и различия в максимумах возбуждения и флюоресценции формирующихся при окислении катехоламинов флуорофоров.

Как видно, наиболее чувствительный и специфичный способ дифференцирования и количественного определения катехоламинов — это триоксинидоловый флюориметрический метод, который в приве-

денных нами вариантах применяется в клинико-диагностических лабораториях как унифицированный.

Флюориметрические способы исследования катехоламинов включают 3 этапа: 1) сбор и хранение материала, 2) выделение из него катехоламинов, 3) их дифференцированное количественное определение.

Для стабилизации катехоламинов в крови необходимо соблюдать тщательное ее охлаждение. Мочу собирают в посуду из темного стекла в присутствии консервантов, обеспечивающих сохранение катехоламинов либо благодаря подкислению среды, либо путем предохранения их от окисления.

Из всех известных консервантов наиболее пригодными следует считать кислоты. При содержании подкисленной (до pH 3) мочи в замороженном состоянии в холодильнике катехоламины сохраняются без потерь 2—3 дня.

Для выделения катехоламинов из мочи и очистки их от примесей используют принцип адсорбционной или ионообменной хроматографии. С целью освобождения катехоламинов из связанного состояния (до 60 % норадреналина находится в моче в конъюгированной форме) предварительно применяют этап гидролиза.

Для гидролитического расщепления конъюгатов катехоламинов рекомендуется кипячение мочи при pH 1.

Гидролиз связанных форм катехоламинов можно осуществлять обработкой мочи  $\beta$ -глюкуронидазой и фенолсульфатазой, однако широкого использования этот метод не получил.

В щелочной среде катехоламины хорошо адсорбируются на окиси алюминия ( $Al_2O_3$ ). Высокой адсорбционной способностью по отношению к катехоламинам обладает гидроксид алюминия  $Al(OH)_3$ . При работе с окисью алюминия чаще всего применяют колоночную хроматографию. Наибольший выход добавленных катехоламинов дают образцы окиси алюминия, обработанной кипячением с соляной кислотой (по Брокману), отмытой до нейтральной реакции с последующим ее высушиванием при температуре +120—200° С.

Для полноты адсорбции чрезвычайно важно точно соблюдать pH в пределах 8,2—8,5, причем перед доведением pH необходимо удалить соли тяжелых металлов. Наиболее пригодным для связывания ионов тяжелых металлов и для предотвращения выпадения фосфатов реактивом следует считать эгилендиаминтетрауксусную кислоту, а также ее натриевые или калиевые соли (хелатон, селектон B<sub>2</sub>). Добавление ЭДТА облегчает адсорбцию катехоламинов на окись алюминия и предотвращает их от разрушения в щелочной среде. Выход катехоламинов с обработанной кислотой окиси алюминия, по данным различных авторов, составляет 75—100 %.

Хроматографию на ионообменных смолах также успешно применяют для экстракции и очистки катехоламинов из физиологических жидкостей. При использовании ионообменных смол (амберлитов, дауэксов) анализируемые биологические жидкости обрабатывают в среде с pH около 6,5, то есть в условиях, предохраняющих катехоламины от разрушения.

Элюция катехоламинов с окиси алюминия, дауэксов и эмберлитов осуществляется некоторыми органическими и неорганическими кислотами.

Следующие этапы методов включают превращение катехолами-

нов во флюоресцирующие продукты и, как было отмечено, различаются в триоксинидоловых и этилендиаминовых методах.

Для образования светящихся лютинов (триоксинидоловые методы) в качестве окислителя катехоламинов пригодны красная кровяная соль, двуокись марганца и персульфат калия. При работе с йодом оптимальным является окисление рассматриваемых веществ в течение 30 с, а при работе с красной кровяной солью требуется длительность названного процесса 2—4 мин.

Добавление смеси NaOH и аскорбиновой кислоты завершает эту реакцию, приводя к появлению флюоресцирующих лютинов.

Продукты окисления катехоламинов, способные флюоресцировать (в щелочной среде), быстро разрушаются щелочью. Для их стабилизации применяют раствор аскорбиновой кислоты, который должен быть свежеприготовленным. В присутствии аскорбиновой кислоты аминолютины стабильны примерно час, этого времени достаточно для проведения флюориметрии.

Образующийся при окислении йодом диоксинидол дофамина приобретает свойства флюорофора после осуществления фотохимической реакции. Последнее происходит в результате облучения пробы светом ртутной лампы (максимальная длина волны — 245 нм) в течение 10 мин, а также при нагревании содержимого пробирки в водяной бане при +45° С на протяжении 30 мин или в кипящей водяной бане в течение 40 мин. Последние варианты образования флюорофора более приемлемы, так как они обуславливают проведение реакции в более мягких условиях. К тому же для этого не требуется специальных кварцевых кювет (поскольку кюветы из обычного химического стекла задерживают ультрафиолетовые лучи).

Дифференциация катехоламинов может осуществляться либо за счет способности катехоламинов максимально окисляться при разных значениях pH среды, либо за счет различия в спектральных характеристиках лютинов. Обычно применяют сочетание обоих принципов.

**Определение адреналина и норадреналина в моче флюориметрическим методом после дифференциального окисления катехоламинов йодом при различных значениях pH (В. В. Меньшиков, 1961)**

**Принцип.** Катехоламины выделяются из мочи, доведенной до pH 8,2—8,5, путем колоночной хроматографии с применением в качестве адсорбента окиси алюминия, элюируются 0,25 н раствором уксусной кислоты, дифференцируются окислением йодом при разных значениях pH (4,6 и 7,2). Интенсивность флюоресценции регистрируют на флюориметре.

**Реактивы.** 1. Этилендиаминтетрауксусная кислота или ее двунариевая соль (ЭДТА, трилон Б, хелатон, селектон Б<sub>2</sub>, версен, комплексон III).

2. 2 н раствор серной кислоты. Готовят из фиксанала или путем доведения 27,8 мл концентрированной H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (ρ=1,84 кг/л) до 1 л дистиллированной водой.

3. 1 н раствор едкого натра (получают из фиксанала).

4. Окись алюминия, очищенная по методу Брокмана. 500 г х. ч.

окси алюминия для удаления ионов тяжелых металлов кипятят с соблюдением предосторожности в течение 20 мин с 2 л 2 и раствора соляной кислоты; тщательно встряхивая, охлаждают смесь на воздухе, дают отстояться, сливают надосадочную (пожелтевшую) жидкость в колбу, вливают новую порцию (2 л) соляной кислоты, отстаивают 10 мин и вновь сливают; добавляют к осадку 1 л бидистиллированной воды, переносят смесь на воронку Бюхнера, где окись алюминия промывают бидистиллированной водой до pH промывных вод 6,0. Окись алюминия высушивают в фарфоровой ступке в сушильном шкафу на протяжении 3—4 ч при температуре +120—200 °С. Хранят в темной склянке с притертой пробкой.

Второй способ очистки окиси алюминия — по методу Jorg, Büchner в модификации В. М. Демченко. Окись алюминия (200 г) отмывают в первом цикле 400 мл дистиллированной воды с помощью стеклянной мешалки с электроприводом (скорость — 4000 об/мин) в течение 1 мин, затем 2 мин отстаивают, надосадочную жидкость сливают; для полного отмывания окиси алюминия проводят 12 циклов с дистиллированной водой.

Окись алюминия просушивают в муфельной печи сначала на протяжении 2 ч при температуре +200° С, а затем — 3 ч при +400° С. Выход адреналина при использовании обработанной таким образом окиси алюминия составляет 96 %.

5. Стеклянная вата (применяется в случае, если имеются хроматографические колонки типа «б»). Вату заливают 2 н раствором едкого натра и оставляют на сутки. Затем щелочь сливают, вату несколько раз промывают дистиллированной водой и опять добавляют 2 н раствор соляной кислоты. Через сутки кислоту удаляют, вату отмывают в дистиллированной воде до нейтральной реакции промывных вод, обрабатывают 2 раза бидистиллированной водой и сушат на воздухе. Хранят в склянке с притертой пробкой.

6. Вата хирургическая.

7. Фильтровальная бумага.

8. 0,25 н раствор уксусной кислоты (7,5 г или 8,25 мл ледяной уксусной кислоты на 500 мл раствора).

9. 1 моль/л раствора х.ч. фосфата натрия ( $\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ ). 38 г кристаллической соли растворяют в 175 мл воды. Необходимое для реакции количество фосфата натрия устанавливают эмпирически, после приготвления каждой партии раствора. Для этого собирают 5—10 элюатов мочи, разливают по 2 мл в 2 пробирки. В первую пробирку вносят микропипеткой (под контролем pH-метра) раствор соли до установления pH 4,6, во вторую — до pH среды 7,2. Среднее из 5—10 определений и будет тем количеством раствора фосфата натрия, которое нужно употреблять для получения соответствующего значения pH.

10. Ацетатный буфер, pH 4,6. Смесь 260 мл раствора уксусной кислоты (12,10 г/л) и 240 мл раствора уксуснокислого натрия (27,40 г/л). Буфер держат в холодильнике.

11. Раствор уксуснокислого натрия (500 г/л) с добавлением нескольких капель ледяной уксусной кислоты до pH 7,2.

12. 0,01 н раствор йода. Делают непосредственно перед использованием из 0,1 н раствора. 0,1 н раствор приготавливают из фиксанала.

13. 0,1 н раствор гипосульфита (тиосульфата) натрия (24,8 г соли на 1 л раствора). Предпочтительнее получать из фиксанала.

14. Раствор аскорбиновой кислоты. Готовят непосредственно перед применением (100 мг аскорбиновой кислоты х.ч. на 10 мл раствора). Аскорбиновая кислота пригодна только белого цвета. Хранят в бутылочке из темного стекла.

15. Раствор едкого натра, 300 г/л.

16. Стандартные растворы катехоламинов. Сухие стандартные вещества (адреналин и норадреналин, представленные свободными основаниями, солими виннокаменной кислоты — гидротартратами или хлоридами) держат в эксикаторе, обернутом в черную бумагу, в сухом месте; на дно эксикатора кладут поглотитель — гидрат окиси кальция (гашеную известь) или хлористый кальций. Стандартный раствор 1 с концентрацией катехоламинов 1000 мкг/мл (основной) хранят в холодильнике не более 1 мес в темной посуде. Для его получения 10 мг основания катехоламинов (навески солей рассчитывают по их молекулярной массе) растворяют в бюксе или на часовом стекле в 4—5 каплях концентрированной соляной кислоты, переносят в мерную колбу на 10 мл (или в точно отградуированную пробирку) и доводят до метки бидистиллированной водой.

В день опыта готовят: раствор 2 (5 мкг/мл) — 0,5 мл 1 и соляной кислоты и 0,25 мл раствора 1 доливают до 50 мл бидистиллированной водой;

раствор 3 (0,1 мкг/мл) — 1 мл разведения 2 доводят до 50 мл 0,25 н уксусной кислотой. Этот раствор является рабочим.

17. Универсальная индикаторная бумага.

18. Раствор эозина в концентрации 0,1 мкг/мл. Делают на бидистиллированной воде, полученной в стеклянном бидистилляторе.

Перед работой необходимо подготовить хроматографические колонки, которые бы обеспечивали скорость прохождения жидкости 1—2 мл/мин. Они бывают нескольких модификаций.

Тип «а»: внутренний диаметр колонки — 10 мм, канал длиной 10—15 см, резервуар емкостью 40—50 мл. На дно колонки плотно укладывают хирургическую вату, поверх которой помещают кусочек фильтровальной бумаги и 1 г окиси алюминия (нужное количество окиси алюминия удобнее отмерять, пользуясь одной и той же градуированной пробиркой, по метке на стекле).

Тип «б»: колонка с краном. Внутренний диаметр — 8 мм, длина канала — 17 см, объем резервуара — 50 мл. На дно колонки, над краном, располагают обработанную стеклянную вату, поверх которой насыпают 1 г окиси алюминия.

Тип «в»: колонка с краном. Внутренний диаметр — 12 мм, длина канала — 15 см, объем резервуара — 50 мл. Над краном колонки кладут пористый стеклянный фильтр Шота № 1, на него помещают кусочек фильтровальной бумаги и насыпают 1 г окиси алюминия.

Колонку типа «а» для обеспечения скорости прохождения жидкости нужно соединить с системой, подключенной к вакуумному насосу; устройства колонок типа «б» и «в» дают нужную скорость прохождения жидкости без вакуумного насоса.

Примечание. Мы применяли колонки, которые, будучи без кранов, допускали возможность регулирования скорости прохождения через них растворов. Вакуум в системе создают ртом и поддерживают некоторое время путем пережатия резиновой трубки, связанной с колбой Эрленмейера. С помощью небольшой гребенки (с тремя отростками) можно регулировать ток жидкости сразу в нескольких колонках. Достоинством этого типа колонок является отсутствие в них стеклянного крана (для него требуется смазка вазелином, способным давать неспецифическую флюоресценцию).



**Ход определения.** Перед сбором мочи с целью определения катехоламинов обследуемым пужно за 2—3 дня до анализа исключить из пищи некоторые продукты: бананы, ананасы, сыр, крепкий чай, кофе, а также следующие лекарства: антибиотики тетрациклинового ряда, хинин, хинидин, альдомет, резерпин, исмелин, седуксен, элениум, мелипрамин, психотропные вещества тиазинового ряда, адreno-блокаторы, ингибиторы моноаминоксидазы.

Пациенту необходимо предоставить полный покой (исключить инструментальные исследования, а также факторы, которые могут вызвать физическое или эмоциональное напряжение).

Определение катехоламинов возможно как в суточной, так и в порционной моче. Для расчета требуется точно зафиксировать количество мочи и время, за которое она собрана.

В посуду для сбора суточной мочи добавляют для консервации 2 н раствор серной кислоты из расчета приблизительно 10 мл кислоты на 100 мл мочи (80—100 мл). Порционную мочу измеряют и доливают к ней консервант в указанных пропорциях. Подкисленную мочу можно хранить в холодильнике в течение 2—3 суток.

Для выделения катехоламинов из мочи к 25 мл ее прибавляют 0,5 г ЭДТА и доводят рН до 8,2—8,5 с помощью 1 н раствора NaOH (рН контролируют по индикаторной бумаге). Мочу помещают в колонку (любого образца) с окисью алюминия, предварительно промытую адсорбент 10—15 мл бидистиллированной воды. Если используют колонку с краном, то мочу вливают в нее при закрытом кране. Окись алюминия перемешивают стеклянной палочкой и после ее оседания открывают кран или создают в системе вакуум при применении бескрановых колонок. После прохождения мочи адсорбент вновь промывают бидистиллированной водой (10—15 мл).

Катехоламины элюируют с адсорбента 10 мл 0,25 н раствора уксусной кислоты (двумя порциями по 5 мл), после добавления первой порции перемешивают стеклянной палочкой адсорбент с кислотой.

Элюат разливают по 2 мл в 3 пробирки. Для дифференцирования катехоламинов по кислотности сред в пробирку 2 приливают 1 мл ацетатного буфера и количество реактива фосфата натрия, найденное эмпирически для данной порции раствора ( $\approx 0,2$  мл). Для установления рН 7,2 в пробирку 3 помещают 0,5 мл раствора уксуснокислого натрия и необходимый объем реактива фосфата натрия ( $\approx 0,6$  мл). В пробирках 2 и 3 окисляют катехоламины добавлением 5 капель 0,01 н раствора йода (перемешивают 30 с), через 30 с йод нейтрализуют приливанием 2 капель 0,1 н раствора гипосульфита натрия. Спустя 3—5 мин во все 3 пробирки добавляют для образования лютинов по 5 капель свежеприготовленного раствора аскорбиновой кислоты, по 3 капли раствора едкого натра (реактив 15) и бидистиллированной воды до объема 10 мл (после доливания каждого реактива пробирки тщательно встряхивают!). Объем пробирок доводят до метки «10», затем содержимое проб перемешивают стеклянной палочкой с лопаточкой.

Просмотр проб начинают с пробирки 1, служащей контролем. Раствор помещают в кювету флюориметра (в рассматриваемом случае имеются в виду приборы типа ФМ-1, БИАН-130, Флюм, ЭФ-3 и ЭФ-3М, модифицированные по схеме А. Д. Еснова или А. С. Шарова). При нажатии клавиши прибора проба в кювете освещается ультрафиолетовым светом, который проходит через первичный све-

тофильтр (УФС-3, УФС-6, интерференционный) с максимумом пропускания светового потока при длине волны 365 нм. Вторичный светофильтр (интерференционный или комбинация интерференционного желто-зеленого и обычного голубого) выделяет максимум флюоресценции (538 нм), свет флюоресценции фотоэлемент или фотоумножитель преобразует в электрический ток, который регистрирует чувствительный гальванометр. Разность показаний второй и первой проб соответствует числу делений, приходящихся на флюоресценцию адреналина, а третьей и четвертой — норадреналина (соответствующей одному мл пробы).

Расчет осуществляют по калибровочному графику, построенному с использованием стандартных растворов катехоламинов (стандартные растворы обрабатывают так же, как и опытные пробы). Количество катехоламинов, выделенное за сутки или за 1 мин, вычисляют по формулам:

для отдельных порций мочи:  $(c \cdot 2d')/t = a$  мкг/мин,

для суточного количества мочи:  $c \cdot 2d = a$  мкг/сут или  $c \cdot 2d \cdot 5,458 = a$  нмоль/сут адреналина и  $c \cdot 2d \cdot 5,911 = a$  нмоль/сут норадреналина,

где  $c$  — содержание адреналина или норадреналина (мкг/мл), найденное для данного числа делений по графику;  $d'$  — количество мочи (мл) за определенный период времени (порционная моча);  $d$  — суточное количество мочи (мл);  $t$  — отрезок времени (мин), в течение которого собиралась данная порция мочи; 5,458 и 5,911 — коэффициенты пересчета мкг/сут в нмоль/сут для адреналина и норадреналина соответственно.

Приведенная формула расчета суточной экскреции катехоламинов с мочой приобретает такой вид в результате преобразования следующего отношения:

$$\frac{c \cdot 10 \cdot 10 \cdot d}{2 \cdot 25}$$

где  $c$  и  $d$  — значения, указанные ранее; 2 — количество элюата (мл), взятое в пробу; 25 — моча (мл), взятая в пробу; 10 — общее количество элюата (мл); 10 — общий объем проб по окончании окисления (мл).

Для получения данных к построению калибровочного графика разливают рабочие (стандартные) растворы адреналина и норадреналина в несколько рядов пробирок в таких количествах, чтобы по окончании окисления были следующие концентрации катехоламинов: 0,005 мкг/мл, 0,01 мкг/мл, 0,02 мкг/мл и т. д. Для этого в первые пробирки помещают по 0,5 мл стандартного раствора 3 и по 1,5 мл 0,25 н уксусной кислоты, во вторые — по 1 мл стандартного раствора 3 и по 1 мл 0,25 н уксусной кислоты и т. д. Разливают реактив фосфата натрия и буферные растворы так, как это описано для элюатов мочи, и так же их окисляют.

Пробы просматривают при сравнении их с контрольными (см. ход определения). Для каждой концентрации стандартного раствора берут среднее значение из нескольких определений. Измеряют свечение бидистиллированной воды и раствора эозина в концентрации 0,1 мкг/мл. Показания флюориметра фиксируют. При последующих измерениях после включения прибора его чувствительность устанавливают по бидистиллированной воде или по 0,1 мкг/мл раствора

эозина на величину, найденную при выведении калибровочного графика.

Нормальные величины экскреции составляют для адреналина от 3 до 15 мкг/сут (16,4—82,0 нмоль/сут), в среднем — 7 мкг/сут (38,2 нмоль/сут); для норадреналина — от 10 до 40 мкг/сут (59,0—236,0 нмоль/сут), в среднем — 25 мкг/сут (148,0 нмоль/сут).

**Определение адреналина, норадреналина, дофамина и диоксифенилаланина (ДОФА) в одной порции мочи (Э. Ш. Матлина, З. М. Киселева, И. Э. Софиева, 1965)**

**Принцип.** Катехоламины (адреналин, норадреналин, дофамин) и ДОФА выделяют из мочи путем колоночной хроматографии на окиси алюминия. Катехоламины и почти половину адсорбированного ДОФА элюируют 0,25 н раствором уксусной кислоты. Оставшийся на адсорбенте ДОФА снимают 1 н раствором соляной кислоты. Дифференцирование катехоламинов осуществляют путем их окисления феррицианидом калия с различными значениями рН и различными наборами светофильтров при флюориметрии. Дофамин дифференцируют за счет использования другого окислителя — йода.

**Реактивы.** 1. Этилендиаминтетрауксусная кислота.

2. 2 н раствор соляной кислоты.

3. Окись алюминия, очищенная соляной кислотой по Брокману или Jorg, Büchner в модификации В. М. Демченко (описано в предыдущем методе).

4. 5 н едкий натр.

5. 0,25 н уксусная кислота.

6. 1 н соляная кислота.

7. 0,1 моль/л фосфатного буфера, рН 4,2. 6,8 г  $\text{KН}_2\text{PО}_4$  растворяют в небольшом количестве бидистиллированной воды и доводят объем до 500 мл в мерной колбе, затем добавляют несколько капель 1 н соляной кислоты.

8. 0,1 моль/л фосфатного буфера, рН 6,2: а) готовят раствор однозамещенного фосфата калия (см. п. 7), б) получают раствор двузамещенного фосфата натрия — 35,8 г  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  на 1 л раствора.

Смешивают 60 частей раствора «а» и 20 частей раствора «б».

Буферные растворы хранят в холодильнике не более недели.

9. Феррицианид калия х. ч. (красная кровяная соль). Перед употреблением из него получают раствор в концентрации 0,25 г/100 мл.

10. Раствор 0,2 г/100 мл аскорбиновой кислоты на 5 н едком натре (щелочной аскорбинат натрия). Готовят перед использованием.

11. 0,02 н водный раствор йода. Делают перед применением из 0,1 н раствора. 2,0 мл 0,1 н раствора йода, приготовленного из фиксанала, доводят бидистиллированной водой до объема 10 мл.

При отсутствии фиксанала 0,02 н раствор йода можно получить путем растворения 254 мг йода и 5 г йодистого калия в 5 мл воды с последующим доведением водой объема до 100 мл.

12. 5 н раствор уксусной кислоты (получают из х. ч. ледяной уксусной кислоты в зависимости от ее плотности).

13. Сульфит натрия х. ч. кристаллический ( $\text{Na}_2\text{SO}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ). Пе-

ред использованием делают два раствора. 500 мг сульфита натрия смешивают с 1 мл воды — водный сульфит; 500 мг сульфита натрия растворяют в 1 мл воды и доводят до 10 мл 5 н едким натром — щелочной сульфит.

14. Стандартные растворы адреналина, норадреналина и дофамина. Основные растворы готовят так же, как и в предыдущем методе. Из них путем двух последовательных разведений получают стандартный рабочий раствор 3 для адреналина, норадреналина и ДОФА с концентрацией 1,0 или 0,8 мкг/мл на бидистиллированной воде. Для дофамина раствор 3 имеет концентрацию 1 мкг/мл.

15. 1 н раствор  $\text{NH}_4\text{OH}$  (15,3 мл концентрированного аммиака на 100 мл раствора).

16. Универсальная индикаторная бумага.

17. Обеззоленные бумажные фильтры.

Для флюориметрического определения необходимы следующие наборы светофильтров:

I набор: первичный светофильтр с максимумом пропускания светового потока при длине волны 436 нм, вторичный (типа ЖС-18) с широким максимумом пропускания светового потока, начиная от 550 нм (для адреналина и норадреналина).

II набор: первичный светофильтр с максимумом пропускания 360 нм (УФС-3), вторичный — тот же, что и в I наборе (для адреналина, норадреналина и ДОФА).

III набор: первичный светофильтр — 360 нм, вторичный — 436 нм (для дофамина).

**Примечание.** В своей работе суммарную флюоресценцию адреналина, норадреналина и ДОФА мы вызывали светом с длиной волны 365 нм (спектральная линия ртутной лампы), выделенной интерференционным светофильтром с соответствующим максимумом пропускания светового потока. Для измерения флюоресценции использовали вторичный интерференционный светофильтр с максимумом пропускания светового потока при длине волны 526 нм.

При выборе светофильтров для регистрации флюоресценции производного дофамина (5,6-диоксииндола) мы, исходя из анализа его спектров возбуждения, а также указаний В. Л. Кардашева и других авторов, в качестве первичного применяли светофильтр УФС-2, скрещенный с ВС-12 (для отсеивания ультрафиолетовой области спектра до 240 нм), вторичным служил сине-голубой светофильтр с широким максимумом пропускания — 420—440 нм.

**Ход определения.** Собирают и хранят мочу так же, как и в предыдущем методе. Мочу фильтруют через бумажный фильтр. Отмеряют мерным цилиндром 17,5 мл фильтрата и добавляют к нему 250 мг ЭДТА, рН мочи доводят до 8,2—8,5.

Для адсорбции готовят хроматографическую колонку, на дно которой кладут стеклянную вату (с целью задержки окиси алюминия) и 1,0 г окиси алюминия. Через колонку пропускают 10 мл воды. Скорость прохождения мочи должна составлять 1—2 мл в мин. Затем через колонку проводят 7,0 мл воды с одной каплей 0,5 н раствора аммиака. Остатки промывных вод удаляют с конца колонки кусочком фильтровальной бумаги.

Элюцию осуществляют в два этапа. Вначале ее проводят 0,25 н уксусной кислотой; при этом с адсорбента снимается адреналин, норадреналин, дофамин и частично ДОФА (в среднем 45 %); затем — 1 н соляной кислотой, которая элюирует оставшееся количество ДОФА. Уксуснокислый элюат получают двумя порциями по 3,5 мл каждая. После доливания первой порции при закрытом крае колонки стеклянной палочкой перемешивают окись алюминия и

дают ей осесть. Кран открывают и элюат собирают в ту же пробирку без помешивания.

Последнюю элюцию осуществляют 1 н соляной кислотой также двумя порциями по 1,75 мл каждая. После добавления первой порции осадок перемешивают. Элюаты можно держать в холодильнике не более одного дня.

Для окисления с образованием флуоресцирующих продуктов необходимо следующее. Уксуснокислый элюат доводят до pH 4,2 1—2 каплями 1 н аммиака и затем отбирают по 1,0 мл в контрольные и опытные пробы, содержащие по 1,0 мл фосфатного буфера с pH 4,2. Оставшееся количество элюата подщелачивают до pH 6,2, учитывают объем аммиачного реактива (15), пошедшего на титрование, и в две пробы наливают количество раствора, соответствующее 1,0 мл элюата. В эти пробы предварительно помещают по 1,0 мл фосфатного буфера с pH 6,2.

Солянокислый элюат также доводят 1 н аммиаком до pH 6,2 в мерных пробирках, затем добавляют воды до 7,0 мл. Из этих растворов в опытную и контрольную пробы отбирают по 1,0 мл, предварительно налив в них по 1,0 мл фосфатного раствора с pH 6,2. Три полученные опытные пробы (уксуснокислого элюата с pH 6,2 и 4,2 и солянокислого элюата) окисляют 0,1 мл реактива феррицианида калия в течение 4 мин (контрольные пробы не окисляют) и затем добавляют как в опытные, так и в контрольные пробы по 1,0 мл щелочного аскорбината.

Через 3 мин все пробы доводят водой до 10,0 мл, а в контрольные доливают по 0,1 мл раствора феррицианида калия. Для большей стабилизации флуоресценции опытные и контрольные пробы в период измерения флуоресценции охлаждают на льду.

Для измерения флуоресценции и расчета содержания адреналина, норадреналина и ДОФА ставят 1 набор светофильтров (из первичного на 436 нм и вторичного на 550 нм) и просматривают контрольные и опытные пробы с pH 4,2 и 6,2, содержащие адреналин, норадреналин и уксуснокислый ДОФА. В этих условиях флуоресцируют при pH 4,2 только адреналин, при pH 6,2—адреналин и норадреналин. Затем меняют первичный светофильтр на УФС-3 и просматривают пробы с pH 6,2, содержащие адреналин, норадреналин и ДОФА (в этих условиях флуоресцируют все вещества), и пробы солянокислого элюата, окисленного при pH 6,2. Регистрируют разницу показаний флуоресценции опытных и контрольных проб.

$$\text{Экскреция адреналина (мкг/сут)} = \frac{6 \cdot 7 \cdot 10 \cdot d}{E \cdot 17,5 \cdot 1000},$$

где 6 — флуоресценция адреналина в 1 мл измеряемой пробы; E — флуоресценция 1 нг адреналина в 1 мл пробы (этот показатель находят при калибровке прибора); 7 — количество элюата (мл); 10 — разведение элюата при окислении; d — суточное количество мочи (мл); 17,5 — количество мочи в опытной пробе (мл); 1000 — коэффициент для перевода из нг в мкг.

**Примечание.** Для перевода размерности из мкг/сут в нмоль/сут лучшее по приведенной формуле значение экскреции адреналина умножают на 5,458.

После соответствующих сокращений формула приобретает следующий вид:

Экскреция адреналина:  $\frac{6 \cdot 4 \cdot d}{E \cdot 1000} = a$  мкг/сут, или

$$\frac{6 \cdot 4 \cdot d \cdot 5,458}{E \cdot 1000} = a \text{ нмоль/сут.}$$

Экскреция норадреналина:  $\frac{8 \cdot 4 \cdot d}{E \cdot 1000} = a$  мкг/сут, или

$$\frac{8 \cdot 4 \cdot d \cdot 5,911}{E \cdot 1000} = a \text{ нмоль/сут,}$$

где 8 (14—6) — флюоресценция норадреналина (при рН 4,2 и 6,2 в условиях метода свечение адреналина одинаково);  $E_1$  — флюоресценция 1 нг норадреналина в условиях опыта.

Флюоресценцию ДОФА уксуснокислого (x) рассчитывают следующим образом (в данном примере):

$$x = 32 - \left( \frac{6 \cdot E_2}{E} + \frac{8 \cdot E_3}{E_1} \right),$$

где 32 — флюоресценция адреналина, норадреналина и ДОФА уксуснокислого (при светофильтрах 360—550 нм);  $E_2$  — флюоресценция 1 нг/мл стандартного раствора адреналина с рН 6,2 и при светофильтрах 360—550 нм;  $E_3$  — флюоресценция 1 нг/мл стандартного раствора норадреналина с рН 6,2 и при светофильтрах 360—550 нм.

Общая флюоресценция ДОФА (уксуснокислый и солянокислый элюаты) равна  $12+x$ .

Экскреция ДОФА =  $\frac{(12+x) \cdot 4 \cdot d}{E \cdot 1000} = a$  мкг/сут, или

$$\frac{(12+x) \cdot 4 \cdot d \cdot 5,071}{E \cdot 1000} = a \text{ нмоль/сут,}$$

где  $E_4$  — флюоресценция 1 нг/мл ДОФА с рН 6,2 и при светофильтрах 360—550 нм; 12 — флюоресценция (в делениях шкалы прибора) ДОФА солянокислого.

**Определение дофамина.** Для исследования дофамина количество уксуснокислого элюата, доведенного до рН 6,2 и соответствующее 1,0 мл исходного элюата, добавляют к 0,5 мл фосфатного буфера с рН 6,2 в опытную и контрольную пробы. Объем доводят водой до 3,5 мл и окисляют каждую пробу 0,2 мл 0,02 н йода в течение 4 мин. Затем к опытной пробе доливают 0,5 мл щелочного сульфита, а в контрольную вносят 0,45 мл раствора щелочи. Через 7 мин во все пробы помещают по 0,7 мл 5 н уксусной кислоты и содержимое пробирок тщательно взбалтывают.

Пробы облучают кварцевой лампой на протяжении 15 мин или прогревают в водяной бане при температуре +45 °С в течение 30 мин и после добавления в контрольные пробы по 0,05 мл водного сульфита измеряют флюоресценцию раствора в кварцевой кювете. По нашему мнению, более предпочтителен вариант обработки проб с прогреванием в водяной бане. Для измерения флюоресценции используют первичный светофильтр с максимумом пропускания светового потока при длине волны 360 нм и вторичный, имеющий максимум пропускания светового потока при длине волны 436 нм.

Разница между величинами свечения опытной и контрольной проб представляет собой флюоресценцию, обусловленную суммарным свечением дофамина и ДОФА (в уксуснокислом элюате). Допустим, что она равна 20 делениям. Флюоресценцию ДОФА в условиях оп-ределения дофамина (окисление йодом и регистрация при свето-фильтрах 360—436 нм) рассчитывают по формуле:

$$\frac{x \cdot E_4}{E_5 \cdot 1000},$$

где  $x$  — указанная ранее флюоресценция ДОФА уксуснокислого при окислении его феррицианидом калия (светофильтры 360—550 нм);  $E_4$  — свечение 1 нг/мл ДОФА в тех же условиях;  $E_5$  — флюоресцен-ция 1 мкг/мл ДОФА при окислении йодом (светофильтры 360—436 нм); 1000 — коэффициент для перевода из нг в мкг.

Тогда на долю дофамина (в нашем примере) приходится:

$$20 - \frac{x \cdot E_4}{E_5 \cdot 1000} \text{ делений.}$$

Экскреция дофамина:

$$\frac{\left(20 - \frac{x \cdot E_4}{E_5 \cdot 1000}\right) \cdot 7.5 \cdot d}{E_6 \cdot 17.5} = a \text{ мкг/сут,}$$

где  $E_6$  — флюоресценция 1 мкг/мл стандартного раствора дофамина, окисленного йодом при светофильтрах 360—436 нм; 5 — разведение элюата при окислении.

**Примечание.** Для изменения размерности мкг/сут в нмоль/сут по-лученный результат умножают на коэффициент 6,528.

Если исследование проводят в порционной моче, то полученный резуль-тат необходимо разделить на время в мин (ответ получают в мкг (нмоль)/мин).

Для построения калибровочного графика на каждую пробу бе-рут 2 пробирки (опытную и контрольную), в которые разливают стандартные растворы адреналина, норадреналина и ДОФА в таких количествах, чтобы концентрация веществ по окончании окисления была равной 20, 10 и 5 нг/мл. Для каждой концентрации делают не-сколько параллельных проб. Недостающее до 2 мл количество до-полняют буферным раствором с рН 4,2 и 6,2. Далее пробы окисля-ют феррицианидом калия, как описано выше, и просматривают при тех же наборах светофильтров. Должны быть получены приблизи-тельно такие результаты: 1) 1 нг/мл адреналина при рН 4,2 и 6,2 и светофильтрах 436—550 и 360—550 нм дает примерно одинаковую флюоресценцию;

2) флюоресценция норадреналина с рН 4,2 незначительна, с рН 6,2 и при светофильтрах 436—550 нм — почти в 2 раза меньше аналогичного показателя адреналина, а при светофильтрах 360—550 нм — равна ей;

3) интенсивность флюоресценции ДОФА при окислении ферри-цианидом калия с рН 6,2 и светофильтрами 360—550 нм приблизи-тельно в 2 раза меньше таковых адреналина и норадреналина в тех же условиях.

Стандартные растворы дофамина и ДОФА разливают в 2 про-бирки (опытную и контрольную) в количествах: 1,0 мл, 0,5 мл,



0,25 мл, соответствующих концентрациям 0,2 мкг/мл, 0,1 мкг/мл, 0,05 мкг/мл; недостающий объем до 1,0 мл дополняют буфером с рН 6,2.

Пробы окисляют йодом так же, как описано выше, и регистрируют флюоресценцию при светофильтрах 360—436 нм. Рассматриваемые показатели люминесценции дофамина и ДОФА близки. Примерные величины свечения для 0,2 мкг/мл пробы — 15—18 делений для дофамина и 11—13 делений для ДОФА (если измерять флюоресценцию на приборе типа ФМ-1, ФЛЮМ, ИФ-1, БИАН-130 и на модифицированных по схеме А. Д. Есикова и А. С. Шарова приборах типа ЭФ-3, ЭФ-3М).

Нам кажется, что удобнее делать расчет не на 1 мл пробы, а на содержимое всей пробы (пример этого расчета мы приводим ниже). В нашем флюориметре использовались стандартные прямоугольные кварцевые кюветы от спектрофотометра типа СФ-4 (СФ-4А, СФ-16, СФ-26) общим объемом 4 мл. Поэтому при окислении элюата мы добавляли всего лишь 1 мл бидистиллированной воды в пробирку, содержащую 1,0 мл фосфатного буфера, 1 мл элюата и 1 мл раствора аскорбиновой кислоты. Вместе с 0,1 мл раствора феррицианида калия общий объем пробы составил 4 мл. Очевидно, в каждом конкретном случае определения целесообразнее применять тот общий объем раствора, который соответствует кювете флюориметра (если она рассчитана на 10,0 мл, лучше всего использовать 10 мл окисленного раствора, если на 7,0 мл — 7 мл раствора и т. д.).

Рассчитывать содержание адреналина, норадреналина и ДОФА в уксуснокислом элюате можно путем решения трех уравнений с тремя неизвестными:

$$M_{4,2}^1 = 0,25 \cdot A; \quad M_{6,2}^1 = 0,25 \cdot A + 0,1 \cdot \text{НА};$$

$$M_{6,2}^2 = 0,24 \cdot A + 0,24 \cdot \text{НА} + 0,12 \cdot \text{Д}; \quad N_{6,2}^2 = 0,12 \cdot \text{Д}.$$

В этих уравнениях  $M_{4,2}^1$ ,  $M_{6,2}^1$ ,  $M_{6,2}^2$  соответственно обозначают показания флюориметра для уксуснокислого элюата, измеренные при первом наборе светофильтров с рН 6,2 и 4,2 и при втором наборе светофильтров с рН 6,2. Цифры соответствуют показаниям флюориметра для 1 нг (нанограмма) адреналина, норадреналина и ДОФА в опытной пробе.

В солянокислом элюате определяют содержание ДОФА (Д) по данной выше формуле, где  $N_{6,2}^2$  — показание флюориметра для солянокислого элюата с рН 6,2, измеренное при втором наборе светофильтров; Д — искомое содержание ДОФА (нг) в опытной пробе; 0,12 — показание флюориметра для 1 нг ДОФА в опытной пробе. Приведенные коэффициенты — величины, найденные Э. Ш. Матлишой с сотр. для использованного ими метода. В наших условиях определения были получены другие коэффициенты. Вполне понятно, что эти цифры могут быть применены только для иллюстрации способа расчета. Путем суммирования содержания ДОФА в уксуснокислом и солянокислом элюатах рассчитывают общее содержание:

$$A_{\text{ит}} = \frac{M_{4,2}^1}{0,25}; \quad M_{6,2}^1 = A_{\text{ит}} + 0,1 \cdot \text{НА};$$

$$M_{6,2}^1 = M_{4,2}^1 + 0,1 \cdot \text{HA};$$

$$M_{6,2}^1 - M_{4,2}^1 = 0,1 \cdot \text{HA}; \quad 0,25 \cdot A = X;$$

$$\text{HA} = \frac{M_{6,2}^1 - M_{4,2}^1}{0,1}; \quad M_{6,2}^1 - X = 0,1 \cdot \text{HA};$$

$$M_{6,2}^2 = 0,24 \cdot A \text{ (т. е. Y)} + 0,24 \cdot X \text{ (т. е. Z)} + 0,12 \cdot \text{Д};$$

$$M_{6,2}^2 - Y - Z = 0,12 \text{ Д}; \quad \text{Д} = \frac{M_{6,2}^2 - Y - Z}{0,12};$$

$$\text{Д}_{\text{сол.}} = \text{H}_{6,2}^2 / 0,12; \quad \text{Д} = \text{Д}_{\text{укс.}} + \text{Д}_{\text{сол.}};$$

$$Q - 0,011 \cdot \text{Д (т. е. В)} = 0,015 \cdot \text{ДА, или } Q - \text{В} = 0,015 \cdot \text{ДА};$$

$$\text{ДА} = \frac{Q - \text{В}}{0,015}.$$

$Q - \text{В} = 0,015 \cdot \text{ДА}$ , где 0,011 и 0,015 — коэффициенты, найденные для ДОФА (Д) и дофамина (ДА) в соответствующих условиях определения; Q — показания флюориметра.

Формула расчета (общая):

$$K A_{\text{в моче}} = \frac{K A_{\text{в пробе}} \cdot 0,4 \cdot \text{Д}}{1000} = a \text{ мкг/сут},$$

где  $K A_{\text{в моче}}$  — суточная экскреция с мочой адреналина, норадреналина, дофамина и ДОФА, выраженная в мкг (мкг/сут);  $K A_{\text{в пробе}}$  — рассчитанное по приведенным формулам содержание в пробе адреналина, норадреналина, дофамина и ДОФА (нг); 0,4 — коэффициент, получаемый делением 7 (общий объем пробы, мл) на 17,5 (объем взятой на анализ мочи — мл); Д — диурез (мл); 1000 — коэффициент перевода нг в мкг (в 1 мкг — 1000 нг).

Например, в случае определения адреналина формула для расчета суточной экскреции этого катехоламина примет вид:

$$\frac{A \cdot 0,4 \cdot \text{Д}}{1000} = \text{мкг/сут},$$

где A — содержание адреналина в пробе (нг), найденное по одной из вышеприведенных формул.

**Примечание.** Для выражения суточной экскреции адреналина, норадреналина, дофамина и ДОФА в нмоль/сут в числитель помещенной выше формулы вносят коэффициенты, которые соответственно составляют 5,458 (для адреналина), 5,911 (для норадреналина), 6,528 (для дофамина), 5,071 (для ДОФА).

Катехоламины и ДОФА у здоровых людей экскретируются в следующих количествах (пределы колебаний): адреналин — 2,2—8 мкг/сут (12,0—43,7 нмоль/сут), норадреналин — 8—100 мкг/сут (47,3—591,0 нмоль/сут), дофамин — 112—450 мкг/сут (730—2930 нмоль/сут; 0,730—2,930 мкмоль/сут), ДОФА — 8—111 мкг/сут (40,4—563,0 нмоль/сут).

При исследовании 62 практически здоровых людей мы получили показатели, полностью соответствующие приведенным литературным данным. Так, экскреция ДОФА составила  $56 \pm 2,29$  мкг/сут (282 нмоль/сут), дофамина —  $252,30 \pm 0,25$  мкг/сут (1640 нмоль/сут; 1,64 мкмоль/сут), норадреналина —  $27,51 \pm 1,29$  мкг/сут (162 нмоль/сут), адреналина —  $6,55 \pm 0,25$  мкг/сут (35,8 нмоль/сут).

## МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ МЕТИЛИРОВАННЫХ ПРОДУКТОВ ОБМЕНА КАТЕХОЛАМИНОВ В МОЧЕ

Главными конечными продуктами биологической и биохимической инактивации адреналина, норадреналина и дофамина является 3-метокси-4-гидроксиминдальная (ванилил-миндальная кислота, ВМК) и 3-метокси-4-гидроксифенилуксусная кислота (гомованилиновая кислота, ГВК). Эти метаболиты образуются при оксиметилировании и окислительном дезаминировании катехоламинов.

Методы их исследования включают следующие этапы: 1) сбор материала, 2) гидролиз и экстракцию, 3) разделение метаболитов, 4) количественное определение.

Сбор материала и гидролиз мало чем отличаются от описанных для катехоламинов.

Экстракцию проводят чаще всего этилацетатом. Для дальнейшего электрофоретического или хроматографического исследований этилацетатный экстракт обычно выпаривают досуха в легком токе воздуха при  $+40-50^{\circ}\text{C}$ .

Электрофорез мочевых продуктов обмена катехоламинов осуществляют в буферах с малой ионной силой: либо в пиридиновом (пиридин — уксусная кислота — вода = 30:4:996), либо в ацетатном буфере с pH 6,0 (5 мл ледяной уксусной кислоты и 995 мл воды).

Применяют высоковольтный электрофорез с напряжением 2000 (Штудниц, Хансон, 1959), 1900—2000 (Цайсель, 1961), 2500—3000 (Июшинага, Итон с соавт., 1961), 5000 В (В. С. Камышников, 1971), с силой тока соответственно 100, 35—60, 8—12, 4—6 мА на полосу.

Длительность электрофоретического разделения варьирует от 1,5 до 3 ч. Необходимо охлаждение полос хроматографической бумаги до температуры  $+4^{\circ}-0^{\circ}\text{C}$ .

Клайн и Чернаик (1961) проводили электрофоретическое разделение с силой тока 0,5 мА на ленту в течение 17 ч, с напряжением 300—400 В. Ванилил-миндальная кислота в условиях последнего метода продвигается от места нанесения примерно на половину пути к аноду.

Методы тонкослойной хроматографии пока еще не нашли широкого практического применения в клинике.

Количественное установление метаболитов катехоламинов производят различными способами. Для выявления этих веществ на хроматограммах и фореграммах используют способность их образовывать ярко окрашенные соединения с диазотированным р-нитроанилином, диазотированной сульфаниловой кислотой, 2,6-дихлорхинохлорамином. Окрашенные пятна затем элюируются и исследуются спектрофотометрически. Элюцию диазосоединений после обработки р-нитроанилином чаще всего осуществляют метанольной щелочью, спектрофотометрирование ведут при 520—550 нм.

Как кислые, так и основные метаболиты могут быть подвергнуты окислению перйодатом натрия или феррицианидом калия, в результате чего 90—100 % этих продуктов переводится в ванилин, оптическую плотность которого затем измеряют спектрофотометрически при 350—360 нм.

Некоторые авторы денситометрируют хроматограммы и фореграммы с последующим планиметрическим исследованием денситограмм.

При изучении многих из описанных методик (с помощью доступных нам приборов и реактивов) создается впечатление, что из всех способов разделения продуктов обмена катехоламинов в моче наиболее быстрым и поэтому наиболее удобным для клинико-диагностических лабораторий является высоковольтный электрофорез. Он дает возможность провести определение с начала до конца в течение одного рабочего дня. Методом электрофореза гораздо четче выделяется фракция ванилил-миндальной кислоты. В то же время при отсутствии специального аппарата для высоковольтного фореза можно применять электрофорез и при более низком напряжении — порядка 300—400 В. В этом случае результаты исследования могут быть получены на вторые сутки.

### Определение ванилил-миндальной кислоты с использованием электрофореза на бумаге (В. В. Меньшиков, Т. Д. Большакова, 1966)

**Принцип.** Содержащиеся в моче фенольные кислоты экстрагируют уксусно-этиловым эфиром, этилацетат упаривают, сухой экстракт растворяют в небольшом объеме абсолютного этанола и наносят на полосу хроматографической бумаги для электрофоретического разделения. Пятно ВМК выявляют окраской диазотированным р-нитроанилином, элюируют метанольной щелочью и проводят колориметрическое определение фракции.

**Реактивы.** 1. 3 п HCl и 1 и HCl (из фиксаналов).

2. Этилацетат.

3. Насыщенный раствор NaCl.

4. Абсолютный этанол.

5. Раствор для электрофореза, рН 6,0 (готовят доведением дистиллированной водой 5 мл ледяной уксусной кислоты до 1 л в мерной колбе).

6. Диазотированный паранитроанилин:

а) смесь, состоящая из 0,5 г р-нитроанилина, 10 мл концентрированной HCl и 490 мл воды (получают при нагревании). Для приготовления раствора берут бюкс, в котором на аналитических весах взвешивают нужное количество р-нитроанилина, вливают туда соответствующий объем концентрированной соляной кислоты и устанавливают бюкс на горячую плитку (работу проводить под тягой), растворяя р-нитроанилин энергичным помешиванием содержимого стеклянной палочкой. После полного растворения содержимое бюкса переносят в мерную колбу (через стеклянную воронку, многократно обмывая водой внутренние стенки бюкса). Раствор хранят в холодильнике;

б) раствор  $\text{NaNO}_2$ — 2 г/л (держат в холодильнике);

в) раствор  $\text{K}_2\text{CO}_3$ — 100 г/л (хранят в холодильнике).

Перед использованием делают смесь холодных растворов: 1 объем (а) + 1 объем (б), через 4—5 мин — 2 объема (в). Смесь годна 1,5 мин (см. примечания к методике определения ВМК).

7. Раствор метанольной щелочи. Готовят перед употреблением из расчета 4 мл на пробу путем сливания 2 частей метанола и 1 части раствора  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  концентрации 20 г/л (см. примечания к методике определения ВМК).

8. Стандартный раствор ВМК. Основной водный раствор с концентрацией 100 мкг в 1 мл. Для построения калибровочной кривой 0,01; 0,02; 0,03; 0,04 мл этого раствора, содержащего соответственно 1; 2; 3; 4 мкг стандарта, проводят через все этапы методики (допускается наносить навеску ВМК сразу же на полосы хроматографической бумаги).

Ход определения. Для исследования отбирают 1 мл мочи в пробирку или колбочку с притертой пробкой. С помощью 1 н НСl доводят пробы до рН 1,0, для очистки от примесей добавляют 1 мл насыщенного раствора NaCl.

ВМК экстрагируют двумя порциями этилацетата по 4 мл, каждый раз встряхивая содержимое пробирки (колбочки) в течение 1 мин, и дают отстояться 20 мин. Этилацетатный слой оба раза сливают в другую колбочку и затем высушивают досуха в легком токе воздуха в водяной бане при +40—50 °С.

Сухой остаток растворяют в 0,2 мл абсолютного этанола (двумя порциями по 0,1 мл, обмывая стенки колбочки) и переносят микропипеткой на ленту из хроматографической бумаги (ширина ее — 4 см, длина — 43 см) на участок шириной в 1 см, в 13,5—14,5 см от катодного конца ленты.

Лента предварительно должна быть смочена раствором уксусной кислоты (реактив 5) и натянута в аппарате для электрофореза. Разделение проводят в камерах отечественного производства в ацетатном растворе (сила тока — 1 мА, напряжение — 380—420 В, длительность — 18 ч). Через 18 ч ленты фиксируют в течение 30 мин в сушильном шкафу при +80 °С, опрыскивают свежеприготовленным красителем — диазотированным р-нитроанилином. Затем сушат на воздухе на протяжении 1—2 ч. Ванилил-миндальная кислота проявляется в виде фиолетовой полоски в 12—14 см от места нанесения к аноду. Эту полоску вырезают, помещают в пробирку и элюируют в течение часа (за это время 2—3 раза следует энергично встряхнуть пробы) 4 мл метанольной щелочи.

Затем производят спектрофотометрию пурпурного элюата ВМК при 520 нм или его фотоэлектроколориметрию на ФЭКе с зеленым светофильтром. В обоих случаях используют кюветы с толщиной слоя 10 мм.

В качестве контрольного применяют элюат из опрысканного кусочка ленты шириной в 1 см, не содержащего фракций мочи.

Показатели контрольной пробы вычитают из показателей опытной, по калибровочной кривой определяют количество ВМК (мкг) в 1 мл исследуемой мочи и полученный результат умножают на цифру диуреза (мл). Содержание ВМК в моче выражают в мкмоль/сут (мг/сут) или (что удобнее для отдельных порций мочи) в нмоль (мкг) на мг креатинина.

Этим методом обнаруживается 88,1 % добавленного к пробам мочи стандарта, расхождение параллельных проб в среднем составляет +3,79 %.

Нормальные величины экскреции ванилил-миндальной кислоты — 3,53—19,2 мкмоль/сут (0,7—3,8 мг/сут), в среднем — 10 мкмоль/сут ( $1,92 \pm 0,17$  мг/сут), или 3,03—15,1 нмоль (0,6—3,0 мкг), в среднем — 9 нмоль ( $1,77 \pm 0,15$  мкг) на мг креатинина.

Метод определения в моче ванилил-миндальной,  
5-оксииндолуксусной кислот  
и тирамина (В. С. Камышников, 1971)

**Принцип.** После приготовления этанольного экстракта фенольных кислот часть раствора наносят на полосу хроматографической бумаги для определения ВМК методом высоковольтного электрофореза, а в оставшемся количестве экстракта исследуют 5-оксииндолуксусную кислоту (5-ОИУК) путем добавления к нему реагентов на этот метаболит. Освобожденный от кислых продуктов остаток мочи используют для установления в нем тирамина флюориметрическим методом.

Реактивы для определения ВМК описаны в предыдущем методе, приготовление остальных реагентов дано в методе определения 5-ОИУК в моче.

**Ход определения.** Для исследования в пробирку отбирают 1,5 мл мочи (рН 1) из суточного ее количества, добавляют 1,5 мл насыщенного раствора NaCl. Экстракцию производят дважды порциями этилацетата по 4 мл со встряхиванием пробирки в течение 1 мин. После каждой экстракции верхний прозрачный этилацетатный слой помещают в широкую пробирку с пробкой, через которую под давлением продувают воздух. Затем в той же пробирке выпаривают экстракт на водяной бане при температуре + 47 °С, на что требуется около 10 мин.

Сухой остаток растворяют в 0,15 мл абсолютного этанола при тщательном смывании стенок пробирки. Из этого объема сразу же отсасывают микропипеткой 0,05 мл раствора и наносят по середину подготовленной (предварительно смоченной буфером и отжатой) полосы хроматографической бумаги «Ленинградская быстрая» длиной 46 см и шириной 4 см (можно использовать и бумагу других марок).

Электрофорез проводят в растворе уксусной кислоты ионной силы 0,25, рН 3, с градиентом потенциала 100 В/см и силой тока 1,0—1,5 мА/см на протяжении 1,5 ч. Температура пластины, охлаждающей бумажные полосы, при этих параметрах тока не должна превышать +14 °С.

После проявления фракций диазотированным р-нитроанилином и высушивания фореграмм в токе воздуха, нагретого до +80 °С, ванилил-миндальную кислоту, выявляемую по стандартному веществу в виде полоски фиолетового цвета, элюируют метанольной щелочью и проводят спектрофотометрию (или колориметрию на микрофотометре типа МКМФ-1) при длине волны 525 нм. Для контроля элюируют метанольной щелочью часть опрысканного красителем чистого участка фореграммы. Показатели контроля вычитают из показателей проб опыта.

В остатке экстракта определяют 5-ОИУК. Для этого к нему добавляют 2,9 мл дистиллированной воды, 0,3 мл этанольного раствора  $\alpha$ -нитрозо- $\beta$ -нафтола (0,1 г/100 мл) и 0,3 мл нитрозокислотного реактива (приготавливают перед использованием из расчета 0,2 мл раствора  $\text{NaNO}_2$ —2,5 г/100 мл на 5 мл 1 н  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ). После прогревания пробы в течение 7 мин на водяной бане (на той же, которую применяют для получения сухих экстрактов) и удаления избытка  $\alpha$ -нитрозо- $\beta$ -нафтола встряхиванием содержимого пробирки с 3 мл этилацетата нижнюю окрашенную водную фазу сначала переносят в

обычную пробирку, а затем спектрофотометрируют при длине волны 525 нм.

Контрольную пробу ставят с водой и реактивами (в одной пробе).

В остатке мочи после устранения из нее кислых продуктов определяют тирамин. Для этого в пробирку приливают несколько капель 1 н  $\text{NH}_4\text{OH}$  и 0,5 мл боратного буфера с рН 10 (31,4 г борной кислоты растворяют в 1 л воды и добавляют примерно 67 мл раствора  $\text{NaOH}$  — 300 г/л). Остаток мочи промывают дважды порциями этилацетата по 4 мл путем встряхивания пробирки на протяжении 1 мин. После разделения фаз прозрачный верхний слой органического экстракта отсасывают, все количество эфира объединяют и промывают сначала 2, а затем 1 мл 0,2 н  $\text{HCl}$  в течение 1 мин при энергичном встряхивании пробирки.

Нижнюю водную фазу, содержащую тирамин, переносят в другую пробирку, в которую доливают 0,5 мл раствора  $\alpha$ -нитрозо- $\beta$ -нафтола (для определения 5-ОИУК) и 0,5 мл нитрозокислотного реактива (готовят перед использованием смешиванием 5 мл разбавленной в 5 раз концентрированной азотной кислоты и 0,1 мл раствора  $\text{NaNO}_2$  с концентрацией 25 г/100 мл).

Для образования флюоресцирующего комплекса пробирку прогревают в водяной бане при температуре  $+47^\circ\text{C}$  в течение 30 мин. Избыток  $\alpha$ -нитрозо- $\beta$ -нафтола устраняют прибавлением к раствору 4 мл дихлорэтана.

Почти бесцветную водную фазу отсасывают в центрифужную пробирку и флюориметрируют, применяя интерференционные светофильтры с максимумами пропускания светового потока при длинах волн 440 и 526 нм (их можно также использовать для исследования адреналина и норадrenalина).

По нашим данным, в норме суточная экскреция тирамина составляет  $231,26 \pm 11,78$  мкг (около 1260 мкмоль).

Для оценки результатов учитывают (по калибровочной кривой) содержание ВМК в 0,5 мл, 5-ОИУК — в 1 мл, тирамина — в 1,5 мл мочи, суточный диурез. Возможна дополнительная очистка экстракта при определении 5-ОИУК.

При очистке экстракта хлороформом (обследование больных с извращением обмена аминокислот триптофана, тирозина, фенилаланина) к 3 мл водного раствора, содержащего экстракт из 1 мл мочи, приливают 2 мл хлороформа. Смесь энергично встряхивают 1 мин. Содержимое переливают в центрифужную пробирку и центрифугируют при 3000 об/мин на протяжении 15 мин. Водную фазу переносят в другую пробирку и проводят реакцию с  $\alpha$ -нитрозо- $\beta$ -нафтольным и нитрозокислотным реактивами по описанному способу. Расхождение результатов параллельных исследований при включении этапа очистки экстракта хлороформом варьирует от 0,33 до 7,67 %, составляя в среднем 4,73 %.

Примечания к методике определения ВМК. Остановимся на рассмотрении тех моментов технического исполнения методики, от которых во многом зависит правильность получаемых результатов.

*Этап приготовления реактивов.* Все 3 раствора, применяемые для приготовления диазотированного р-нитроанилина, хранят при  $+4^\circ\text{C}$  и возобновляют каждые 4 нед. Непосредственно перед использованием смешивают равные части растворов р-нитроанилина и нитрита натрия (после добавления нитрита раствор р-нитроанилина почти полностью обесцвечивается) и приливают две части раствора карбоната натрия (после его внесения должна вновь



появиться прежняя желтая окраска р-нитроанилина). Эту смесь необходимо ввести в реакцию в течение 2 мин.

Раствор для элюции нужно готовить путем постепенного, по каплям, прибавления к раствору карбоната натрия двойного объема метанола (чтобы избежать выпадения хлопьев углекислого натрия из-за гораздо меньшей растворимости карбоната натрия в метаноле, чем в воде).

**Экстракционные процедуры.** Сухой экстракт (по методике Штудинца растворенный в этаноле) почти неограниченно долго можно держать в хорошо закупоренной посуде в холодильнике, что позволяет прервать методику на этом этапе.

**Хранение фореграмм.** Еще не опрысканную диазо-реагентом бумажную полосу допустимо сохранять защищенной от света и полностью изолированной от паров фенола (!) не более 2—3 дней. Следовательно, и на этом этапе методика может быть прервана.

**Обработка фореграмм.** После окрашивания бумажных полос раствором диазотированного р-нитроанилина фракция ВМК должна быть элюирована в течение 3 ч (включая и время сушки бумаги в струе холодного воздуха). Через 4 ч окраска пустых проб (фона) становится интенсивнее, вследствие чего получаются более низкие значения экстинкции. Следовательно, элюцию надо осуществлять на протяжении 3 ч после окрашивания фореграмм диазотированным р-нитроанилином.

**Исследование стабильности ВМК мочи.** По данным Штудинца (1960), содержание проб одной и той же мочи при комнатной температуре (+4 °C) как в подкисленном, так и в неподкисленном состоянии в течение 8 дней не сказывается на определении количественного содержания ВМК. Не играет роли, подкислена моча или нет. Установлено, что хранение подкисленной мочи в замороженном состоянии (-20 °C) на протяжении 7 мес (и даже 3 лет) практически не сказывается на результатах анализа.

При установлении ВМК мочи обследуемым нужно исключить из пищи бананы, содержащие большое количество норадреналина, а также некоторые лекарственные препараты: кофеин, салициловую кислоту и некоторые другие, могущие извратить результаты анализа.

### *Клинико-диагностическое значение исследования катехоламинов, их предшественников и метаболитов*

При интерпретации результатов анализа экскреции катехоламинов с мочой необходимо помнить, что выделение катехоламинов изменяется с возрастом (табл. 45).

Экскреция адреналина у мужчин и женщин почти одинакова во всех возрастных группах, за исключением обследуемых 12—15 (у мальчиков выше, чем у девочек) и 41—50 лет (у мужчин выше, чем у женщин).

Выделение норадреналина до возраста 8—11 лет почти одинаково; в дальнейшем оно возрастает у девочек и превышает экскрецию медиатора у мальчиков. И в последующие периоды экскреция его у женщин выше, чем у мужчин.

Выделение ДОФА во все периоды у женщин выше, чем у мужчин, а дофамина увеличено у женщин по сравнению с таковым у мужчин в возрасте с 12 до 30 и с 51 до 60 лет.

При исследовании экскреции катехоламинов с порционной мочой необходимо учитывать, что в утренние и дневные периоды суток выделение катехоламинов, как правило, выше, чем ночью (табл. 46).

Так, если экскреция адреналина и норадреналина у людей днем составляет  $7,5 \pm 1,1$  ( $4,2—11,5$ ) и  $30,9 \pm 3,5$  ( $17,0—41,6$ ) нг/мин. то ночью она снижается соответственно до  $1,9 \pm 0,84$  ( $0,3—5,86$ ) и  $11,3 \pm 4,2$  ( $2,3—30,4$ ) нг/мин (В. В. Меньшиков, 1961). Более детально изменение экскреции адреналина, норадреналина и их предшественников дофамина и ДОФА в зависимости от времени суток исследовано Э. Ш. Матлиной, З. М. Киселевой и И. Э. Софиевой (1965) (табл. 46).

Табл. 45. Показатели суточной экскреции катехоламинов и ДОФА с мочой ( $\bar{x} \pm \bar{Sx}$ ) у здоровых людей разного возраста (данные Т. Д. Большаковой с соавт., 1969)

Возраст	Адреналин		Норадреналин		Дофамин		ДОФА	
	(мкг/сут, нмоль/сут)		(мкг/сут, нмоль/сут)		(мкг/сут, нмоль/сут)		(мкг/сут, нмоль/сут)	
До 1 мес	0,4±0,1	2,18	1,3±0,2	7,7	15,0±2,6	98,0	—	—
11 мес	2,5±0,3	13,6	5,0±0,6	29,6	53,0±5,9	346,0	12,5±1,2	63,3
1—3 г	5,0±0,3	27,8	6,5±0,5	38,4	64,4±4,2	421,0	17,0±1,4	86,2
4—7 лет	4,3±0,4	23,5	10,9±1,7	64,4	68,6±10,3	447,0	—	—
8—11 »	6,2±0,6	33,8	16,4±2,6	96,9	82,3±14,5	537,0	—	—
12—15 »	6,9±1,0	37,7	25,8±4,6	153,4	124,2±27,9	810,0	—	—
16—20 »	6,5±0,3	35,5	17,3±0,8	102,3	251,2±21,8	1635,0	51,1±4,2	258,0
21—30 »	5,6±0,3	30,6	20,4±1,9	120,0	324,1±28,6	2180,0	48,8±4,6	247,0
31—40 »	5,4±0,3	29,5	17,9±0,3	105,8	322,5±27,5	2100,0	51,3±4,4	260,0
41—50 »	7,9±0,8	43,1	15,2±2,8	89,8	300,0±17,3	1960,0	40,4±10,8	222,0
51—60 »	3,5±0,4	19,1	14,0±1,7	82,8	383,3±57,6	2500,0	31,8±5,5	161,0

Табл. 46. Динамика выделения катехоламинов и ДОФА в мг/мин с мочой здоровых взрослых людей в течение суток

Время суток	Адреналин	Норадреналин	Дофамин	ДОФА
7—11 ч	4,8+0,64	15,5±1,8	261,0+39,0	38,5±5,5
11—15 ч	6,0±1,2	12,2+2,1	234,0+34,0	38,0+8,2
15—21 ч	4,5±0,63	17,0±2,4	281,0±39,0	32,1+5,2
21—7 ч	1,7+0,35	8,4±1,6	162,0+40,0	33,0±9,3

Суточная периодика экскреции катехоламинов у детей первого полугодия жизни такова: максимум выделения адреналина приходится на дневные часы, норадреналин обнаруживает два пика экскреции — с 9 до 12 ч и с 18 до 21 ч. Минимальная экскреция норадреналина отмечается между 3—6, 15—16 и 21—24 ч. Во втором полугодии жизни максимальный подъем уровня выделения адреналина наблюдается у детей в утренние часы — с 6 до 9, минимум экскреции — в ночное время. Суточная динамика выделения норадреналина такая же, как и в первом полугодии.

Курение, физическая нагрузка, эмоциональный стресс вызывают повышение экскреции катехоламинов с мочой.

Рассмотрение основных путей биосинтеза и метаболизма катехоламинов позволяет прийти к выводу о том, что для наиболее полного суждения о состоянии симпато-адреналовой системы у больного необходимо исследовать по возможности все основные звенья метаболизма катехоламинов — от их предшественников до гомованилиновой и ванилил-миндальной кислоты. Только в этом случае можно судить о резервных возможностях симпато-адреналовой системы, активности ее гормонального и медиаторного звеньев и общем объеме образующихся в организме гормонов-медиаторов.

Разумеется, результаты биохимического исследования должны быть подкреплены и данными клинического наблюдения, так как было бы весьма односторонне изучать одни лишь показатели обмена катехоламинов, не учитывая при этом степени чувствительности организма больного к их влиянию.

В этом смысле заслуживает всяческого одобрения метод функциональных проб (Г. Н. Кассиль, Э. Ш. Матлина и др.), позволяющий «встряхнуть» у больного парасимпатическую и симпатическую системы, с тем чтобы составить представление о границах гомеостаза.

Вообще же участие симпато-адреналовой системы в механизмах нейрогуморальной регуляции настолько многогранно, что требует детального освещения.

Уже давно было высказано предположение о том, что в развитии реакции напряжения (стресс) в организме и активации при этом системы гипоталамус — гипофиз — кора надпочечников ведущая роль принадлежит адреналину.

Возникновение диэнцефального синдрома и других заболеваний

связано с изменением количества катехоламинов в организме адреналина, норадреналина, их предшественников и метаболитов. Что же касается извращения обмена катехоламинов, то оно часто рассматривается в клинике нервных и психических болезней.

Многочисленными исследованиями в области биохимии биогенных аминов показано большое значение этих соединений в деятельности центральной нервной системы. В настоящее время не вызывает сомнения, что как сами катехоламины, так и их обмен тесно связаны прежде всего с функциональным состоянием головного мозга. Катехоламины являются активными участниками нервных процессов, и нарушение их обмена может играть существенную роль в развитии нервных и психических заболеваний.

Доказана важная и даже ключевая позиция обмена катехоламинов в возникновении расстройств двигательного автоматизма и мышечного тонуса (паркинсонизм), эмоциональной сферы (аффективная патология), высших форм целенаправленной деятельности и мышления (шизофрения).

Нарушения в регуляции мышечного тонуса и двигательных автоматизмов (патология экстрапирамидной системы, клинически проявляющаяся в синдроме паркинсонизма) сопровождаются выраженными изменениями в обмене катехоламинов, в основном на уровне дофамина. При паркинсонизме концентрация дофамина в головном мозге резко падает (в черной субстанции она составляет только 15 % от наблюдаемой в норме), в то время как содержание норадреналина снижается в значительно меньшей степени.

Тесная связь симпато-адреналовой системы с состоянием эмоциональной сферы обуславливает значительный интерес к изучению катехоламинов при аффективной патологии. Показано, что при такой выраженной патологии эмоциональной сферы, как маниакально-депрессивный психоз, выделение катехоламинов резко меняется в зависимости от фазы заболевания: в депрессивной фазе значительно увеличивается суточная экскреция адреналина и снижается выделение норадреналина, для маниакального состояния характерным является многократное возрастание экскреции норадреналина. Отмечено снижение уровня адреналина в случаях умственной отсталости. Недостаточная функция мозгового вещества надпочечников и низкий уровень адреналина в крови могут привести к нарколепсии и нарушению смены сна и бодрствования.

Изучение процессов превращения катехоламинов и физиологической активности возникающих при этом метаболитов приобретает особое значение в патогимии шизофрении.

Не менее актуальна для современной клиники проблема изучения катехоламинов и при сердечно-сосудистых заболеваниях, что можно проиллюстрировать на примере гипертонии и коронарной недостаточности.

В схеме патогенеза гипертонической болезни катехоламинам справедливо отводят роль промежуточного звена в становлении гипертонического состояния. Это предположение подтверждается выявлением отчетливого повышения содержания катехоламинов в организме больного во время гипертонических кризов.

По данным исследований последних лет, роль гормонов-медиаторов в патогенезе сердечно-сосудистой недостаточности сводится не только к нарушению доставки крови к сердцу, но и к изменению биохимических процессов в нем.

Рааб выдвинул концепцию о способности катехоламинов интенсифицировать поглощение кислорода тканью миокарда, что не удовлетворяется достаточным повышением коронарного кровотока. В этих условиях энергетическая активность сердца падает, возникает гипоксия миокарда с накоплением молочной кислоты.

Выделение катехоламинов повышено при кризах гипертонической болезни, в острый период инфаркта миокарда, при приступах стенокардин.

Гипотоническая болезнь также сопровождается выраженными нарушениями в обмене упомянутых гормонов-медиаторов и их предшественников. Так, рядом авторов отмечено резкое уменьшение экскреции дофамина при этом заболевании, что наводит на мысль о какой-то поломке в цепи биосинтеза факторов, способствующих поддержанию на должном уровне кровяного давления.

Роль катехоламинов в организме так многогранна, что она называется не только в генезе целого ряда нервно-психических и терапевтических заболеваний. «Тонкое» исследование обмена гормонов-медиаторов способствует правильной диагностике многих хирургических заболеваний и выбору наиболее рациональной тактики ведения больного как при осуществлении сложных полостных операций с применением гипотермии и искусственного кровообращения, так и при даче больному различных видов наркоза.

При обследовании больного с так называемой «эссенциальной» гипертензией нужно всегда помнить о возможности наличия у него феохромоцитомы — гормонально активной опухоли мозгового вещества надпочечников. Феохромоцитомы, как правило, сопровождается значительным увеличением продукции катехоламинов. Содержание катехоламинов при этом в десятки раз превосходит тот небольшой уровень, который наблюдается в период кризов при гипертонической болезни, что и позволяет с высокой степенью достоверности дифференцировать феохромоцитому от гипертонической болезни и диэнцефальных кризов. Часто исследование катехоламинов является единственным тестом, позволяющим поставить диагноз феохромоцитомы и симпатоганглиобластомы.

Тесные корреляции между уровнем кровяного давления и катехоламинемией были установлены и при аддисоновой болезни.

Жировое перерождение печени в результате воздействия четыреххлористого углерода на организм человека в значительной мере обусловлено повреждающим влиянием катехоламинов на паренхиму печени. Увеличение экскреции катехоламинов обнаружено также при гепатитах и циррозах печени, при обострениях язвенной болезни желудка и 12-перстной кишки. Нарушение экскреторной функции почек не может не привести к задержке катехоламинов в кровеносном русле, в связи с чем оно может иметь значение в патогенезе уремии. Остро протекающие инфекционные заболевания (различной этиологии токсические диспепсии и другие) нередко сопровождаются коллаптоидным состоянием за счет поражения хромаффинной ткани. Да и сама лихорадка обусловлена изменением соотношения адреналина и норадреналина в определенных центрах головного мозга. При коллапозах выделение катехоламинов снижается. Острые лейкозы у детей вызывают полную дегенерацию хромаффинной ткани с исчезновением реакции на катехоламины.

Весьма важным гуморальным регулятором, принимающим активное участие в осуществлении процессов гомеостаза, является 5-гидрокситриптамин. Это вещество, содержащееся в крови в ничтожно малой концентрации, в отличие от других биогенных аминов (тирамина, гистамина, триптамина) обладает выраженным сосудосуживающим действием. Названное в силу этого серотонином, оно, как оказалось, ничем не отличается от обнаруженного Эрспамером энтерамина и открытого Цукером тромботонина.

Установление важной роли серотонина в проявлении многих физиологических процессов потребовало разработки специфических методов количественного определения этого амина в биологическом материале.

Один из наиболее чувствительных методов количественного установления серотонина — биологический — основывается на способности 5-гидрокситриптамина вызывать сокращение гладкой мускулатуры (толстой кишки, желудка, рога матки и т. д.) экспериментальных животных. К сожалению, ему присущи все обычные для биологических способов недостатки: небольшая специфичность, различная чувствительность тест-объекта, трудности, связанные с необходимостью содержания в условиях клиники лабораторных животных.

Колориметрические методы определения серотонина и родственных ему аминов обусловлены их способностью образовывать с  $\alpha$ -нитрозо- $\beta$ -нафтолом окрашенные соединения, обладающие максимальной абсорбцией при 540 м $\mu$ . Ввиду необходимости в использовании значительных количеств субстрата для получения достаточно интенсивной окраски эти способы нашли наибольшее применение при исследовании содержания 5-ОИУК в моче и для контроля за интенсивностью протекания соответствующих ферментных реакций в тканях.

В последние годы в практику биохимического исследования вошли методы, базирующиеся на способности серотонина в определенных условиях испускать свет флюоресценции. В нейтральных и слабощелочных растворах максимум спектра флюоресценции 5-гидроксииндолов приходится на 330 м $\mu$  при ее возбуждении ультрафиолетовыми лучами с длиной волны 295 м $\mu$  (без поправок). С повышением кислотности среды (путем добавления соляной кислоты) интенсивность флюоресценции при 330 м $\mu$  падает и одновременно появляется новый максимум ее при 550 м $\mu$  (без поправок).

Наиболее широко распространенный способ определения содержания серотонина в тканях состоит в экстракции его *n*-бутанолом из насыщенных солью подщелоченных тканевых гомогенатов; при добавлении к *n*-бутанолу гептана и подкислении среды серотонин снова переводится в водную фазу. После этого осуществляют флюориметрический анализ подкисленного раствора серотонина с учетом флюоресценции соответствующего стандартного раствора и реактивов. Следует отметить, что классический флюоресцентный метод (Боданский с сотр., 1958; Вайсбах, Воулкес, Юденфренд, 1958; Юденфренд, 1963) труднодоступен (требует интерференционного светофильтра на 296 м $\mu$  и кварцевой оптики) и может дать ошибочные результаты при наличии в среде 5-метокситриптамина и *N*-метилных

производных. В 1965 г. Сneider с соавт. разработали новый способ исследования серотонина, основанный на переводе его во флюорофор за счет конденсации 5-гидрокситриптамина с ингидрином и проведения последующей флюориметрии при длинах волн: возбуждения — 380 нм и флюоресценции — 490—500 нм. Преимуществом этого метода являются его большая доступность, высокая специфичность: различные производные триптамина (такие, как 5-метокси-, 4- и 6-окси-, N-замещенные), мелатонин, а также 5-окситриптофан, 5-гидроксииндолуксусная кислота и многие другие вещества не обнаруживаются этим методом. Последний был значительно усовершенствован В. И. Кулинским и Л. С. Костюковской.

И все же, на наш взгляд, наиболее приемлемым для применения в клиничко-диагностических лабораториях является высокоспецифичный метод, базирующийся на способности о-фталевого альдегида образовывать флюоресцирующие комплексы с 3,5-замещенными индолами. Чувствительность этой реакции значительно повышается в присутствии L-цистина. Этот сравнительно нетрудоемкий метод требует для проведения исследования (при использовании стандартного флюориметра) не более 2 ч. Приводим его описание (Е. Б. Лобода, Ю. А. Макаров, 1974) в нашей модификации.

#### Определение серотонина в крови флюориметрическим методом с о-фталевым альдегидом

- Реактивы. 1. Раствор трихлоруксусной кислоты — 200 г/л.  
2. n-Бутанол, промытый 1 н щелочью NaOH, 1 н соляной кислотой, 3 раза дистиллированной водой и перегнанный.  
3. n-Гептан, промытый 1 н щелочью NaOH, 1 н соляной кислотой, 3 раза дистиллированной водой и перегнанный.  
4. Раствор цистина — 0,1 г/100 мл в 0,1 н HCl.  
5. Раствор о-фталевого альдегида — 0,004 г/100 мл в концентрированной HCl.

Вначале готовят основной, маточный, раствор в концентрации 0,4 г/100 мл: 40 мг о-фталевого альдегида растворяют в 10 мл концентрированной HCl. Хранят в замороженном состоянии.

Из основного раствора получают рабочий (0,004 г/100 мл) разбавлением первого в 100 раз: 0,1 мл основного раствора доводят концентрированной HCl до 10 мл.

6. Стандартный раствор серотонина. Основной раствор готовят в концентрации 60 мкг/мл, или 6000 мкг в 100 мл. Следовательно, для его получения необходимо 6 мг серотонина-креатинин-сульфата растворить в 100 мл бидистиллированной воды. Содержат в замороженном состоянии.

Из основного готовят рабочий раствор разбавлением первого в 100 раз: к 0,1 мл основного раствора доливают 9,9 мл воды. Этот рабочий раствор содержит 0,6 мкг/мл серотонина-креатинин-сульфата, или 0,26 мкг/мл серотонина-основания (1 мг основания серотонина соответствует 2,3 мг серотонина-креатинин-сульфата). Следовательно, в 1 мл содержится 0,26 мкг серотонина-основания, в 0,1 мл — 0,026 мкг основания серотонина.

Все реактивы готовят в бидистиллированной воде.

Ход определения. К 1 мл плазмы (или цельной крови) добавля-



ют 1 мл трихлоруксусной кислоты, пробу центрифугируют. Надосадочную жидкость переносят в пробирку с притертой пробкой, содержащую 2,5 мл н-бутанола, смесь энергично встряхивают (в руках или шуттель-аппарате) в течение 5 мин, затем центрифугируют (5 мин при 3000 об/мин). п-Бутанол отсасывают и переносят в пробирку с 3,0 мл бидистиллированной воды, 0,1 мл рабочего раствора цистенина и 5 мл н-гептана. Пробирку энергично встряхивают 5 мин и центрифугируют на протяжении 5 мин при 3000 об/мин.

Водную фазу помещают в обычную пробирку с 1,8 мл раствора о-фталевого альдегида, которую прогревают в течение 15 мин в кипящей водяной бане. После охлаждения измеряют флюоресценцию пробы при длинах волн 360 и 480 нм. В случае, если после охлаждения опытные пробы становятся мутными, их следует перенести в полиэтиленовые пробирки и отцентрифугировать.

Контрольную пробу ставят путем доливания к смеси, состоящей из 3,0 мл воды и 0,1 мл раствора цистенина, 1,8 мл о-фталевого альдегида с последующим ее прогреванием и охлаждением.

Стандартную пробу готовят добавлением к смеси из 3,0 мл воды и 0,1 мл раствора цистенина 0,1 мл рабочего раствора серотонина, 1,8 мл о-фталевого альдегида с последующим ее прогреванием и охлаждением.

Расчет производят по формуле:

$$\frac{\Phi_{\text{оп.}} \cdot 0,026}{\Phi_{\text{ст.}}} = a \text{ мкг/мл,}$$

где  $a$  — концентрация серотонина-основания в пробе (мкг/мл);  $\Phi_{\text{оп.}}$  — показания флюориметра для опытной пробы;  $\Phi_{\text{ст.}}$  — показания флюориметра для стандартной пробы.

Для выражения концентрации серотонина (5-гидрокситриптамина) в мкмоль/л пользуются формулой:

$$\frac{\Phi_{\text{оп.}} \cdot 0,026 \cdot 100 \cdot 0,05675}{\Phi_{\text{ст.}}} = a \text{ мкмоль/л,}$$

где 100 — фактор пересчета мкг на 100 мл биологической жидкости; 0,05675 — фактор перевода размерности мкг/100 мл в мкмоль/л. После сокращения получаем:

$$\frac{\Phi_{\text{оп.}} \cdot 0,14755}{\Phi_{\text{ст.}}} = a \text{ мкмоль/л.}$$

В норме содержание серотонина в плазме крови составляет  $4,4 \pm 0,9$  мкг/100 мл, или около 0,3 мкмоль/л.

В литературе широко обсуждается вопрос о преимуществах определения серотонина в тех или иных компонентах крови. Большинство авторов сходится на том, что лучше исследовать не цельную кровь или сыворотку (в сыворотке содержание серотонина составляет 1/10 часть уровня цельной крови), а плазму, так как в присутствии эритроцитов происходит потеря большого количества серотонина. Для сохранения последнего очень важно брать кровь в полиэтиленовые пробирки, не применяя при этом способ освобождения серотонина из тромбоцитов путем замораживания и оттаивания

плазмы. Взятие крови в полиэтиленовые пробирки не приводит к массивному разрушению тромбоцитов и эритроцитов, что позволяет определить содержание свободного серотонина в плазме.

## ОПРЕДЕЛЕНИЕ 5-ГИДРОКСИИНДОЛУКСУСНОЙ КИСЛОТЫ В МОЧЕ

Главным конечным метаболитом серотонина является 5-гидроксииндолуксусная кислота.

Схематично образование этого метаболита можно представить следующим образом:

5- гидрокситриптамин  $\xrightarrow{\text{моноаминоксидаза}}$  5-гидроксииндолацетальдегид  $\xrightarrow{\text{альдегиддегидрогеназа}}$  5-гидроксииндолуксусная кислота.

Методы изучения экскреции с мочой 5-ОИУК значительно проще способов определения концентрации серотонина в крови. Вместе с тем они являются достаточно адекватными для оценки продукции серотонина в организме.

1. Флюориметрические методы основываются на: 1) реакции образования флюорофоров в слабокислой или нейтральной среде. В ней максимум спектра флюоресценции 5-ОИУК приходится на длину волны 330 нм при возбуждении свечения ультрафиолетовыми лучами с длиной волны 295 нм;

2) реакции образования флюорофоров в сильнокислой среде. При этом максимум флюоресценции при возбуждении свечения ультрафиолетовыми лучами сдвигается в видимую область спектра — 550 нм;

3) реакции с  $\alpha$ -фталевым альдегидом.

II. Колориметрические методы базируются на способности индолов давать окраску с различными соединениями: ксантгидролом, диазотированной сульфаниловой кислотой, нафтохиноном, ванилином,  $\alpha$ -нитрозо- $\beta$ -нафтолом (Юденфренд, 1955; Съердсма с соавт., 1955; Пирс, 1956; Мак-Фарлан, 1956). Из всех перечисленных реакций наиболее широко используется свойство индолов реагировать с  $\alpha$ -нитрозо- $\beta$ -нафтолом. 5-ОИУК при взаимодействии с ним в определенных условиях образует окрашенное соединение (сиренево-розового цвета), имеющее характерный спектр абсорбции с максимумом поглощения при 530—540 нм. На этом принципе основан предложенный Съердсма в 1955 г. полуколичественный метод исследования 5-ОИУК в моче.

В 1955 г. Юденфренд с соавт. разработали колориметрический способ определения 5-ОИУК, состоящий в первоначальной обработке мочи 2,4-динитрофенилгидразином (для удаления кетокислот), последующей экстракции в хлороформ индолуксусной и других мешающих определению 5-ОИУК продуктов, насыщению мочи хлористым натрием (для увеличения коэффициента распределения 5-ОИУК между водой и диэтиловым эфиром), экстракции 5-ОИУК эфиром с дальнейшим возвращением ее в фосфатный буфер (рН 7,0) и проведении реакции с  $\alpha$ -нитрозо- $\beta$ -нафтолом (в присутствии азотистой кислоты). Образующиеся при этом продукты (сиренево-розового цвета) выявляются лишь после добавления уксусноэтилового эфира.

Интенсивность окраски измеряют на спектрофотометре или ФЭКе при длине волны 500—540 нм.

В 1958 г. Пирс предложил модификацию метода Мак-Фарлана с соавт. (1956), заключающуюся в том, что 5-ОИУК экстрагируют из 5 мл подкисленной и насыщенной сухим NaCl мочи 25 мл эфира; 20 мл эфирного слоя отсасывают и выпаривают досуха; сухой экстракт растворяют в 4 мл воды и проводят цветную реакцию с  $\alpha$ -нитрозо- $\beta$ -нафтолом. Процент выхода стандартного вещества 5-ОИУК в методе Пирса составляет 80—85 %.

В. С. Камышников (1968) изменил этот метод, повысив его специфичность.

III. Хроматографические способы базируются на том, что эфирный или этилацетатный экстракт 5-ОИУК наносят в виде пятна на полосу бумаги или на пластинку с носителем — целлюлозой, силикагелем (тонкослойная хроматография). После проведения одно- или двунаправленной хроматографии в сольвентных системах хроматограммы высушивают, а затем проявляют. Участок, соответствующий 5-ОИУК, либо вырезают (при бумажной хроматографии), либо соскабливают (при тонкослойной хроматографии) для осуществления последующей элюции. В элюате колориметрически определяют 5-ОИУК.

IV. Электрофоретические методы, как и хроматографические, дают возможность не только исследовать 5-гидроксииндолуксусную кислоту, но и выявить метаболиты катехоламинов (в частности ВМК). К сожалению, они остаются все еще труднодоступными для широкого практического применения.

Таким образом, в настоящее время наиболее пригодны для определения 5-ОИУК колориметрические методы Юденфренда с соавт. (1955) и В. С. Камышникова (1968). Они просты, позволяют в течение небольшого промежутка времени выполнить большое количество анализов, обладают высокой специфичностью и чувствительностью. Утверждены в качестве унифицированных.

Перед сбором мочи обследуемым необходимо исключить из пищи (по меньшей мере за три дня до анализа) продукты с большим количеством серотонина, а именно: грецкие орехи, бананы, томаты, ананасы, смородину, сливы, крыжовник, телятину, печенку, сыр и продукты, содержащие сою.

В качестве консерванта используют 10 мл 5 н HCl (на 1000—2000 мл мочи), а также смесь из 3 мл толуола и 25 мл ледяной уксусной кислоты либо серную кислоту (100 г/л), добавляемую к моче в соотношении 1:10.

Моча с консервантом, подкисленная до pH 1—2, может храниться до исследования в холодильнике в течение нескольких дней.

#### Определение 5-гидроксииндолуксусной кислоты в моче по реакции с $\alpha$ -нитрозо- $\beta$ -нафтолом (Юденфренд, Титус, Вайсбах, 1955)

**Принцип.** Метод базируется на реакции связывания нитрозоафтола с веществами группы индола, что сопровождается развитием окраски, интенсивность которой пропорциональна содержанию 5-ОИУК в моче.

**Реактивы.** 1. Хлороформ х. ч. перегнанный.

2. Этиловый эфир х. ч., промытый 1 раз раствором сернистой кислоты (1 г/л) для удаления перекисей и 2 раза — дистиллированной водой.

3. Уксусноэтиловый эфир х. ч.

4. 0,5 н фосфатный буфер, рН 7,0. Хранят в холодильнике.

5. Раствор  $\alpha$ -нитрозо- $\beta$ -нафтола в обезвоженном и отогнанном 2 раза этиловом спирте (1 г/л). Держат в холодильнике.

6. Этиловый спирт, обезвоженный расплавленным едким кали, добавленным из расчета 5,0 г КОН на 500 мл этанола. Смесь оставляют на 10—14 дней, после чего спирт дважды отгоняют.

7. Раствор 2,4-динитрофенилгидразина в 2 н соляной кислоте — 5 г/л.

8. 2 н серная кислота (готовят из фиксанала).

9. Раствор азотистокислого натрия ( $\text{NaNO}_2$ ) — 2,5 г/100 мл. Хранят в холодильнике.

10. Нитрозо-реактив. Делают непосредственно перед использованием. К 5 мл 2 н серной кислоты доливают 2 мл раствора азотистокислого натрия.

11.  $\text{NaCl}$  х. ч.

12. Стандартный раствор 5-ОИУК. Получают основной раствор 5-ОИУК в концентрации 100 мкг/мл. 10 мг взвешенной на аналитических весах (в бюксе или часовом стекле) кристаллической 5-ОИУК растворяют в небольшом объеме дистиллированной воды, переносят в мерную колбу на 100 мл и доводят объем дистиллированной водой до 100 мл. Раствор держат в холодильнике.

Ход определения. 6 мл мочи помещают в делительную (на 50—100 мл) воронку, приливают 6 мл раствора 2,4-динитрофенилгидразина, содержимое воронки слегка встряхивают и оставляют на 30 мин. Затем прибавляют 20 мл хлороформа и смесь взбалтывают 5 мин, отстаивают в течение 2—5 мин, центрифугируют, хлороформ сливают через край делительной воронки, добавляют чистый хлороформ и эту процедуру повторяют вновь.

10 мл водной фазы переносят в делительную воронку, в которую всыпают 4 г хлористого натрия и приливают 25 мл этилового эфира, смесь встряхивают 15 мин и центрифугируют, 20 мл эфирного экстракта помещают в другую пробирку, в которую добавляют 2,5 мл фосфатного буфера с рН 7,0.

2 мл водной фазы отсасывают со дна пробирки, переносят в чистую пробирку со шлифом на 15—20 мл, доливают 1 мл раствора  $\alpha$ -нитрозо- $\beta$ -нафтола, содержимое пробирки перемешивают, добавляют 1 мл нитрозо-реактива (свежеприготовленного!), затем опять хорошо встряхивают и ставят в водяную баню с температурой  $+37^\circ\text{C}$  на 10 мин.

В каждую пробу вносят 5 мл этилацетата, встряхивают, слой этилацетата удаляют отсасыванием и вновь повторяют процедуру. После отстаивания водную фазу осторожно переносят с помощью пастеровской pipетки в кювету с шириной слоя 10 мм. Раствор колориметрируют на ФЭКе с зеленым светофильтром (длина волны 540 нм). Результаты сравнивают с аналогичными данными контрольной пробы.

Для подготовки контрольной пробы 6 мл дистиллированной воды обрабатывают так же, как опытные пробы.

Расчет ведут по калибровочному графику.

Для получения данных к построению калибровочной кривой из

основного стандартного раствора делают ряд разведений с концентрацией 10; 25; 50; 75 и 100 мкг/мл. Стандартные растворы обрабатывают так же, как и опытные.

Вычисление экскреции 5-ОИУК в суточной моче (мг/сут) производят по формуле:

$$\frac{c \cdot d}{6 \cdot 1000} = a \text{ мг/сут,}$$

где  $c$  — содержание 5-ОИУК в пробе (мкг);  $d$  — суточное количество мочи (мл);  $6$  — количество мочи, взятое в пробу (мл);  $1000$  — коэффициент пересчета на мг.

Для расчета величины экскреции в мкмоль/сут следует использовать формулу:

$$\frac{c \cdot d \cdot 0,0057}{6} = a \text{ мкмоль/сут,}$$

где  $0,0057$  — фактор пересчета мкг в мкмоль.

Величину экскреции 5-ОИУК с порционной мочой (мкг/ч) определяют по формуле:

$$\frac{C \cdot d'}{6 \cdot t} = a \text{ мкг/ч,}$$

где  $d'$  — количество порционной мочи (мл);  $t$  — время сбора мочи (ч).

У взрослых людей суточная экскреция 5-ОИУК в норме составляет в среднем  $4,9 \pm 0,28$  мг/сут, или 28 мкмоль/сут. Величина почасовой экскреции колеблется в течение суток в пределах 165—330 мкг/ч. Для получения размерности мкмоль/ч приведенные числовые значения умножают на фактор пересчета  $0,0057$  ( $0,94$ — $1,88$  мкмоль/ч).

Примечания: 1. Необходимо тщательно доводить рН фосфатного буфера до 7,0, так как при несоблюдении этого условия отмечаются большие потери 5-ОИУК.

2. Прямо пропорциональная зависимость между содержанием 5-ОИУК в моче и оптической плотностью сохраняется в пределах концентрации до 100 мкг/мл ( $0,57$  мкмоль/мл). При более высоких значениях концентрации мочу следует развести дистиллированной водой, а результат умножить на цифру разведения.

#### Определение 5-гидроксииндолуксусной кислоты в моче по реакции с $\alpha$ -нитрозо- $\beta$ -нафтолом (В. С. Камышников, 1968)

**Принцип.** 5-ОИУК экстрагируют этилацетатом из подкисленной до рН 1 и насыщенной NaCl мочи, экстракт выпаривают досуха, остаток растворяют сначала в этаноле (способствующем лучшему переходу 5-ОИУК в водную среду), затем в воде и в водной фазе проводят цветную реакцию с нитрозо-нафтольным реактивом. Избыток  $\alpha$ -нитрозо- $\beta$ -нафтола и другие продукты удаляют экстракцией этилацетатом, после чего измеряют оптическую плотность хромофоров, прямо пропорциональную содержанию 5-ОИУК в моче.

**Реактивы.** 1. 1 н раствор  $H_2SO_4$ .

2. Насыщенный раствор х. ч. NaCl.

3. Хлороформ х. ч. перегнанный.

4. Укуснопэтиловый эфир х. ч.

5. Раствор  $\alpha$ -нитрозо- $\beta$ -нафтаола в обезвоженном и отогнанном 2 раза этиловом спирте (1 г/л). Хранят в холодильнике.

6. Этиловый спирт, обезвоженный едким кали (см. предыдущий метод).

7. Раствор азотистокислого натрия ( $\text{NaNO}_2$ ) — 2,5 г/100 мл. Держат в холодильнике.

8. Нитрозоокислотный реактив. Готовят перед использованием смешиванием 0,2 мл раствора азотистокислого натрия и 5 мл 1 н серной кислоты.

9. Стандартный раствор 5-ОИУК (основной). 5 мг кристаллической 5-ОИУК растворяют в небольшом объеме дистиллированной воды, смесь переносят в мерную колбу на 50 мл и доводят объем дистиллированной водой до 50 мл. В 1 мл этого раствора содержится 100 мкг (0,57 мкмоль) 5-ОИУК: 100 мкг/мл (0,57 мкмоль/мл). Хранят в холодильнике.

Ход определения. В пробирку с притертой пробкой вносят 1 мл подкисленной до pH 1 мочи, 1 мл насыщенного раствора NaCl и после перемешивания содержимого производят экстракцию 5-ОИУК укусноэтиловым эфиром. Последнюю повторяют дважды путем добавления к водной фазе этилацетата порциями по 4 мл с последующим встряхиванием смеси в течение 1 мин. После каждой экстракции верхний прозрачный этилацетатный слой переносят в широкую пробирку, в которой затем производят выпаривание объединенного экстракта. Пробирку закрывают пробкой с двумя (короткой и длинной) стеклянными трубками, ставят в водяную баню, нагретую до  $+47^\circ\text{C}$ , и через пробирку делают продувание током воздуха (выпаривание экстракта можно осуществлять и любым другим способом). Сухой остаток растворяют в 0,1 мл абсолютного этанола, тщательно смывая при этом стенки пробирки. Затем к этанольному экстракту доливают 2,9 мл дистиллированной воды, 0,3 мл раствора  $\alpha$ -нитрозо- $\beta$ -нафтаола и 0,3 мл нитрозоокислотного реактива. После перемешивания пробу прогревают на водяной бане при температуре  $+47^\circ\text{C}$  на протяжении 7 мин. К еще горячему раствору (сразу же после извлечения пробирки из водяной бани) добавляют 3 мл этилацетата. Содержимое пробирки тщательно взбалтывают. После разделения фаз нижний слой, имеющий сиренево-розовую окраску, отсасывают и измеряют экстинкцию на спектрофотометре (или микрофотоколориметре).

Спектрофотометрию проводят в кювете с толщиной слоя 10 мм при длине волны 525 нм. Под кювету подкладывают пластинку из плексигласа толщиной 3 мм для уверенной регистрации экстинкции малых объемов растворов. При спектрофотометрии «0» прибора устанавливают по контролю. При микрофотоколориметрии (на приборе типа МКМФ-1) используют кюветы-пробирки диаметром 15 мм.

К серии опытных проб готовят контрольную на воду и реактивы. Для этого 1 мл воды пропускают через все этапы метода так же, как это описано для мочи.

Расчет ведут по калибровочному графику.

Для получения данных к построению калибровочного графика к 1 мл основного стандартного раствора (содержит 100 мкг, или 0,57 мкмоль 5-ОИУК в 1 мл) приливают 9 мл дистиллированной воды. В 1 мл полученного разведения находится 10 мкг 5-ОИУК. В пробирки для экстракции вносят 2 мл воды и последовательно до-

бавляют 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 и 1,0 мл рабочего стандартного раствора, что соответствует 2; 4; 6; 8 и 10 мкг 5-ОИУК. Общий объем всех проб (за исключением последней) доводят до 3 мл, после чего в этих же пробирках определяют 5-ОИУК путем доливания нитрозо-нафтольного, нитрозоокислотного реактивов, последующего их прогрева и колориметрирования (см. ход определения).

Суточную экскрецию 5-ОИУК вычисляют по формулам:

$$\frac{C \cdot d}{1000} = a \text{ мг/сут (1)},$$

где  $C$  — найденное по калибровочному графику содержание 5-ОИУК в пробе (мкг);  $d$  — суточное количество мочи (мл); 1000 — коэффициент пересчета в мг.

$$C \cdot d \cdot 0,0057 = a \text{ мкмоль/сут. (2)}$$

Для определения содержания 5-ОИУК в порционной моче расчет производят по формуле:

$$\frac{C \cdot d'}{t} = a \text{ мкг/ч,}$$

где  $d'$  — количество порционной мочи (мл);  $t$  — время сбора мочи (ч).

Пересчет значений размерности в мкг/ч в мкмоль/ч осуществляют умножением первой величины на коэффициент 0,0057.

*Примечания к методике определения 5-гидроксииндолуксусной кислоты в моче по реакции с  $\alpha$ -нитрозо- $\beta$ -нафтолом. В случае применения варианта метода с очисткой хлороформом (для этого варианта в переносе реактивов указан хлороформ) к 3 мл водного раствора, содержащего экстракт из 1 мл мочи, приливают 2 мл хлороформа. Смесь энергично встряхивают в течение 1 мин. Содержимое переносят в центрифужную пробирку и центрифугируют при 3000 об/мин на протяжении 15 мин. Водную фазу отбирают в другую пробирку, в которой проводят реакцию с  $\alpha$ -нитрозо- $\beta$ -нафтольным и нитрозоокислотным реактивами. Расхождение результатов параллельных исследований при исключении этапа очистки хлороформом варьирует от 0,33 до 7,67 %, составляя в среднем 4,73 %.*

Выделение 5-ОИУК с мочой у здоровых взрослых людей составляет, по данным Юденфренда с соавт. (1955), 2—8 мг/сут (11,4—45,7 мкмоль/сут), Л. С. Бассалык (1965) —  $4,9 \pm 0,28$  мг/сут (28,0 мкмоль/сут), В. С. Камышникова (1968) —  $5,0 \pm 0,65$  мг/сут (28,5 мкмоль/сут).

Достоверных различий в экскреции 5-ОИУК у мужчин и женщин не выявлено.

У детей в возрасте от 1 до 15 лет экскреция 5-ОИУК достоверно ниже (в среднем  $3,4 \pm 0,07$  мг/сут, 19,4 мкмоль/сут; с пределами колебаний от 2 до 6 мг/сут, 11,4—34,2 мкмоль/сут), чем у взрослых людей ( $4,9 \pm 0,28$  мг/сут, 28 мкмоль/сут; пределы колебаний варьируют от 2 до 10 мг/сут, 11,4—57,08 мкмоль/сут) (Л. С. Бассалык, 1965). Эмерих и Шаф (1968) отметили уменьшение в 2 раза выделения 5-ОИУК у лиц в возрасте от 50 до 99 лет. Так, по данным этих авторов, у людей от 1 до 45 лет экскреция 5-ОИУК в среднем составляет 5,11 мг/сут (29,2 мкмоль/сут), в то время как у людей 50—59 лет — 3,00 мг/сут (17,3 мкмоль/сут). В период менст- рации экскреция с мочой возрастает в 2—3 раза.

Таким образом, при оценке величины экскреции 5-ОИУК необходимо учитывать возраст обследуемого. Если определяется выделе-



ше 5-ОИУК с порционной мочой, нужно учитывать суточный ритм экскреции этого метаболита. В дневные часы (особенно утром) выделение его выше, чем вечером и ночью. У беременных в III триместре также наблюдается возрастание экскреции 5-ОИУК с мочой.

### *Клинико-диагностическое значение исследования обмена серотонина*

В настоящее время не представляет сомнения, что серотонин имеет отношение к регуляции функции гемостатического гомеостаза. Последний определяется состоянием проницаемости, резистентности сосудов, активностью свертывающей и противосвертывающей системы крови и, наконец, функцией гемопоэза, на которые этот биогенный амин способен оказывать влияние. А. А. Багдасаров с соавт. показали, что восстановление гемостаза в результате переливания тромбоцитарной массы наблюдается лишь при нормализации уровня серотонина в крови. Г. А. Чернов, Л. Д. Орлова считают, что при заболеваниях системы крови между степенью выраженности геморрагического синдрома и серотонинемией имеются коррелятивные отношения. Так, при болезни Верльгофа в момент обильных кровотечений серотонин почти полностью исчезает из крови. Мы установили уменьшение содержания 5-гидрокситриптамина в крови и 5-ОИУК в суточном количестве мочи у больных с острым лейкозом, хроническим миело- и лимфолейкозом в период разгара заболевания и в терминальной стадии, что говорит о глубоком нарушении обмена серотонина у больных с указанными формами патологии. Улучшение клинического состояния больных сопровождается тенденцией к нормализации метаболизма серотонина. Об этом же свидетельствуют и данные других авторов.

Значительное возрастание концентрации серотонина в крови отмечается при карциноидном синдроме. Карциноид — гормонально активная опухоль, развивающаяся из энтерохромаффинной ткани и секретирующая в больших количествах серотонин. Чаще всего встречаются карциноиды тонкого кишечника, бронхов, яичников. Исходящая по размерам опухоль может давать обширные метастазы, обычно в печень. Для клинической картины гормонально активного карциноида характерны кризы, сопровождающиеся приливами (с появлением на лице и туловище «фляшей» — пятен с синюшным оттенком), бронхоспазмом, диареей, пеллагроподобным дерматозом, поражением клапанов сердца (главным образом правого).

Значение определения 5-ОИУК в моче для диагностики, прогноза и наблюдения за течением этого заболевания чрезвычайно велико. По мнению Кирбергера (1966), величины экскреции 5-ОИУК с мочой от 10 до 25 мг/сут (57,08—142,50 мкмоль/сут) подозрительны, а свыше 25 мг/сут (142,50 мкмоль/сут) доказательны. Известны случаи, когда выделение 5-ОИУК с мочой достигало 1000 и более мг/сут (5708 мкмоль/сут и более). В 1966 г. Л. С. Бассалык с соавт. описали случай злокачественного течения карциноидной опухоли с азотемией. При этом экскреция 5-ОИУК составила 400 мкг/мл (2,38 мкмоль/мл) мочи вместо 40 мкг/мл (0,24 мкмоль/мл) в норме.

По данным В. В. Меньшикова, Л. С. Бассалык и Г. А. Шапиро, у больных с типичным карциноидным синдромом содержание серотонина в крови возрастало более чем в 100 раз. Характерно,

что у больных во время прилива концентрация серотонина в крови повышалась, после прилива — снижалась до исходного уровня.

Гиперпродукция серотонина при карциноиде служит предпосылкой повышенного выделения 5-ОИУК. Следует лишь помнить, что величина экскреции 5-ОИУК еще не свидетельствует о размерах опухоли, наличии и степени метастазирования: описаны случаи малых, локализованных овариальных карциноидов с большим количеством метастазов, но с незначительным возрастом экскреции 5-ОИУК. Вместе с тем даже небольшое увеличение выделения 5-ОИУК с мочой может быть ранним симптомом этого тяжелого заболевания. В тех случаях, когда серотонин сразу поступает в большой круг кровообращения, повышенная экскреция 5-ОИУК нередко является первым симптомом, предшествующим клиническому проявлению карциноидного синдрома.

При карциноиде кишечника серотонин сначала проходит через печень, где он инактивируется. При метастазах злокачественного карциноида в печень находят огромное количество 5-ОИУК в моче, что служит поздним, прогностически неблагоприятным симптомом.

Нормальная экскреция 5-ОИУК еще не исключает карциноидный синдром. Продукция серотонина опухолью и выброс 5-ОИУК в мочу могут значительно колебаться. Поэтому для постановки диагноза этого заболевания исследование 5-ОИУК в моче должно выполняться многократно. Оно является диагностическим тестом и при наблюдении за больным после удаления опухоли. Высокая концентрация 5-ОИУК в моче в это время свидетельствует о неполном удалении опухоли или о ее метастазах. Нормализация экскреции 5-ОИУК также не служит доказательством полного удаления опухоли или отсутствия метастазов. К определенному заключению можно прийти лишь на основании регулярного исследования 5-ОИУК в моче.

Падение уровня серотонина в крови свойственно больным с паренхиматозными заболеваниями печени и с воспалительными процессами в желчном пузыре. Есть основание предполагать, что понижение концентрации серотонина в крови при гепатитах связано с дефицитом витамина В<sub>6</sub> и со снижением активности фермента окситриптофандекарбоксилазы, необходимого для синтеза 5-гидрокситриптамина.

Увеличение выделения 5-ОИУК с мочой наблюдается у больных с другой гормонально активной опухолью — феохромоцитомой (Л. С. Бассалык, 1965). По данным автора, выделение 5-ОИУК при этой патологии колеблется от 5,7 до 24,4 мг/сут, 32,5—137,0 мкмоль/сут, в среднем составляя  $11,3 \pm 1,2$  мг/сут, 62,8 мкмоль/сут. Резкое повышение экскреции 5-ОИУК отмечается при кризах феохромоцитомы (1132 мкг/ч, 7,53 мкмоль/ч в момент криза).

Увеличение выделения 5-ОИУК бывает у некоторых больных с инфарктом миокарда в первые сутки после его возникновения; указывается на высокие показатели экскреции 5-ОИУК у больных с острой коронарной недостаточностью, особенно в первые 4 ч после развития инфаркта. Это, очевидно, можно связать с освобождением из тромбоцитов (при образовании тромба) большого количества серотонина, что, естественно, сказывается на возрастании выделения 5-ОИУК. У больных с гипертонической болезнью, нелеченных резерпином, выделение кислоты остается в пределах нормы, хотя некоторые авторы отмечали небольшое повышение ее экскреции в

первой стадии гипертонической болезни, а также в периоды гипертонических кризов. При атеросклерозе и выраженной стенокардии также наблюдается малое увеличение экскреции 5-ОИУК. Это дает основание предполагать, что серотонин не принимает большого участия в патогенезе упомянутых заболеваний. Л. С. Бассалык с соавт. не нашли возрастания выделения 5-ОИУК у группы больных с гастритами, язвенной болезнью желудка и 12-перстной кишки. Отмечено увеличение экскреции 5-ОИУК в первые часы после операции на сердце.

Значительное повышение экскреции 5-ОИУК зарегистрировано у больных со злокачественными опухолями (злокачественные новообразования предстательной железы, иноперабельная опухоль прямой кишки, ретикулосаркома) и заболеваниями крови. Как указывает М. О. Раушенбах, это может быть вызвано тем, что в процессе опухолевого роста определенную роль играет нарушение обмена триптофана, из которого синтезируется серотонин.

Клинические наблюдения свидетельствуют о повышенном выделении 5-ОИУК с мочой у больных при аллергических состояниях, осложненных инфекцией, и у больных, страдающих туберкулезом, при лечении изониазидом. Обнаружено понижение экскреции 5-ОИУК у больных с ревматоидным артритом. Существенно изменяется обмен серотонина при злокачественном пролиферативном росте (значительно возрастает выделение 5-ОИУК с мочой). Нарушено выделение 5-ОИУК при почечной форме гипертонической болезни. Значительно повышена экскреция 5-ОИУК с мочой у больных с тромбофлебитом, что, вероятно, связано с высвобождением серотонина в результате образования тромба.

По-видимому, 5-ОИУК экскретируется в увеличенных количествах у больных с поражением тонкого кишечника, выделение ее не отклоняется от нормального уровня у больных с различными колитами.

Отмечено возрастание экскреции 5-ОИУК с мочой у шизофреников в период нарастания психической симптоматики.

Снижение выделения 5-ОИУК обнаружено при коллагенозах. Изменение содержания 5-ОИУК в моче наблюдается при заболеваниях печени. Экскреция метаболита возрастает при гепатитах и значительно снижается в случаях цирроза печени, особенно при тяжелых его формах.

Исследование выделения 5-ОИУК у детей показало, что при геморрагическом васкулите экскреция кислоты резко возрастает в острой стадии заболевания.

У детей с дискинезиями кишечника и склонностью к гипертонии в половине случаев отмечено увеличение экскреции 5-ОИУК, что, по всей вероятности, может свидетельствовать об участии серотонина в патогенезе указанных нарушений. Неудивительно поэтому, что при карциноидном синдроме одним из проявлений возрастания содержания серотонина в крови является диарея.

## ИССЛЕДОВАНИЕ

### СИСТЕМЫ ГИСТАМИН — ГИСТАМИНАЗА

Биогенный амин гистамин представляет собой продукт, образующийся при декарбоксилировании гистидина.

Все известные в настоящее время методы определения гистами-

на включают два основных этапа: 1) экстракцию гистамина, 2) количественное его установление.

Осаждение белков обычно производят трихлоруксусной или хлорной кислотами, что позволяет высвободить из связанного состояния почти весь гистамин. При добавлении кислоты к крови или ткани необходимо тщательно перемешивать содержимое пробирки для предотвращения формирования грубого преципитата (или даже комков); последнее практически исключает возможность полного реагирования исследуемой ткани с кислотой. Преципитат удаляют центрифугированием либо фильтрованием. Надосадочную жидкость можно хранить в течение длительного времени без потерь, так как при низком рН среды разрушение гистамина уменьшается.

Полученные экстракты встряхивают с *n*-бутанолом в таких условиях (высокий рН, большая концентрация солей), при которых гистамин как свободное основание переходит в бутанольную фазу. Гистамин удаляют из бутанола путем адсорбции на ионообменнике и элюируют разведенной соляной кислотой (водным или спиртовым раствором).

Примеси легко отделяют экстракцией эфиром из водных растворов (их рН доводят до 12). По данным ряда авторов, более целесообразно использование для этих целей смеси, состоящей из *n*-бутанола и хлороформа, которая значительно лучше экстрагирует гистамин, чем один бутанол, и к тому же в меньшей степени экстрагирует примеси.

Применяемые для выделения гистамина методы бумажной, газовой, тонкослойной хроматографии, а также способы ультрафильтрации и электродиализа сложны для распространения в клинико-диагностических лабораториях.

В основу биологических методов исследования гистамина положены следующие тест-объекты: артериальное давление (АД), толстая кишка морской свинки, сосуды почек (гистамин в очень низких концентрациях вызывает расширение сосудов почки, не влияя на общее кровяное давление), развитие бронхоспазма у морских свинок.

Химические способы базируются на взаимодействии определенных реактивов с функциональными группировками, входящими в состав молекулы гистамина. Таковыми являются: имидазольное кольцо, первичный алифатический амин, 1,4-диамино-1-бутен.

Из колориметрических способов наиболее чувствительны методы исследования гистамина по реакции с его первичной аминогруппой (2,5-диметокситетрагидрофурановые). Из них на первом месте стоит способ с применением 4-диметилцианинамальдегида.

Метод, предложенный С. М. Розентелем и Х. Ш. Табором (1948), основан на колориметрическом измерении количества гистамина посредством проведения диазореакции с *p*-нитроанилином.

Среди других следует отметить метод И. А. Крюковой (1965), которая использовала свойства нингидрина при рН выше 5 образовывать со свободными аминогруппами молекул гистамина комплекс голубого цвета. Колориметрические способы обладают рядом недостатков (например, малая их чувствительность).

Самыми совершенными справедливо считаются флюориметрические методы определения. Они сочетают в себе чувствительность биологического анализа с удобством химического. Известны две их разновидности:

1. Способ, базирующийся на реакции первичных аминов ацетоацетальдегиддиметилацеталем в присутствии формил-флюорогена, интенсивность свечения которого измеряют при длине волны 405 нм, вторичной — 485 нм, стабилен в течение 15 мин. Между концентрацией флюорогена и интенсивностью свечения существует хорошая линейная зависимость. Однако метод недостаточно специфичен: первичные алифатические и ароматические амины, аминокислоты и пептиды, а также белки с ацетоацетальдегидом реагируют с флюорогеном.

2. Второй флюориметрический метод основан на реакции конденсации гистамина с о-фталевым альдегидом, в результате образуются сильно флуоресцирующие соединения, имеющие максимум спектра возбуждения при 365 нм и максимум спектра свечения при 450 нм. Эта реакция является чрезвычайно специфичной для незамещенных имидазолэтиламинов. Принцип флюориметрического анализа был разработан Шором с соавт. (1959).

о-Фтальальдегидный способ обладает высокой избирательностью: гистидин, аргинин, агматин, спермин, спермидин хорошо реагируют с флюорогеном с о-фталевым альдегидом, однако при этих конденсатах не дает столь интенсивной флуоресценции, как гистамин.

С. А. Мещерякова (1971) предложила усовершенствовать методику дифференциации флюориметрического метода Шора с соавт. для определения гистамина в крови.

Биологические способы малопригодны для повседневного использования гистамина в клинико-диагностической лаборатории. Для выполнения необходимы большое количество животных и высокая стандартизация тест-объектов, хотя эти способы до сих пор используют во многих лабораториях мира.

Из химических на первое место следует поставить флюориметрический о-фтальальдегидный метод как наиболее специфичный, быстрый и требующий небольшого количества реактива. Приказом министра здравоохранения СССР № 290 от 11.01.1972 г. он был предложен для повсеместного применения и введен в унифицированный.

**Определение гистамина в цельной крови по флуоресценции продуктов, образующихся при реакции с о-фталевым альдегидом (модификация метода С. А. Мещеряковой)**

**Принцип.** Гистамин экстрагируют из крови хлорной кислотой и очищают от примесей путем экстракции смесью бутанола и хлороформа, переводят в водную фазу, в которой осуществляют реакцию конденсации с о-фтальальдегидным реактивом. Конденсат экстрагируют фосфорной кислотой и флуориметрируют.

**Реактивы.** 1. Водный раствор оксалата (щавелевоуксусной) натрия — 1,34 г/100 мл. Держат в темной бутылке при комнатной температуре. Добавляют из расчета 0,1 мл на 1 мл крови.

2. Хлорная кислота концентрированная (57 г/100 мл) и фосфорная кислота готовят 1 и 0,4 н водные растворы. Для их получения (4,59 мл) исходного реактива вносят в мерную колбу на 10 мл и доводят водой до метки.

3. н-Бутанол х. ч. (фракция, кипящая при  $+116,5 - 118,5^\circ$ ).
4. Хлороформ х. ч., перегнанный два раза, или хлороформ для наркоза.
5. Бутанол-хлороформная смесь: н-бутанол с хлороформом в объемном соотношении 3:2 (готовят перед употреблением).
6. Абсолютный метиловый спирт (можно пользоваться дважды перегнанным метанолом).
7. 5 н водный раствор едкого натра (его предпочтительнее хранить в полиэтиленовой посуде).
8. NaCl кристаллический х. ч.
9. 0,1 н водный раствор едкого натра, насыщенный хлористым натрием. Хлористый натрий добавляют к 0,1 н раствору NaOH так, чтобы образовался избыток твердого NaCl.
10. 1 н раствор едкого натра (он лучше сохраняется в полиэтиленовой бутылке).
11. 0,1 н раствор соляной кислоты.

12. 1,4 моль/л водного раствора о-фосфорной кислоты. 17,29 мл концентрированного раствора фосфорной кислоты (85 г/100 мл) доливают до 100 мл водой.

13. о-Фталевый альдегид (с температурой плавления кристаллов  $+40 - 60^\circ\text{C}$ ; коммерческий препарат рекомендуется перекристаллизовывать из лигронна). Из него готовят 0,1 г/100 мл раствор в метаноле. Метанольный раствор стабилен в течение двух недель, если держать его в холодильнике (лучше в морозильной камере) в темной склянке с притертой пробкой.

14. Стандартный раствор гистамина (основание или дигидрохлорид). Кристаллический гистамин дигидрохлорид ( $\text{C}_5\text{H}_9\text{N}_3 \cdot 2\text{HCl}$ ) содержит 60,5 % гистаминового основания. Хранят в сосуде с притертой пробкой в темноте, в эксикаторе, на дне которого находится поглотитель.

Из кристаллического препарата готовят его основной раствор (100 мкг/мл) путем растворения 5 мг основания (или  $5,63 = 8,15$  мг дигидрохлорида) гистамина в 50 мл 0,4 н хлорной кислоты (держать в замороженном состоянии). Перед использованием из основного получают рабочий раствор 1 (10 мкг/мл) прибавлением к 1 мл основного раствора гистамина 9 мл 0,4 н  $\text{HClO}_4$ . Для того чтобы более точно отобрать 0,1; 0,5; 1,0 мкг гистамина в стандартные пробы, мы рекомендуем приготовить из него рабочий раствор 2 с концентрацией 1 мкг/мл (к 1 мл рабочего раствора 1 доливают 9 мл 0,4 н хлорной кислоты).

15. Трижды дистиллированная вода. Последний раз она должна быть перегнана обязательно в стеклянном дистилляторе над марганцевокислым калием.

Ход определения. В пробирки емкостью 15—30 мл вносят по 4 мл оксалатной крови и такой же объем 1 н раствора хлорной кислоты. Тщательно закрыв их стеклянными или полиэтиленовыми пробками, содержимое перемешивают на протяжении 10 мин в шутель-аппарате (или энергично встряхивают 3 мин), после чего пробы центрифугируют 5 мин при 4000 об/мин. 4 мл надосадочной жидкости переносят в такие же пробирки, содержащие по 0,5 мл 5 н раствора едкого натра, 1,5 г хлористого натрия и по 10 мл смеси бутанол-хлороформа. Содержимое пробирок тщательно смешивают 3 мин (время отмечают по секундомеру) и центрифугируют при 4000 об/мин в течение 5 мин.

Нижнюю водную фазу отсасывают (лучше с помощью шприца, соединенной со шприцем) и сливают. Затем в пробирки помещают по 5 мл 0,1 н раствора NaOH с NaCl (для удаления гистидина). Пробирки энергично встряхивают на протяжении 3 мин. Пробы вновь центрифугируют 5 мин при 4000 об/мин. После разделения фаз весь верхний (органический) слой переносят с помощью системы шприц—пипетка в другие такие же пробирки, в которые приливают по 5 мл 0,1 н раствора HCl. Их хорошо закрывают пробками и смесь взбалтывают 3 мин. Пробы центрифугируют 5 мин при 4000 об/мин. Верхний водный слой (раствор соляной кислоты) с помощью системы шприц—пипетка (или другим способом) практически полностью отсасывают и помещают в обычные пробирки, в которые доливают по 0,5 мл 1 н NaOH и по 0,12 мл раствора о-фталевого альдегида. Через 4 мин добавляют 0,2 мл H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>. Пробы флуориметрируют, свечение образовавшегося конденсата возбуждают длиной волны 365 нм, а измеряют его при светофильтре с максимумом пропускания 460 нм. Флюороген стоек 30 мин.

**Примечание.** Все работы по определению гистамина делают под тягой.

Для приготовления контрольной пробы 4 мл 1 н хлорной кислоты (используемой вместо крови) проводят через все этапы метода.

Параллельно опытным и контрольным пробам обрабатывают рабочий стандартный раствор гистамина, в 4 мл которого заключаются 0,1; 0,5; 1,0 мкг основания гистамина, что соответствует содержанию в указанном объеме 0,1; 0,5; 1,0 мл рабочего раствора 2. Недостигающий до 4 мл объем доводят 0,4 н раствором хлорной кислоты.

Сначала измеряют величину свечения контрольной, затем 1—2 стандартных и опытных проб.

Линейная зависимость между интенсивностью флуоресценции и концентрацией гистамина обнаруживается обычно в пределах от 0,005 до 0,5 мкг гистамина в пробе.

Расчет осуществляют по калибровочной кривой, которую строят по общеизвестным принципам, или по формуле:

$$\text{Содержание гистамина в мкг/мл крови} = \frac{\Phi_0 \cdot C}{\Phi_{\text{с}} \cdot 4} \quad (1),$$

где  $\Phi_0$  — разность в показаниях опытной и контрольной проб (выражаемая числом делений шкалы прибора);  $\Phi_{\text{с}}$  — разность показаний стандартной и контрольной проб; C — содержание гистамина (мкг) в 4 мл стандартного раствора; 4 — коэффициент пересчета на содержание гистамина в 1 мл крови.

Для нахождения концентрации гистамина в мкг/100 мл пользуются формулой:

$$(\Phi_0 \cdot C \cdot 25) / \Phi_{\text{с}} \quad (2)$$

Чтобы выразить результаты в мкмоль/л, найденное по приведенной формуле (1) значение умножают на коэффициент 8,997. Его получают умножением 0,008997 на 1000, где первый показатель представляет собой фактор пересчета мкг в мкмоль, второй — фактор пересчета на 1 л биологической жидкости. После сокращений формула приобретает вид:

$$(\Phi_0 \cdot C \cdot 2,25) / \Phi_{\text{с}}$$

Содержание гистамина в крови здоровых людей составляет 0,18—0,72 мкмоль/л (0,02—0,08 мкг/мл, 2—8 мкг/100 мл).



## Определение активности гистаминазы в сыворотке крови

В большинстве методов об активности гистаминазы [(диаминооксидазы, диамины:  $O_2$ -оксидоредуктазы (дезаминирующей); КФ 1.4.3.6)] в сыворотке крови судят по убыли субстрата, добавленного в инкубационную смесь. Количество оставшегося гистамина определяют чаще всего биологическим, колориметрическим или флюориметрическим методами.

В 1973 г. А. Г. Класон и А. Б. Райцис опубликовали описание чувствительного и специфичного способа исследования гистаминазы, основанного на образовании способного флюоресцировать конденсата гистамина с о-фталевым альдегидом. После апробации этой методики мы внесли в ход анализа изменения, которые сделали способ еще более надежным и простым в исполнении. Приводим его описание.

Реактивы те же, что и в методе определения гистамина в сыворотке крови. Кроме того, требуются: 1. 0,2 моль/л фосфатного буфера, pH 7,2. Для его приготовления смешивают 72 мл 0,2 моль/л раствора  $Na_2HPO_4$  и 28 мл 0,2 моль/л раствора  $NaH_2PO_4$ .

0,2 моль/л раствора двузамещенного фосфата натрия получают растворением кристаллической соли состава  $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$  в 200 мл воды.

Для приготовления 0,2 моль/л раствора однозамещенного фосфата натрия 6,24 г кристаллогидрата  $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$  растворяют в 200 мл воды.

При отсутствии солей указанного состава можно сделать соответствующий пересчет исходя из соотношения молекулярных масс разных кристаллогидратов (или кристаллогидрата и безводной соли). Следует помнить о том, что кристаллогидраты, содержащие 12 молекул воды, легко выветриваются на воздухе, поэтому для исключения ошибок при получении буферного раствора их частично обезвоживают выдерживанием тонко растертого порошка кристаллической соли в течение 2 суток на воздухе.

2. Раствор ТХУ — 100 г/л.

3. Основной раствор гистамина. 100 мкг/мл (16,5 мг дихлорида гистамина или 10 мг основания растворяют в 100 мл воды).

Перед инкубацией готовят рабочий раствор гистамина, для чего к 0,5 мл основного его раствора прибавляют (в пробирке) 2,0 мл дистиллированной воды. Из полученного (2,5 мл) объема (достаточного для постановки 3 опытных и 1—2 контрольных проб) отбирают по 0,5 мл рабочего раствора гистамина в опытные пробы; оставшийся в пробирке раствор (0,5—1,0 мл) помещают в холодильник и после завершения срока инкубации (см. ход определения) его извлекают оттуда и оттаивают. 0,5 мл раствора (10 мкг основания гистамина) вносят в контрольную пробу.

Лабораторное оборудование те же, что и в методе определения гистамина. Помимо этого для проведения инкубации используют плоскодонные конические колбочки на 15—30 мл, закрывающиеся пробками с пропущенными через них двумя стеклянными трубками (одной короткой, другой более длинной). Такое устройство позволяет продувать через колбочки кислород. Для инкубации лучше всего применять сосудики от аппарата Варбурга.

Ход определения. В колбочки для инкубации вносят по 2,9 мл

фосфатного буфера и по 0,5 мл (1,0 мл) исследуемой сыворотки. В опытные пробы добавляют по 0,5 мл (10 мкг) рабочего раствора гистамина. Содержимое колбочек продувают кислородом и помещают на сутки в термостат при  $+37^{\circ}\text{C}$  (оставшийся в пробирке рабочий раствор гистамина замораживают в холодильнике). После инкубации во все колбочки доливают по 5 мл раствора трихлоруксусной кислоты, а в контрольную пробу помещают 0,5 мл размороженного раствора гистамина (10 мкг). Через 5 мин содержимое колбочек переносят в центрифужные пробирки и центрифугируют в течение 15 мин при 4000 об/мин. 4 мл надосадочной жидкости вносят в закрывающиеся стеклянными или полиэтиленовыми пробками пробирки (емкостью около 20 мл), в которых находится 0,5 мл 5 и раствора едкого натра, 1,5 г хлористого натрия и 10 мл смеси бутанол-хлороформа. Содержимое пробирок энергично перемешивают 3 мин (время отмечают по секундомеру) и центрифугируют при 4000 об/мин на протяжении 5 мин. Нижнюю водную фазу отсасывают (лучше с помощью пипетки, соединенной со шприцем) и сливают. Затем в пробирки помещают по 5 мл 0,1 н раствора NaOH с NaCl (для удаления гистидина). Пробирки встряхивают в течение 3 мин. Пробы вновь центрифугируют 5 мин при 4000 об/мин. После разделения фаз весь верхний (органический) слой переносят с помощью системы шприц — пипетка в другие такие же пробирки, в которые приливают по 5 мл 0,1 н раствора HCl. Их хорошо закрывают пробками и смесь взбалтывают 3 мин. Пробы центрифугируют 5 мин при 4000 об/мин. Верхний водный слой (раствор соляной кислоты) с помощью системы шприц — пипетка (или другим способом) практически полностью отсасывают и помещают в обычную пробирку, в которую добавляют 0,5 мл 1 н NaOH и 0,12 мл раствора о-фталевого альдегида. Через 4 мин доливают 0,2 мл  $\text{H}_3\text{PO}_4$ . Пробы флюориметрируют: свечение образовавшегося конденсата возбуждают длиной волны 365 нм, а измеряют его при светофильтре с максимумом пропускания 460 нм. Флюороген стоек 30 мин.

В контрольной пробе на реактивы (ее можно и не ставить) меняют порядок добавления раствора, а именно: о-фталевый альдегид вносят после доливания фосфорной кислоты.

Примечание. Все работы по определению гистамина следует проводить под тягой.

Активность гистаминазы вычисляют по формуле:

$$\frac{(\Phi_{\text{к.}} - \Phi_{\text{о.}}) \cdot 10 \cdot 2(1)}{\Phi_{\text{к.}} \cdot 24} = a \text{ мкг}/(\text{ч} \cdot \text{мл}),$$

где  $\Phi_{\text{к.}}$  — показание контрольной пробы (с вычетом показания контрольной пробы на реактивы);  $\Phi_{\text{о.}}$  — показание опытной пробы (с вычетом показания контрольной пробы на реактивы); 10 — количество гистамина в растворе (мкг), внесенного в контрольную и опытные пробы; 2 (1) — коэффициент пересчета активности гистаминазы на 1 мл сыворотки; 24 — коэффициент пересчета на 1 ч инкубации.

Для выражения результата в мкмоль/(ч·л) полученное по приведенной формуле значение умножают на фактор 8,997 (найденный умножением 0,008997 на 1000, где 0,008997 — фактор пересчета мкг в мкмоль гистамина).

Активность гистаминазы в сыворотке крови составляет в среднем 2,4 мкмоль/(ч·л) ( $0,27 \pm 0,24$  мкг/(ч·мл)).

Известно, что в процессах инактивации этого амина значительную роль играет также гистаминоплексическая активность крови (ГПА). В Советском Союзе и за рубежом для определения ГПА преимущественно пользуются методом Перита — Заборта, базирующимся, как и способ исследования активности гистаминазы, на определении убыли гистамина, добавленного к сыворотке крови или к ткани.

### *Клинико-диагностическое значение исследования системы гистамин—гистаминаза*

С момента открытия гистамина накопилось достаточно большое количество фактов, свидетельствующих о важной роли этого биогенного амина в проявлении многих физиологических процессов. Так, гистамин — это один из участников нейро-гуморальной регуляции тонуса кровеносных сосудов и органов с гладкой мускулатурой (показано, что освобождающийся гистамин вызывает снижение артериального давления), он резко повышает проницаемость капилляров, активизирует секрецию пищеварительных и деятельность экскреторных желез, обуславливает спазм гладкомышечных органов и т. д. Кроме того, в настоящее время выявлен ряд патологических процессов, в генезе которых большое значение имеет избыточное накопление гистамина в тканях: различные аллергические состояния, заболевания, вызывающие склерозирование внутренних органов, и прочие. Наряду с этим установлено, что многие патогенные факторы (гипоксия, травмы, эмоциональные напряжения, проникающая радиация и т. д.) ведут к освобождению большого количества гистамина.

Содержание гистамина в крови определяется состоянием биосинтеза, депонирования, секреции, взаимодействия с эффекторными органами, инактивации и выведения этого биогенного амина из организма. Лишь комплексное изучение всех обменных процессов может дать известное представление о системе гистамина.

Нужно сказать, что у одного и того же человека колебания уровня гистамина в крови в течение года незначительны. Не обнаружено достоверных различий в содержании гистамина в зависимости от пола и возраста. Правда, у взрослых отмечается тенденция к более высокому уровню гистамина в крови по сравнению с детьми. В детском же возрасте у мальчиков выявлено несколько более высокое содержание гистамина, чем у девочек.

При нормально протекающей беременности к 26—30-й неделям уровень гистамина в крови возрастает в 20—25 раз. Небезынтересно отметить, что у беременных в III триместре активность гистаминазы более чем в 200 раз превышает норму.

Возрастание содержания гистамина в крови обнаружено при таких воздействиях, как охлаждение, перегревание, влияние рентгеновских лучей и ионизирующей радиации, облучение ультрафиолетовым светом. Предполагают, что увеличение концентрации гистамина в крови при этом связано с усиленным его высвобождением из мест биосинтеза. Неудивительно поэтому, что чрезвычайно высокие количества гистамина в крови выявлены при тех заболеваниях, которые характеризуются повышенным его образованием (например, в гистаминоцитах), — при мастоцитоме и лейкемии. Особенно большое со-

держание гистамина наблюдается при злокачественной мастоцитоме. Часто встречающаяся пигментная крапивница сопровождается повышенной продукцией гистамина.

При миелоидном лейкозе также обнаруживается очень высокая концентрация гистамина в крови (до 100—115 мкг/100 мл), причем огромные цифры наблюдаются как при лейкемических, так и при алейкемических формах заболевания. По существующему мнению (Гингольд, 1968), определение содержания гистамина в крови важно для ранней диагностики хронического миелоидного лейкоза.

Трудно переоценить значение исследования содержания гистамина в крови у больных с различными клиническими формами аллергии. Так, при бронхиальной астме концентрация гистамина в большой степени повышена на высоте приступа и после него. В межприступном периоде она хотя и ниже, чем в указанные периоды, однако все еще значительно превышает нормальный уровень. Длительное лечение стероидными и антигистаминными препаратами больных с бронхиальной астмой способствует снижению уровня гистамина в крови в межприступном периоде до нормального.

У больных с ревматоидным артритом, а также с различными другими формами ревматизма увеличенное содержание гистамина в крови наблюдается во всех фазах заболевания, но особенно оно велико в фазе выраженной активности.

По данным Н. Я. Рязанова (1966), П. Н. Юренева с соавт. (1968), у больных с лекарственной аллергией уровень гистамина в крови достигает 38—47 мкг/100 мл (3,42—4,23 мкмоль/л), а в некоторых случаях — даже 112 мкг/100 мл (10 мкмоль/л).

Он повышается также при аллергической риносинусопатии, отеке Квинке.

Концентрация гистамина в цельной крови в большой степени увеличивается у больных с ангионевротической формой стенокардии, особенно в первые 3—6 дней после развития инфаркта миокарда.

Повышение уровня гистамина в крови у больных эпидемическим гепатитом, циррозом печени может играть определенную роль в развитии аллергических проявлений при этих патологических состояниях, в патогенезе язвы желудка и 12-перстной кишки, довольно часто отмечаемых при заболеваниях печени.

Работами В. И. Успенского показана важная роль резко выраженной гистаминемии у больных с силикозом легких.

Высокий уровень гистамина обнаружен также при поздних токсикозах беременности.

## РЕКОМЕНДУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА

- Анасашвили А. Ц. Гликопротеиды сыворотки крови и мочи. М., 1968, 228 с.
- Бабушкина З. Н., Шаевич А. Б., Шпакова С. П. Опыт оценки и контроля точности биохимических анализов.— Лаб. дело, 1974, № 10, с. 605—608.
- Биохимические методы исследования в клинике / Под ред. А. А. Покровского. М., 1969, 652 с.
- Брокерхоф Х., Дженсен Р. Липолитические ферменты. М., 1978, 396 с.
- Вайсфельд И. Л., Кассиль Г. Н. Гистамин в биохимии и физиологии. М., 1981, 277 с.
- Валитова М. С., Бычкова Л. Я. Взятие и доставка биоматериалов для лабораторных исследований в клинко-диагностические лаборатории: Методические рекомендации. М., 1979, 105 с.
- Введение в клиническую биохимию / Под ред. И. И. Иванова. Л., 1969, 494 с.
- Вилкинсон Д. Принципы и методы диагностической энзимологии. М., 1981, 624 с.
- Врожденные и приобретенные энзимопатии / Под ред. Т. Ташева. М., 1980, 368 с.
- Галлер Г., Ганефельд М., Яросс В. Нарушения липидного обмена. М., 1979, 335 с.
- Гейне В., Пленерт В., Рихтер И. Лабораторная диагностика в детском возрасте. М., 1982, 284 с.
- Гомеостаз / Под ред. П. Д. Горизонтова. М., 1981, 576 с.
- Горжейши Я. Основы клинической биохимии. Прага, 1967, 680 с.
- Гублер Е. В., Генкин А. А. Применение непараметрических критериев статистики в медико-биологических исследованиях. Л., 1973, 141 с.
- Дислиппротеидемии и ишемическая болезнь сердца / Под ред. Е. И. Чазова и А. Н. Климова. М., 1980, 311 с.
- Диспротеинемии / И. Вапцаров, М. Йомтов, С. Савов с соавт. М., 1978, 336 с.
- Иванов И. И., Коровкин Б. Ф., Маркелов И. М. Введение в клиническую энзимологию. Л., 1974, 277 с.
- Камышников В. С. Метод одновременного определения в одной порции мочи ванилил-миндальной и 5-оксиндолуксусной кислот.— Здравоохран. Белоруссии, 1968, № 6, с. 78—79.
- Камышников В. С., Колб В. Г. Количественная оценка диск-электрофореграмм липопротеидов сыворотки крови здоровых

людей и больными некоторыми формами неспецифической пневмонии.— Здравоохран. Белоруссии, 1978, № 3, с. 19—23.

Колб В. Г. Биохимические аспекты реактивности организма при туберкулезе. Мн., 1971, 144 с.

Колб В. Г., Камышников В. С. Методические указания по клинической биохимии для врачей-лаборантов. Мн., 1971, ч. 3, 152 с.; 1972, ч. 4, 196 с.; 1974, ч. 5, 226 с.

Колб В. Г., Камышников В. С. Клиническая биохимия. Мн., 1976, 311 с.

Колб В. Г., Камышников В. С. Количественные исследования липопротеидов сыворотки крови здоровых людей диск-электрофорезом в полнакриламидном геле.— Лаб. дело, 1979, № 1, с. 42—44.

Колб В. Г., Таганович А. Д., Гуревич Г. Л. Методические рекомендации количественного определения липопротеидного спектра и активности липопротеидлипазы сыворотки крови. Мн., 1979, 15 с.

Колб В. Г., Коваленко И. Е., Бусел Т. И. Методические рекомендации по применению в клинической лабораторной диагностике международной системы единиц. Мн., 1980, 17 с.

Комаров Ф. И., Коровкин Б. Ф., Меньшиков В. В. Биохимические исследования в клинике. Л., 1976, 383 с.

Крепс Е. М. Липиды клеточных мембран. Л., 1981, 339 с.

Ларский Э. Г. Методы зонального электрофореза. М., 1971, 110 с.

Линпперт Г. Международная система единиц в медицине. М., 1980, 208 с.

Мак-Мюррей У. Обмен веществ у человека. М., 1980, 215 с.

Матлина Э. Ш., Киселева З. М., Софиева И. Э. Метод определения адреналина, норадреналина, дофамина и ДОФА в одной порции мочи.— В кн.: Методы исследования некоторых гормонов и медиаторов. М., 1965, с. 25—32.

Маурер Г. Диск-электрофорез. М., 1971, 247 с.

Меньшиков В. В. Об определении катехоламинов в моче.— Лаб. дело, 1961, № 4, с. 18—21.

Меньшиков В. В., Большакова Т. Д. Определение ванилил-миндальной кислоты с использованием электрофореза на бумаге.— В кн.: Методы клинической биохимии гормонов и медиаторов. М., 1966, с. 60—61.

Меньшиков В. В., Делекторская Л. Н., Смирнова Е. Л. О методах и организации контроля качества лабораторных исследований в клинико-диагностических лабораториях.— Лаб. дело, 1973, № 1, с. 58—61.

Меньшиков В. В., Трошина И. М., Делекторская Л. Н. О выборе статистического метода оценки правильности результатов лабораторных исследований.— В кн.: Современные проблемы клинической лабораторной диагностики. М., 1975, с. 52—57.

Методические рекомендации по применению в клинической лабораторной диагностике наименований и обозначений единиц физических величин /Под ред. В. В. Меньшикова, Л. Н. Делекторской, Е. В. Абрашова. М., 1977, 34 с.

Методические указания по применению унифицированных кли-

ических лабораторных методов исследования / Под ред. В. В. Меньшикова. М., 1973, 174 с.

Методы практической биохимии. М., 1978, 268 с.

Мецлер Д. Биохимия. М., 1980, т. 1, 407 с.; т. 2, 605 с.

Основы биохимии / А. Уайт, Ф. Хендлер, Э. Смит и др. М., 1981, 1878 с.

Остерман Л. А. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот. Электрофорез и ультрацентрифугирование. М., 1981, 286 с.

Панченко Н. И., Масленникова Н. К., Коган Э. С. О влиянии разведения сыворотки на результаты определения аминотрансфераз по методу Райтмана и Френкеля.— Лаб. дело, 1974, № 8, с. 503—504.

Рапопорт С. М. Медицинская биохимия. М., 1966, 892 с.

Унификация лабораторных методов исследования / Под ред. В. В. Меньшикова. М., 1978, вып. 8, 122 с.

Унифицированные методы клинических лабораторных исследований / Под ред. В. В. Меньшикова. М., 1974, вып. 6, 134 с.

Хашен Р., Шейх Д. Очерки по патологической биохимии. М., 1981, 253 с.

Шлак Л. В. Перспективность полярографического метода определения катехоламинов в крови.— Лаб. дело, 1979, № 5, с. 292—297.

Юдаев Н. А. Химические методы определения стероидных гормонов в биологических жидкостях. М., 1961, 172 с.



*Владимир Гаврилович Колб,  
Владимир Семенович Камышников*  
**СПРАВОЧНИК ПО КЛИНИЧЕСКОЙ ХИМИИ**

Редакторы *Т. Н. Войнова, В. А. Скоробогатая*  
Художник *В. Л. Милескини*  
Художественный редактор *В. П. Бозини*  
Технический редактор *Л. Л. Грамович*  
Корректоры *Л. Г. Кузьмина, Н. Н. Масаренко*

ИБ № 1682

Сдано в набор 30.03.82. Подп. в печать 27.09.82. АТ 07772. Формат 84×108<sup>1</sup>/<sub>16</sub>. Бумага тип. № 2. Гарнитура литературная. Высокая печать. Усл. печ. л. 19,32. Усл. кр. отт. 19,32. Уч.-изд. л. 28,02. Тираж 30 000 экз. Зак. 854. Цена 1 р. 70 к.

Ордена Дружбы народов издательство «Беларусь» Государственного комитета БССР по делам издательств, полиграфии и книжной торговли. 220600, Минск, проспект Машерова, 11.

Ордена Трудового Красного Знамени типография издательства ЦК КП Белоруссии. 220041, Минск, Ленинский проспект, 79.