

**Министерство Высшего и Среднего Специального Образования
Республики Узбекистан**

Национальный Университет Узбекистана им. Мирзо Улугбека

**Учебно-методическое пособие по
Клинической Биохимии**

ТАШКЕНТ - 2006

Учебно-методическое пособие по курсу «Клиническая биохимия».
Ташкент. Национальный университет Узбекистана им. М.Улугбека, 2006г.

Данное учебно-методическое пособие подготовлено на основе имеющихся условий лабораторной практики на кафедре биохимии биолого-почвенного факультета НУУз им. М.Улугбека для ознакомления студентов с содержанием практических занятий по курсу «Клиническая биохимия» и закрепления теоретических знаний.

В работе приводятся описания современных широко используемых клинических методов лабораторных исследований крови, мочи и др.

Описание каждого метода включает в себя сведения о принципе и ходе исследования, а также клинико-диагностическом значении проводимого теста.

Учебно-методическое пособие предназначено для студентов ВУЗов.

Составители:

Далимова С.Н.
Умарова Г.Б.
Мухаммаджанова Г.М.

Ответственный редактор:

проф. Далимова С.Н.

Рецензенты:

проф. Валиханов М.Н.
д.б.н. Кадирова Д.А.

Введение

Клиническая биохимия-это научная дисциплина, возникшая на стыке клинической медицины, биологии, химии, физики и других наук.

Предметом клинической биохимии является изучение закономерностей взаимосвязей между физиологическим и патологическим состоянием организма, с одной стороны, и изменением состава компонентов его клеток и биологических жидкостей - с другой.

Клиническая лабораторная диагностика включает в себя различные виды исследований: биохимические, морфологические (цитологические), микробиологические и др. Клиническая биохимия охватывает исследование биологических жидкостей, отдельных клеток и клеточных структур с целью постановки диагноза заболевания, оценки прогноза, эффективности проводимого лечения.

Методы клинических исследований

Важнейшим разделом лабораторной медицины являются биохимические (аналитические), методы, позволяющие объективно оценить и охарактеризовать состав сложных биологических систем, какими являются биологические жидкости организма человека. Биохимические анализы широко используются в медицине для дифференциальной диагностики заболеваний, прогноза, мониторинга и скрининга. Биохимические исследования помогают подтвердить или опровергнуть диагноз, выявить болезнь на доклинической стадии, проследить течение болезни и возможные осложнения, оценить эффективность проводимой терапии. Основная задача клинической биохимии — исследование функционирования живых систем с точки зрения процессов, протекающих в клетках и в клеточных структурах. Однако полученные результаты необходимо рассматривать на уровне органов, тканей, всего организма и во взаимосвязи целого организма с окружающей средой. Для клинической диагностики представляют интерес: химический состав биологических жидкостей и тканей организма, распределение жидкости и химических компонентов между органами и тканями, процессы превращения веществ в целом организме и различных его органах, а также регуляция обмена веществ с помощью ферментов, гормонов и других биологически активных соединений. В биохимической лаборатории проводится исследование крови (цельная кровь, плазма, сыворотка), мочи, церебро-спинальной жидкости, пота, пищеварительных соков и др. Наиболее частым биологическим материалом для биохимического исследования являются кровь и ее составляющие (плазма, сыворотка).

Общеклинические методы исследования биологических материалов.

Исследование мочи

Одной из основных функций почек является удаление из организма конечных продуктов метаболизма, различных экзогенных и эндогенных веществ.

Многообразии функций почек объясняет сложность их структуры. Исследование мочи позволяет судить не только о характере и выраженности патологического процесса в почках, мочевыделительной системе, но и о состоянии других органов. Общий анализ мочи включает исследование общих свойств мочи, химическое и микроскопическое исследование. Исследованию подлежит первая утренняя порция мочи, которая исключает влияние стресса, питания, раздражающих факторов.

При длительном стоянии мочи происходит изменение ее физических свойств и разрушение клеточных элементов, размножение бактерий. для предотвращения этих процессов лучше хранить на холоде при температуре + 4 °С, не допуская замерзания, а также необходимо применять консерванты: 1) жидкость Мюллера — 10 г сульфата натрия, 25 г бихромата калия на 100 мл воды, жидкость добавляется из расчета 5 мл консерванта на 100 мл мочи, 2) хлороформную воду (5—7,5 мл хлороформа на 1 л воды) из расчета 20—30 мл на 1 л мочи, 3) борную кислоту 1,8 г на 100 мл мочи, 4) тимол 1 г (несколько кристаллов) на 1 л мочи, 5) толуол, ксилол, которые наливают на дно сосуда, по мере заполнения сосуда мочой консервант располагается на поверхности жидкости.

Исследования мочи проводят не позднее 1—1,5 ч после ее выделения. Количество выделенной мочи зависит от возраста пациента, характера питания, питьевого режима и состояния мочеобразовательной системы (табл. 1). При обычном характере питания у взрослого человека суточный диурез колеблется от 0,8 до 1,5 л. У детей количество мочи можно вычислить по формуле $600 + 100 (A - 1) = \text{мл мочи за 24 ч}$, где А — число лет ребенка.

Таблица 1

Возраст	Количество мочи в мл за 24 часа	Возраст	Количество мочи в мл за 24 часа
новорожденный	0-60	Недоношенные и искусственно вскармливаемые	Меньшее количество, чем у доношенных того же возраста
1 день	0-68		
2 день	0-82		
3 день	0-96		
4 день	5-180		
5 день	20-217	1-5 лет	600-900
6 день	42-268	5-10 лет	700-1200
7 день	40-302	10-14 лет	1000-1500
8 день	59-330		
9 день	57-355	Взрослые:	
10 день	106-320		
11 день	120-217	мужчины	1000-2000
12 день	207-246	женщины	1000-1600

При различных физиологических и патологических состояниях суточный диурез может измениться как в сторону увеличения, так и в сторону уменьшения. Увеличение суточного диуреза более 2 л называется **полиурией**. Она может быть за счет усиленного питьевого режима, внутривенного вливания большого количества жидкости, при заболеваниях почек: хронический гломерулонефрит (ГН), хронический пиелонефрит (ПН), ХПН, опухоль почек, сахарный и несахарный диабет, травмы центральной нервной системы (ЦНС), опухоли мозга, аденома гипофиза. Уменьшение суточного диуреза менее 500 мл называется **олигурией**. Олигурия подразделяется на преренальную, ренальную, постренальную, но может быть обусловлена одновременно несколькими причинами. Преренальная олигурия наблюдается при недостаточности кровенаполнения почек. Частой причиной о. является уменьшение объема внеклеточной жидкости (ОВЖ) в результате истощения запасов солей. Натрий теряется через желудочно-кишечный тракт (ЖКТ), через кожу, при рвоте, поносе, чрезмерном промывании желудка, через мочевой тракт при приеме диуретиков, осмотическом диурезе, при заболеваниях почек, сопровождающихся потерей солей (канальцевый некроз, пиелонефрит, минералокортикоидная недостаточность). Потеря натрия может происходить через кожу при потении, при ожогах. Причинами олигурии могут быть: гиповолемия, развивающаяся в результате уменьшения объема циркулирующей крови, при падении тонуса сосудов (кровотечение, гипоальбуминемия); повышение проницаемости капилляров; сердечная недостаточность; застойные явления за счет снижения сердечного выброса (сдавление и тампонада сердца); поражение крупных сосудов; стеноз почечных сосудов; нефросклероз любой этиологии (диабетический, гипертензионный, атеросклеротический). Почечная олигурия сопровождается гломерулонефритами, вызванные антителами к гломерулярной мембране, циркулирующими иммунными комплексами, идиопатический ГН, быстро прогрессирующий ГН при всех вирусных, бактериальных инфекциях, при системных заболеваниях: васкулитах, болезни Шенлейн—Геноха, узелковом периартрите, аллергическом ангите. Тубулоинтерстициальный некроз, острый интерстициальный нефрит (ОИН), ишемическая и токсическая гиповолемия за счет кровопотери или потери солей сопровождаются олигурией. Олигурия имеет место при ишемии в результате травмы, плохого поступления кислорода к нефрону. Олигурию вызывают антибиотики, эндогенные токсины (миоглобин при травме, гемоглобин при трансфузии несовместимой крови). Уменьшение объема мочи может быть при назначении рентгеноконтрастных препаратов, обладающих нефротоксичностью. Олигурия наблюдается при инфекционном мононуклеозе, токсоплазмозе, бруцеллезе, сифилисе. Постренальная

олигурия связана с обтурацией мочевыделительной системы камнем, кровяным сгустком, опухолью.

Полное прекращение выделения мочи называется **анурией**. Выделяют физиологическую анурию у новорожденных в течение первых часов после рождения. Причиной патологической анурии может быть механическая закупорка мочевыводящих путей камнем, опухолью, кровяным сгустком, гипертрофией предстательной железы у мужчин, при тяжелых дегенеративных поражениях почек, при ОПН, ХПН, при поражениях задней доли гипофиза за счет усиленной выработки вазопрессина. Рефлекторная анурия наблюдается при некоторых острых хирургических состояниях в полости малого таза и живота, обширных травмах скелетной мускулатуры.

Суточный диурез делится на дневной (Дд) и ночной (Нд). В норме соотношение Дд : Нд составляет 3—4 : 1. Увеличение Нд называется **никтурия**. Никтурия отмечается при гипертрофии простаты, несахарном и сахарном диабете, тяжелых поражениях почек, при нарушении сердечно-сосудистой системы, язвенной болезни желудка и 12-перстной кишки, может быть ранним признаком развития ХПН. Частота мочеиспускания в норме равна 4—6 раз в сутки. **Поллакиурия** — частое мочеиспускание. Оно может наблюдаться при приеме большого количества жидкости, при спазме или воспалении мочевыводящих путей, мочевого пузыря, при туберкулезе почек.

Оллакиурия — редкое мочеиспускание, наблюдаемое при ограничении питьевого режима и при нервно-рефлекторных нарушениях.

Дизурия — расстройство мочеиспускания, симптом многих заболеваний мочеполовой системы. Встречается при мочекишечном инфаркте новорожденных, уретритах, циститах, цистопиелитах, склерозе шейки мочевого пузыря, при сдавлении мочеиспускательного канала.

Энурез — недержание мочи (enuresis) связанное с нарушением сфинктеров мочевого пузыря. Проявляется мочеиспусканием без позыва, может быть временным симптомом при ряде заболеваний (воспаление мочевых путей, тяжелых лихорадочных заболеваниях, судорогах) или длительным симптомом при заболевании ЦНС.

Проба Зимницкого используется для оценки способности почек разводить и концентрировать мочу. Проводится в условиях стандартного пищевого и питьевого режима при обычной двигательной активности. Проба позволяет определять колебания относительной плотности и количества мочи в течение суток. На кануне исследования медицинская сестра готовит 8 стеклянных банок, на них наклеивает этикетки с указанием часа сбора мочи. Утром, начиная с 6 часов, пациент собирает 8

порций мочи через каждые 3 ч в чистую сухую посуду. Если пациент не может задерживать мочу в течение 3 ч, то он должен собирать мочу в 3-часовой промежуток. Измеряют количество выделенной мочи и относительную плотность в каждой порции. Определяют величину суточного диуреза и соотношение ночного (21—6 ч утра) и дневного (9—21 ч) диуреза, в норме $d_d : d_n = 3—4 : 1$. Колебания количества мочи в отдельных порциях в норме могут быть от 50 до 400 мл, диапазон относительной плотности должен быть от 1,003 до 1,028; чем больше разница между максимальным и минимальным значением относительной плотности, тем выше функциональная способность почек, в норме она не менее 0,007.

Проба Зимницкого раньше выявляет заболевания почек с преимущественным поражением канальцев и позже определяет патологию, связанную с поражением клубочков. При нарушении функционального состояния почек возможны олигурия, полиурия, анурия, увеличение ночного диуреза, снижение амплитуды колебаний относительной плотности в порциях мочи, которая может проявляться снижением максимальной относительной плотности и увеличением минимальной относительной плотности, а также выделение мочи с относительной плотностью равной 1,010, т. е. когда нефроны перестают концентрировать мочу.

Цвет мочи в норме зависит от содержания пигментов: урохрома А и В, уробилина, уроэритрина, гематопорфирина. На цвет влияет относительная плотность: при высокой плотности моча имеет более насыщенный цвет, при низкой — может быть почти бесцветной. Различные примеси продуктов обмена или лекарств также изменяют цвет мочи. В норме цвет соломенно-желтый. Физиологическая гипохромия наблюдается при полиурии, при усиленном питьевом режиме, при приеме мочегонных продуктов питания. Бледные оттенки или бесцветная моча встречается у больных диабетом, ПН, хроническим ГН, ХПН. У новорожденных моча бесцветная, затем становится янтарно-коричневой за счет билирубинурии; моча грудных детей всегда светлее, чем у взрослых. Гиперхромия физиологическая может быть при ограничении питья, усиленном потоотделении. Гиперхромия наблюдается при олигурии за счет формирования отеков, транссудатов и экссудатов, при диспептических расстройствах, при лихорадке, застойной почке. Резкая гиперхромия отмечается при гемолитических состояниях. Темный, почти черный цвет может быть при острой гемолитической почке за счет гемоглобинурии, при алкаптонурии за счет гомогентизиновой кислоты (в результате отсутствия у пациента фермента гомогентизатаксидазы). Красная моча возможна при наличии примеси неизменной крови,

кровяных пигментов, некоторых лекарств: гематурия, гемоглинурия, порфиринурия. Измененная кровь придает моче цвет <мясных помоев> при остром ГН, отравлении уксусной кислотой.

Зеленый цвет моча приобретает при приеме метиленовой сини, при механических желтухах за счет биливердина.

Моча цвета «пива» наблюдается при паренхиматозной желтухе. Молочно-белый цвет может быть при жировом перерождении почки, лимфостазе, нефротическом синдроме, а также гнойной моче, при фосфатурии.

Прозрачность. Нормальная моча прозрачная, и только при стоянии образуется незначительная муть за счет гликозоаминогликанов. Прозрачность мочи может быть полной и неполной. Различают мочу прозрачную, слабо мутную, резко мутную. Помутнение мочи связано с выделениями солей, слизи, содержанием большого количества форменных элементов, бактерий, жира. От мути можно избавиться центрифугированием — оседают соли, эритроциты, лейкоциты; надосадочная жидкость становится прозрачной. Солевое помутнение можно устранить добавлением щелочей или кислот. От бактериального помутнения можно избавиться при фильтровании через специальные фильтры, от жирового — добавлением эфира, хлороформа.

Характер помутнения определяют при микроскопическом исследовании осадка. Помутнение от мочевой кислоты исчезает при добавлении 100 г/л раствора щелочи, от уратов — при нагревании. Раствор щелочи растворяет осадок уратов бесследно. Кислоты способствуют исчезновению помутнения от присутствия фосфатов, мочекислового аммония.

Реакция мочи зависит от характера питания, питьевого режима и в норме у взрослого человека и детей старшего возраста слабо кислая. Щелочная моча может быть при употреблении молочно-растительной пищи, приема щелочных препаратов, кислая — у любителей мясных продуктов. У новорожденных моча кислая до $pH = 5,9$, у недоношенных резко кислая $pH = 4,8—5,4$, при грудном вскармливании $pH = 7,8$, при искусственном $pH = 5,4—6,9$. При патологии щелочная моча бывает при хронических уретритах, циститах за счет бактериального аммиачного брожения, при рассасывании отеков, транссудатов, экссудатов, рвоте, частых промываниях желудка, у больных с язвенной болезнью желудка и 12-перстной кишки из-за приема антоцидов, при приеме соды, минеральных вод, пиелонефритах, вызванных вульгарым протеом, при лечении мочегонными средствами, блокирующими угольную ангидразу, первичном альдостеронизме, у больных с синдромом Иценко — Кушинга,

респираторном алкалозе, при некомпенсированной потере калия. Гипокалиемический алкалоз протекает на фоне кислой мочи, а гиперхлоримический алкалоз — при щелочной моче. Кислотность мочи увеличивается при респираторном и метаболическом ацидозе, специфических заболеваниях почек и мочевого пузыря, острых и хронических заболеваниях почек, ХПН, повышенной температуре, фенилкетонурии, алкаптонурии и лейкомиях.

Запах. Свежевыпущенная моча чаще запаха не имеет, но может появиться специфический нерезкий запах за счет присутствия минимального количества летучих веществ, на характер запаха влияет пища, например, употребление чеснока, хрена, кофе. При длительном стоянии появляется запах аммиака. Запах аммиака отмечается при циститах, пиелитах, пиелонефритах. При диабетическом ацидозе наблюдается запах гнилых яблок за счет кетоновых тел. Если в моче обнаруживается кишечная палочка, то возникает запах прокисшего бульона, запах тухлого мяса появляется при распаде крови, при гниении белка.

Относительная плотность зависит от количества растворенных плотных веществ в 1 л мочи. При обычном рационе питания относительная плотность может колебаться в широких пределах в течение суток. В утренней порции взрослого человека она равна 1,015—1,025; у новорожденных до 1,018; с 5 дня жизни до двух лет 1,002—1,004; в 2—3 года 1,010—1,017; 4—5 лет 1,012—1,020; с 10 лет 1,011—1,025.

Гипостенурия — снижение относительной плотности. Отмечается при усиленном питьевом режиме, приеме мочегонных препаратов. Резкое снижение наблюдается при несахарном диабете (1,001—1,004), постоянно низкая относительная плотность (1,004—1,013) выявляется при хронических заболеваниях почек, ХПН, амилоидозе, диабетическом гломерулосклерозе, поликистозе, острой почечной недостаточности (ОПН). Гипостенурия — частичная утрата способности почек концентрировать и разводить мочу.

Гиперстенурия — повышение относительной плотности. Возможна при сухоедении, лихорадке, обильном потении, при экстраренальной потере жидкости, при остром ГН, сахарном диабете, нефротическом синдроме, при формировании отеков, транссудатов, экссудатов. длительное выделение мочи с относительной плотностью, равной относительной плотности первичной мочи (1,010), называется **изостенурия**. Изостенурия наблюдается в случаях тяжелого поражения почек при хронических гломерулонефритах и нефросклерозе и является плохим прогностическим признаком, свидетельствующим о потере

почкой концентрационных способностей. **Гипоизостенурия** — монотонная низкая относительная плотность в течение суток, отмечается при хронических заболеваниях почек.

Белок в моче. За сутки у взрослого человека выделяется до 150—200 мг белка, у детей до 135 мг. Прохождение белка через почечный фильтр зависит от количества белка в плазме, от состояния базальной мембраны, от формы и размера белковой молекулы. В норме через почечный фильтр проходят белки с молекулярной массой до 70 кД, т. е. альбумины, легкие цепи иммуноглобулинов, многие ферменты. Наблюдается неравномерность выделения белка с мочой в течение суток. Днем белка может быть значительно больше, чем ночью. Увеличение белка в моче называется **протеннурией**, которая является основным синдромом почечной патологии. Различают протеннурию почечную и внепочечную, Почечная протеинурия делится на функциональную и органическую.

Функциональные протеинурии быстро проходят, встречаются после приема большого количества белковой пищи. Различают ортостатическую протеинурию, связанную с нарушением гемодинамики в почках, появление белка в моче наблюдается при перемене положения тела из горизонтального в вертикальное. Протеинурия при гиперлордозе встречается в любом положении тела, выявляется чаще в возрасте 14—15 лет. Протеинурия напряжения появляется при нагрузках на нижние конечности. Встречаются дегидрационные протеинурии у новорожденных при резких перепадах температур, могут быть эмоциональные протеинурии, застойные протеинурии, протеинурии беременных, однако при определенных факторах риска функциональные протеинурии могут перейти в органические.

Органические протеинурии связаны с поражением нефрона. Различают селективные и неселективные протеинурии. При селективной избирательной протеинурии через базальную мембрану клубочка проходят белки не более 100 кД, в основном альбумин. Неселективная протеинурия сопровождается потерей белка разной молекулярной массы, и в моче обнаруживаются все белки плазмы.

Количественное определение белка

Унифицированы 2 способа количественного определения белка в моче: 1) метод Брандберга — Робертса — Стольникова в модификации Эрлиха и Альтхаузена; 2) количественное определение белка в моче по помутнению, образуемому при добавлении сульфосалициловой кислоты (30 г/л).

Метод Брайдберга — Робертса — Столыникова в модификации Эрлиха и Альтхаузена

Принцип. При наслаивании мочи, содержащей белок, на раствор азотной кислоты (500 г/л) или реактив Ларионовой, на границе двух жидкостей образуется белое кольцо, причем если четкое белое нитевидное кольцо появляется точно к 3 минуте, то содержание белка равно 0,033 г/л. Появление кольца ранее 3 мин свидетельствует о большем содержании белка в моче. При наслоении мочи на азотную кислоту могут образовываться кольца не белкового происхождения. Моча, богатая уратами, может дать ложное кольцо, которое обнаруживается выше границы двух сред и исчезает при нагревании. Кольцо из фосфатов беловатого цвета исчезает при добавлении уксусной кислоты. Кольца, образовавшиеся при окислении пигментов мочи азотной кислотой, имеют разноцветные, чаще коричневые цвета.

Степень разведения мочи определяется в зависимости от вида кольца, т. е. его ширины, компактности и времени появления. Если кольцо имеет нитевидную форму, то мочу следует развести в два раза, при широкой форме кольца мочу разводят в четыре раза, при компактной форме — в восемь раз. Количество белка вычисляется путем умножения 0,033 г/л белка на степень разведения. Расчет количества белка в зависимости от степени разведения представлен в таблице 3.

Таблица 2

Время образования кольца, мин	Поправка
1- 1 ¹ / ₄	1 ³ / ₈
1 ¹ / ₄ - 1 ¹ / ₂	1 ¹ / ₄
1 ¹ / ₂ - 1 ³ / ₄	1 ³ / ₁₆
1 ³ / ₄ - 2	1 ¹ / ₈
2 – 2 ¹ / ₂	1 ¹ / ₁₆
2 ¹ / ₂ - 3	1
3- 3 ¹ / ₂	¹⁵ / ₁₆
3 ¹ / ₂ - 4	⁷ / ₈

При количественном определении белка в моче выполняют следующие правила: 1) количественное определение белка производят только в тех порциях мочи, где он был обнаружен при качественном

определении; 2) определение производят в надосадочном слое после центрифугирования; 3) точно соблюдают технику наслаивания исследуемой мочи на раствор азотной кислоты (500 г/л) или реактив Ларионовой в соотношении реактива с мочой 1:1; 4) время появления кольца определяют по секундомеру: при окончательном расчете количества белка учитывают время наслаивания мочи на азотную кислоту, которое равно 15 с; 5) мочу разводят, исходя из свойства кольца, каждое последующее разведение мочи готовят из предыдущего.

Реактив. Раствор азотной кислоты (500 г/л): мерным цилиндром отмеривают 46,7 мл дистиллированной воды, в другом цилиндре отмеривают 53,3 мл азотной кислоты с относительной плотностью 1,4; в колбу наливают 40 мл дистиллированной воды (из заранее отмеренного объема) и приливают к ней небольшими порциями при помешивании азотную кислоту, затем приливают оставшееся количество растворителя; приготовленный раствор переливают в бутылку, маркированную краской.

Вместо азотной кислоты можно использовать реактив Ларионовой: 20—30 г хлорида натрия растворяют в 100 мл дистиллированной воды при подогревании, охлаждают, дают отстояться, фильтруют. К 99 мл фильтрата добавляют 1 мл концентрированной азотной кислоты. Этот реактив имеет ряд преимуществ: белковые кольца более четкие, чем с азотной кислотой, экономится расход кислоты, реактив не прожигает ткани, не образуются цветные кольца на границе наслаивания за счет солей.

Ход определения. В штатив помешают ряд пробирок, в которые предварительно наливают по 1 мл раствора азотной кислоты (500 г/л) или реактива Ларионовой. В пипетку с оттянутым концом набирают 1 мл центрифугированной исследуемой мочи, наслаивают на реактив, после чего включают секундомер. При появлении кольца секундомер выключают, учет результатов реакции производят на черном фоне в проходящем свете.

При наслаивании мочи, в зависимости от количества белка, может появиться компактное, широкое или нитевидное кольцо. Компактное, широкое кольцо появляется тотчас же после наслаивания мочи на реактив. Нитевидное кольцо может появиться сразу, до истечения одной минуты или в промежутке 1—4 мин. При появлении нитевидного кольца в пределах 1—4 мин разводить мочу не нужно! Для вычисления количества белка в этом случае достаточно использовать предложенную таблицу (табл. 3). С. Л. Эрлихом и А. Я. Альтгаузенем введены поправки для вычисления количества белка, позволяющие определять содержание белка при образовании кольца раньше или позднее трех минут.

Пример. При наслаивании мочи на реактив нитевидное кольцо образовалось через 2 мин. Если бы кольцо образовалось к 3 мин, то количество белка было бы равно 0,033 г/л. В данном же случае кольцо образовалось раньше. Соответствующая поправка согласно табл. 3 для времени 2 мин равна $1 \frac{1}{8}$. Это значит, что белка в данной порции мочи будет в $1 \frac{1}{8}$ раза больше, чем 0,033 г/л, т. е. $0,033 \times 1 \frac{1}{8} = 0,037$ г/л. При появлении нитевидного кольца до 1 мин, т. е. через 40—60 с, производят одно разведение мочи в $1 \frac{1}{2}$ раза (2 части мочи + 1 часть воды), а за тем вновь наслаивают разведенную мочу на реактив и регистрируют появление кольца. При расчете результатов учитывают, что моча была разведена в $1 \frac{1}{2}$ раза.

Таблица 4

Расчёт количества белка в зависимости от степени разведения мочи

Количество мочи, мл	Количество воды, мл	Степень разведения	Количество белка, г/л
1	1	2	0.066
1	2	3	0.099
1	3	4	0.132
1	4	5	0.165
1	5	6	0.198
1	6	7	0.231
1	7	8	0.264
1	9	10	0.330

**Метод количественного определения общего белка в моче
с сульфосалициловой кислотой (30 г/л)**

Принцип. Белок с сульфосалициловой кислотой дает помутнение, интенсивность которого зависит от концентрации белка. Измерение производится на фотоэлектроколориметре (ФЭК).

Реактивы. Раствор сульфосалициловой кислоты (30 г/л), раствор хлорида натрия (9 г/л), стандартный раствор альбумина (10 г/л) с человеческой или бычьей сыворотки.

Оборудование и посуда. ФЭК, пробирки центрифужные мерные

Ход определения. В центрифужную пробирку наливают 1,25 мл прозрачной отцентрифугированной мочи, добавляют 3,75 мл раствора сульфосалициловой кислоты. Через 5—12 мин определяют оптическую плотность (ОП) на ФЭК против контроля. Светофильтр оранжево-красный (длина волны 650—590 нм), кювета с длиной оптического пути 5 мм.

Примечание. При высоком содержании белка разводят мочу обычным способом.

Контроль. В центрифужные пробирки наливают 1,25 мл отцентрифугированной мочи и добавляют 3,75 мл раствора хлорида натрия. Производят измерение на ФЭК при тех же условиях, что и опытные пробы.

Однако на практике для облегчения проведения реакции в опыте, контроле и построения калибровочной кривой берут 1 мл мочи и 3 мл кислоты. Расчет ведут по калибровочному графику, для построения которого готовят разведения из стандартного раствора альбумина (10 г/л) из человеческой или бычьей сыворотки в растворе хлорида натрия (9 г/л) с концентрацией белка 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5 г/л. Из каждого разведения берут 1 мл и обрабатывают, как опытные пробы. Прямолинейная зависимость при построении калибровочного графика сохраняется до концентрации 1,0 г/л.

Для определения суточной потери белка моча собирается 24 часа хранится в холодильнике или с использованием консерванта. Затем определяют белок в моче, и полученную величину умножают на суточный диурез. Величину суточной протеинурии выражают в граммах. Например, за сутки выделено 1,5 л мочи, концентрация белка составляет 2 г/л, абсолютное количество белка равно 3 г за сутки (2 x 1,5).

Качественное определение глюкозы

Качественное определение глюкозы в моче является обязательным и может быть проведено реакцией Гайнеса — Акимова.

Принцип. В основу большинства методик положены восстанавливающие свойства глюкозы. Так, в реакции Гайнеса-Акимова при определении глюкозы восстанавливается сульфат меди последовательно в гидроксид меди желтого цвета и в оксид меди кирпично-красного цвета. Реакция протекает при нагревании в щелочной среде.

Подготовительная работа. 1. Мутную мочу центрифугируют. 2. При большом содержании в моче белка (свыше 1 г/л) его удаляют. Для этого подкисляют мочу до слабокислой реакции, нагревают до кипения, затем

охлаждают и фильтруют. Фильтрат должен, быть прозрачным и при добавлении к нему раствора сульфосалициловой кислоты (200 г/л) не должен давать помутнения.

Примечание. В редких случаях при наличии в моче большого количества восстанавливающих веществ (мочевая кислота, индикан, креатинин, желчные пигменты и др.) их необходимо удалить. В пробирку наливают 8 мл мочи, прибавляют 1 мл 96° спирта и небольшое количество активированного угля; восстанавливающие вещества адсорбируются углем, оседающим на дно пробирки.

Реакция Гайнеса — Акимова

Реактив (по прописи Акимова): 13,3 г химически чистого сульфата меди растворяют в 400 мл дистиллированной воды (раствор 1); в другой посуде растворяют 50 г едкого натра в 400 мл дистиллированной воды (раствор 2); далее разводят 15 г глицерина в 200 мл дистиллированной воды (раствор 3). Смешивают 1-й и 2-й растворы а к этой смеси при постоянном помешивании прибавляют небольшими порциями раствор 3. Получают готовый реактив синего цвета. Он годен в течение длительного времени.

Ход определения. В пробирку помещают 3—4 мл реактива Гайнеса и 8—12 капель мочи. Нагревают ее над пламенем до закипания смеси, а затем кипятят в течение 1—2 мин или кипятят в водяной бане. При наличии глюкозы голубой цвет переходит в желтый, а при отсутствии — цвет реактива Гайнеса не изменяется. На практике чаще к 1 капля мочи прибавляют 9 капель реактива и кипятят в водяной бане 1—2 мин. На результаты анализов могут влиять и другие редуцирующие вещества мочи (ацетилсалициловая кислота, ПАСК, кофеин, антибиотики, поливитамины, аскорбиновая кислота, хлорамин, желчные кислоты, билирубин), от которых необходимо избавляться.

Количественное определение глюкозы

Унифицированы способы количественного определения глюкозы в моче по цветной реакции с орто-толуидином и глюкозо-оксидазный метод.

Количественное определение глюкозы производят только в тех порциях мочи, в которых она была обнаружена качественно. При определении глюкозы в суточном количестве мочи у больных сахарным диабетом исследуют три порции мочи, собранные через каждые 8 ч. Во избежание ложноположительных результатов перед определением

глюкозы приостанавливают лечение тетрациклином, хлортетрациклином, так как они выделяются с мочой и искажают результаты определений.

Количественное определение глюкозы в моче орто-толуидиновым методом

Принцип. Глюкоза образует с орто-толуидином в кислой среде при нагревании зелено-синее окрашивание, интенсивность которого пропорциональна концентрации глюкозы.

Реактивы.

1. Раствор трихлоруксусной (ТХУ) кислоты (30 г/л): 3 г ТХУ доводят дистиллированной водой до 100 мл.
2. Стабилизированный раствор орто-толуидина в ледяной уксусной кислоте (в 94 мл ледяной уксусной кислоты растворяют 0,15 г тиомочевины и добавляют 6 мл орто-толуидина). Реактив стоек при хранении в холодильнике.
3. Стандартный раствор глюкозы: в мерную колбу на 100 мл наливают 50 мл раствора бензойной кислоты (2 г/л), прибавляют 500 мг высушенной до постоянной массы глюкозы; после полного растворения глюкозы доливают раствором бензойной кислоты (2 г/л) до метки. Концентрация глюкозы в приготовленном растворе равна 5 г/л (27,5 ммоль/л). Из стандартного раствора готовят рабочий раствор, содержащий 1 г/л (5,5 ммоль/л).

Ход определения. Мочу разбавляют в 2—10 раз. В пробирку для центрифугирования наливают 0,1 мл мочи, добавляют 1,0 мл раствора ТХУ (30 г/л). Хорошо перемешивают содержимое, центрифугируют 5 мин при 1500 об/мин. В опытную пробирку приливают 0,5 мл надосадочной жидкости, добавляют 4,5 мл орто-толуидинового реактива, смесь нагревают точно 8 мин в хорошо кипящей водяной бане. Пробирки необходимо покрывать фольгой и строго соблюдать временной и температурный режим. Пробирку вынимают, охлаждают под водопроводной водой до комнатной температуры 18—22 °С и фотометрируют окрашенный раствор опытной пробы по отношению к холостой пробе (длина волны 590—650 нм с оранжевым или красным светофильтром) и толщине слоя 1 см не позже, чем через 20 мин после обработки. Снимают показания экстинкции (оптической плотности).

Раствор для контроля (достаточно одного раствора для целой серии определений). К 0,5 мл раствора ТХУ (30 г/л) добавляют 4,5 мл орто-толуидинового реактива. Смесь не центрифугируют, но обрабатывают так же, как и опытные пробы.

Стандартный раствор. К 0,1 мл стандартного раствора глюкозы (концентрация 1,0 г/л) добавляют 1,0 мл раствора ТХУ (30 г/л), перемешивают, отбирают 0,5 мл, добавляют 4,5 мл орто-толуидинового реактива и обрабатывают параллельно с опытной пробой.

Расчет ведут по формуле:

$$C_{\text{он}} = (E_{\text{он}} / E_{\text{ст}}) \times C_{\text{ст}}$$

где $C_{\text{он}}$ — концентрация глюкозы в пробе в ммоль/л;

$C_{\text{ст}}$ — концентрация глюкозы в стандартном растворе в ммоль/л;

$E_{\text{он}}$ — оптическая плотность опытной пробы;

$E_{\text{ст}}$ — оптическая плотность стандартной пробы. Полученный результат умножают на степень разведения.

Пример: $E_{\text{он}} = 0,6$. $E_{\text{ст}} = 0,3$. $C_{\text{ст}} = 5,5$ ммоль/л. $C_{\text{он}} = (0,6/0,3) \times 5,5 = 11,0$ ммоль/л

Коэффициенты пересчета: % глюкозы в моче $\times 55,5 =$ ммоль/л; мг % глюкозы в моче $\times 0,0555 =$ ммоль/л.

Для определения глюкозы мочу собирают за 24 ч и измеряют ее объем. Определяют содержание глюкозы вышеописанным способом. Например, содержание глюкозы составляет 4,1 ммоль/л, суточный диурез 1,5 л. Следовательно, в суточном количестве мочи концентраций глюкозы равна $4,1 \text{ ммоль/л} \times 1,5 = 6,15 \text{ ммоль/л}$.

Определение билирубина, уробилина

Определение билирубина в моче производят по назначению врача. Лаборант обязан определить билирубин и без назначения врача, если моча имеет зеленовато-желтый, желтый, желтушный цвет и при окрашивании пены в желтый цвет при взбалтывании мочи.

Билирубин в моче определяют следующими методами: проба Розина, проба Гаррисона — Фуше.

Принцип. Билирубин под влиянием окислителя превращается в изумрудно-зеленый биливердин.

Проба Розина. *Реактив.* Спиртовой раствор йода (10 г/л): 1 г кристаллического йода растворяют в цилиндре вместимостью 100 мл в 20—30 мл 96° спирта, а затем доливают спиртом до метки.

Ход определения. В химическую пробирку наливают 4—5 мл исследуемой мочи и осторожно наслаивают на нее спиртовой раствор йода (если моча имеет низкую относительную плотность, то следует

наслаивать ее на спиртовой раствор йода). При наличии билирубина на границе между жидкостями образуется зеленое кольцо (при приеме антипирина, а также при содержании в моче кровяного пигмента проба оказывается положительной). У здорового человека эта проба отрицательна.

Проба Гаррисона — Фуше.

Реактивы.

1. Раствор хлорида бария (150 г/л).
2. Реактив Фуше: 26 г трихлоруксусной кислоты помещают в мерную колбу на 100 мл, растворяют в 60—70 мл дистиллированной воды и доливают водой до метки, вслед за этим добавляют 1 г хлорного железа.

Ход определения. В химическую пробирку наливают 10 мл исследуемой мочи, прибавляют 5 мл раствора хлорида бария. Содержимое пробирки хорошо перемешивают и фильтруют через бумажный фильтр в другую химическую пробирку. По окончании фильтрации бумажный фильтр снимают и помещают на предметное стекло. В центр фильтра, где находится осадок хлорида бария, наносят 2—3 капли реактива Фуше. При наличии билирубина появляется пятно, окрашенное в зеленый цвет.

Определение индикана проводят с помощью реакции Яффе (по назначению врача).

Принцип. Индикан превращается в индоксил с последующим окислением его в синее индиго; превращению индикана в индоксил способствует хлоростоводородная кислота, а окислению индоксила в синее индиго — хлорид железа или перманганат калия.

Реакция Яффе

Реактивы

1. Раствор перманганата калия (20 г/л).
2. Концентрированная хлористоводородная кислота.
3. Хлороформ.

Ход определения. Исследуемую мочу освобождают от белка и фильтруют. В химическую пробирку наливают 4—6 мл профильтрованной мочи, приливают равный объем концентрированной хлористоводородной кислоты, добавляют 2—3 мл хлороформа и 1 мл раствора перманганата калия, закрывают пробкой и осторожно перемешивают катанием по столу. В случае сильного встряхивания может образоваться стойкая эмульсия, препятствующая разделению жидкости на слои. При наличии индикана хлороформ окрашивается в голубой, розовый

или синий цвет. При приеме больными препарата йода слой хлороформа также окрашивается в розовый цвет. Дифференцируют окраску, обусловленную приемом лекарств, путем использования тиосульфатной пробы: при добавлении к пробе кристалликов тиосульфата натрия окраска исчезает, цвет, зависящий от индиго, сохраняется.

В моче здорового человека индикан содержится в незначительных количествах и обычными качественными пробами не обнаруживается. Индиканурия наблюдается при непроходимости тонкого кишечника, колите, туберкулезе кишечника, при усилении гнилостных процессов в кишечнике, при длительных запорах, перитоните, распаде опухолевой ткани, при тифе, при наличии гнойных очагов в организме, когда происходит усиленный распад тканевых белков (эмпиема, абсцесс, гнилостный бронхит).

ФУНКЦИИ ЖЕЛУДКА

Основными функциями желудка являются химическая обработка пищи и транспортировка ее небольшими порциями в кишечник. Это осуществляется за счет секреторной и моторной функций. Кроме того, желудок выполняет всасывательную, выделительную и инкреторную функции.

Секреторная функция желудка проявляется в выработке соляной кислоты ферментов, слизи, тканевых гормонов. В состоянии покоя (натошак) из желудка здорового человека можно извлечь относительно небольшое количество желудочного содержимого (около 5—50 мл), которое представляет собой смесь из проглоченной слюны, секрета слизистой желез желудка, слизи. Содержимое желудка натошак имеет слабокислую или нейтральную реакцию (рН колеблется от 3,0 до 7,0). У человека в натошачевой порции, получаемой зондом, почти всегда содержится небольшое количество свободной соляной кислоты и ферментов.

Соляную кислоту вырабатывают париетальные клетки. Концентрация ее в желудочном соке человека равна 4—6 г/л. В момент образования соляная кислота имеет рН от 1,5 до 1. Высокое содержание водородных ионов нейтрализуется щелочным секретом пилорических желез, пищей, слюной, гастромукопротеинами.

Содержащаяся в желудочном соке соляная кислота выполняет многообразные функции. Наиважнейшей из них является обеспечение оптимальных условий для протеолитического действия пепсина. Соляная кислота участвует в возбуждении деятельности главных желез желудка,

вызывает набухание белков пищи, воздействует на хрящи и соединительную ткань, способствуя улучшению ферментативного протеолиза, готовя их к перевариванию в щелочной среде в кишечнике, переводит неактивный гастрексин в активный, улучшает работу пилорического сфинктера, попав на слизистую 12-перстной кишки, стимулирует образование гормона секретина, оказывает бактериостатическое и бактерицидное действие на флору, поступающую с пищей, декальцинирует и размягчает костную ткань, принимает активное участие в обмене кальция и железа.

Пепсин вырабатывается главными клетками и фундальных желез в виде профермента пепсиногена. В присутствии соляной кислоты пепсиноген активируется и превращается в пепсин. Эта реакция носит аутокаталитический характер, т. е. образовавшись, пепсин ускоряет превращение остальной массы пепсиногена в пепсин.

В настоящее время изучено несколько форм пепсина (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7). Все они различаются по электрофоретической подвижности и протеолитическим свойствам. Пепсин 1 называется гастрексин, 6-я к 7-я формы пепсина синтезируются пилорическими железами. С мочой экскретируются только 2 и 3 пепсины. Максимальная активность пепсина проявляется в диапазоне $\text{pH} = 1,5\text{—}2,4$, тогда как гастрексина — $\text{pH} = 2,8\text{—}4,0$. Отчетливое падение активности гастрексина наступает при $\text{pH} = 4,4$, остальных же пепсинов при $\text{pH} = 4,0$. Пепсин почти полностью утрачивает свое действие при $\text{pH} = 5,5$, а в интервале $\text{pH} = 7,5\text{—}8,0$ наблюдается необратимая дезактивация фермента. Переваривающая способность пепсина снижается на 30% при $\text{pH} = 4,5$, т. е. в отсутствие свободной, но при наличии связанной соляной кислоты.

Известно, что протеолитическая активность пепсина очень велика. Так, 1 г чистого фермента в течение 2 ч может переварить 50 кг денатурированного яичного белка или вызвать створаживание 100 тыс. л молока.

У практически здоровых людей содержание пепсина и гастрексина одинаково. Роль последнего возрастает при патологическом снижении кислотообразования, когда pH среды оказывается ближе к оптимуму активности гастрексина, чем пепсина.

В слизистой желудка выявляется также *уреаза* — фермент, расщепляющий мочевины с образованием аммиака, располагающийся преимущественно в поверхностных слоях слизистой. Предполагают, что уреаза участвует в нейтрализации избыточного количества соляной кислоты. Покровно-ямочный эпителий секретирует лизоцим.

Кроме того, у детей в желудочном соке находится *липаза*, которая в зоне рН от 5,3 до 7,8 переваривает эмульгированные жиры. Липаза и амилаза выделяются пилорическими железами.

Благодаря секреторной деятельности покровно-ямочного эпителия, пилорических желез и мукоцитов вырабатывается *желудочная слизь*. Установлено, что она представляет собой сложную коллоидную жидкость, содержащую белки, углеводы, неорганические вещества, гликозаминогликаны.

Цитоплазма клеток покровно-ямочного эпителия выделяет так называемую “видимую” слизь, которая тонким слоем обволакивает внутреннюю поверхность слизистой желудка и обеспечивает смазку слизистой оболочки, защищая ее от механических, физических и химических раздражителей. Крупномолекулярные соединения желудочной слизи придают ей буферные свойства. Так, 1 г муцина способен связать около 18 мл 0,1 раствора соляной кислоты или щелочи.

Видимая слизь более устойчива к кислотно-пептическому воздействию, чем сами эпителиальные клетки, и поэтому относится к факторам, предотвращающим “самопереваривание” желудка. Путем ферментативного расщепления из видимой нерастворимой слизи образуются гликозаминогликаны, которые так же обладают антипептическими свойствами. Кроме того, слизь защищает витамины группы В и С от воздействия кислого содержимого желудка.

В настоящее время в желудочной слизи человека открыт целый ряд крупномолекулярных компонентов: вещества, стимулирующие кроветворение (гастропоэтины) гастромукопротеины (фактор Кастла); вещества, связывающие гистамин; вещества, обладающие липотропным действием, а также белки, которые соответствуют белковым компонентом крови.

Двигательно-эвакуаторная функция желудка. У здоровых людей вне пищеварения (натощак) наблюдаются периодические движения желудка через каждые 1,5—2 ч. Во время приема пищи эти движения исчезают, взамен их появляются другие разновидности движений:

- 1) мелкие и частые (1-несколько раз в минуту),
- 2) глубокие, редкие и сильные,
- 3) мелкие, частые сокращения самой слизистой оболочки желудка,
- 4) периодические сокращения и расслабления пилорического сфинктера.

Полагают, что частые и мелкие движения призваны смешивать пищу с желудочным соком; редкие, глубокие и сильные сокращения

способствуют эвакуации пищевой массы из желудка в 12-перстную кишку. Периодические сокращения и расслабления пилорического сфинктера регулируют переход пищевой массы из желудка в кишечник. Следовательно, моторная функция желудка складывается из перистальтических движений мышечного слоя желудка, а также и периодического сокращения и расслабления пилорических мышц. Тонус стенок желудка повышается при раздражении вагуса, а также под влиянием гормона гастрин.

Выделительная функция. В желудочном соке человека обнаруживается ряд веществ, которые выделяются из организма в виде экскретов (мочевина, мочева кислота, креатинин). Кроме того, в соке всегда содержатся в небольших количествах кальций, магний, калий, натрий, фосфор. Несмотря на небольшую концентрацию кальция, присутствие его в желудочном соке является результатом секреторной активности покровно-ямочного эпителия. Содержание калия в желудочном соке человека почти постоянное и не зависит от степени кислотности, тогда как концентрация натрия обратно пропорциональна количеству соляной кислоты. Некоторые химические вещества, введенные в организм парентерально, выделяются слизистой желудка, к ним относят ряд красителей (нейтральрот, метиленблау).

Всасывательная функция. В желудке всасывание происходит незначительно, в основном всасываются частично вода, алкоголь, железо, лекарства, красители, однако при патологических процессах в желудке, при пилороспазме, при задержке пищи и других веществ в полости желудка всасывание приобретает активный характер.

Химическое исследование желудочного содержимого

Кислотность желудочного сока определяется титрованием 0,1N NaOH в присутствии индикаторов. Для определения общей кислотности используют спиртовой раствор фенолфталеина (10 г/л: 1 г фенолфталеина на 106 мл 96⁰ этанола). Раствор стойкий, в кислой среде индикатор остается бесцветным, а в щелочной при полной нейтрализации всех кислореагирующих веществ становится розово-красным. *Общая кислотность* представляет собой все кислореагирующие вещества желудочного сока и состоит из свободной, связанной соляной кислоты и кислотного остатка. *Свободную соляную кислоту* определяют, используя для титрования 5 г/л спиртовой раствор диметиламиноазобензола (0,5 г реактива растворяют в 100 мл 96⁰ этанола), в кислой среде индикатор окрашивает раствор в красный цвет, а в момент полной нейтрализации свободной соляной кислоты придает раствору оранжево-желтый цвет

(цвет <семги>) *Свободная соляная кислота* — это свободно диссоциированные ионы H^+ и Cl^- в желудочном содержимом.

Связанную соляную кислоту выявляют при титровании в присутствии 10 г/л водного раствора ализарина С, который в кислом соке имеет желтый цвет к переходит в слабо фиолетовый оттенок в щелочной среде, при этом нейтрализуются все кислые валентности, кроме связанной соляной кислоты. Связанная соляная кислота это кислота, которая находится в соединении с белками и продуктами их переваривания. Кислотный остаток представлен кислыми фосфатами.

Кислотность желудочного сока определяется методом Михаэлиса.

Реактивы.

1. Спиртовой раствор диметиламидаозобензола (5 г/л).
2. Спиртовой раствор фенолфталеина (10 г/л).
3. 0,1 N NaOH.

Ход определения. В стаканчик наливают 5 мл профильтрованного через два слоя марли сока, добавляют 1-2 капли смеси индикаторов, титруют 0,1 N NaOH от красного цвета до цвета семги (оранжево-желтый) и определяют свободную соляную кислоту, каждый раз отмечая количество щелочи, пошедшее на титрование. Далее титруют от цвета <семги> до лимонно желтого. Продолжают титровать до перехода цвета в стойкий розово-красный. Количество щелочи, пошедшее на все титрование, позволяет определить общую кислотность в присутствии фенолфталеина. Расчет проводят на 100 мл сока, поэтому количество щелочи, израсходованной на титрование, необходимо умножить на 20. Одна титрационная единица соответствует концентрации соляной кислоты в 1 ммоль/л (или мэкв/л).

Пример. Красный цвет — начало титрования; цвет<семги> — 1,2 мл 0,1 N р-ра NaOH; лимонно-желтый — 2,8 мл 0,1 N р-ра NaOH; стойко-розовый — 3,2 мл 0,1 N р-ра NaOH. Общая кислотность = $(3,2 \times 20) = 64$ ммоль/л. Свободная кислотность = $(1,2 \times 20) = 24$ ммоль/л.

Михаэлис предположил, что сумма свободной и связанной кислоты определяется по среднему арифметическому между количеством щелочи, пошедшей на титрование от лимонно-желтого до стойко-розового: $((2,8 + 3,2) / 2) \times 20 = 60$ ммоль/л. Из полученной величины вычитают количество свободной соляной кислоты и определяют связанную. Связанная кислотность = $(60-24) = 32$ ммоль/л. Кислотный остаток = количество

общей кислотности — (сумма свободной и связанной) = $64 - 60 = 4$ ммоль/л.

Метод Тепфера применяют для титрования сока, в котором отсутствует свободная соляная кислота.

Реактивы

1. Спиртовой раствор диметиламидаозобензола (5 г/л).
2. Спирт. раствор фенолфталеина (10 г/л).
3. Раствор ализарина С (ализаринсульфоновокислого натрия) (10 г/л).
4. 0,1 N NaOH

Ход определения. Исследование проводят в двух стаканчиках, в каждый наливают по 5 мл профильтрованного сока. В 1 стаканчик капают 1—2 капли смеси фенолфталеина и диметиламидаозобензола, а во второй — ализарин С. Если в соке отсутствует свободная соляная кислота, то в первом стаканчике содержимое окрашивается в желтый цвет. Сок в первом стаканчике титруют 0,1 N р-ром NaOH от желтого цвета до стойко-розового, минуя лимонно-желтый цвет. Определяют общую кислотность, умножая количество щелочи, пошедшей на титрование, на 20. Свободная соляная кислота в этом соке равна 0. Во втором стаканчике титруют от желтого цвета до перехода в слабо-фиолетовый и определяют все кислореагирующие вещества, кроме связанной соляной кислоты, а затем высчитывают связанную.

Пример. Показания первого стаканчика: цвет семги — 0; стойко-розовый — 2,2 мл 0,1 N р-ра NaOH. Свободная соляная кислота = $0 \times 20 = 0$. Общая кислотность = $2,2 \times 20 = 44$ ммоль/л.

Второй стаканчик: желтый — 2,2 мл 0,1 N р-ра NaOH; слабо-фиолетовый — 3,2 мл 0,1 N р-ра NaOH. Сумма свободной кислоты и кислотного остатка = $(3,2 - 2,2) \times 20 = 20$ ммоль/л. Связанная кислота = общая кислотность — (сумма свободной кислоты и кислотного остатка) = $44 - 20 = 24$ ммоль/л.

Дефицит соляной кислоты определяют в любой порции желудочного сока, кроме натошакковой, в которой отсутствует свободная соляная кислота, при угнетении и кислотообразования. Максимально возможный дефицит соляной кислоты составляет 40 ммоль/л. Этот дефицит указывает на полное прекращение секреции соляной кислоты, т. е. при истинной целлюлярной ахлоргидрии — состоянии, при котором отсутствует свободная соляная кислота в желудочном содержимом в результате атрофических процессов в слизистой желез желудка, при уменьшении количества париетальных клеток. Если дефицит меньше, чем

40 ммоль/л, то это свидетельствует о том, что кислота выделяется, но она или нейтрализуется, или связывается с белками и в свободном виде не определяется, т. е. имеет место относительная минимальная или химическая ахлоргидрия. Относительная ахлоргидрия может быть в результате полной нейтрализации всей кислоты бикарбонатом, и тогда отсутствует и свободная, и связанная кислота. Бикарбонат может нейтрализовать только часть кислоты, а другая часть будет связываться слизью, белками, и можно будет выявить связанную соляную кислоту. При ахилии в желудочном содержимом отсутствуют свободная соляная кислота и пепсин. Функциональная ахилия желудка — временное угнетение желудочной секреции без органических поражений железистого аппарата желудка. Она возникает под влиянием различных интоксикаций, нервного и физического переутомлений. Для определения дефицита соляной кислоты сок титруют 0,1 N раствором соляной кислоты в присутствии индикатора раствора диметиламидаозобензола (5 г/л) до появления свободной соляной кислоты.

Реактивы. 1. 0,1 N HCl.

2. Спиртовой раствор диметиламидаозобензола (5 г/л).

Ход определения. К 5 мл профильтрованного сока добавляют 1—2 капли индикатора и титруют 0,1 соляной кислотой до появления красного цвета. Полученное количество щелочи умножают на 20, определяют дефицит соляной кислоты.

Расчет. На титрование 5 мл сока пошло 1,2 мл 0,1 N раствора на (1,2 x 20 = 24 ммоль/л). Дефицит соляной кислоты свидетельствует о подавлении секреторной функции желудка вплоть до полной ахлоргидрии. Кроме того, дефицит указывает на содержание щелочных компонентов, не связанных с кислотой. Высокий дефицит имеет место при содержании в желудочном содержимом гноя, крови, продуктов тканевого распада.

Определение дебита соляной кислоты. Для получения количественной характеристики кислотообразующей функции желудка исследуют абсолютную величину продукции соляной кислоты во времени — дебит-час соляной кислоты. Дебит-час свободной кислоты — это количество свободной соляной кислоты, выработанной париетальными клетками за час, вычисляемое по формуле:

$$D_{\text{ч}} = (V_1E_1 + V_2E_2 + V_3E_3 + V_4E_4) \times 0,001 = \text{ммоль/ч},$$

где $D_{\text{ч}}$ — дебит-час свободной соляной кислоты в ммоль/ч; V — объем каждой порции в мл в базальную или стимулированную секрецию; E —

концентрация свободной соляной кислоты в каждой 15—минутной порции в ммоль/л; 0,001 — количество соляной кислоты в 1 мл желудочного сока при концентрации ее в 1 ммоль/л.

Для получения истинных значений дебит-часа необходимо полностью извлекать желудочное содержимое.

Определяют дебит-час базальной секреции и называют эту величину базальная кислотная продукция (БКП или ВАО — basal acid output). Она отражает степень возбудимости нервного аппарата желудка. Дебит-час стимулированной секреции, СКП — стимулированная кислотная продукция (SAO — submaximal acid output). Дебит-час максимальной кислотной продукции, МКП (MAO — maximal acid output), зависит от морфологического состояния желез желудка и от количества париетальных клеток.

Дебит натошачевой порции определяют по формуле:

$$\text{Дебит-натошак} = V \cdot E \times 0,001 \text{ ммоль/натошак.}$$

Для расчета дебит-часа соляной кислоты можно пользоваться нанограммой Калиниченко В. В. (рис. 8), Зная объем порции и её кислотность и соединив эти значения, на месте пересечения линейки с вертикальной линией можно определить дебит в мг/ч или ммоль/ч. Необходимо увеличить масштаб делений на вертикальной прямой для получения более точных значений дебита, а для этого рисунок нанограммы из учебника требуется скопировать в большем масштабе.

Определение молочной кислоты. Молочная кислота в желудочном соке появляется при выраженной ахлоргидрии, при застойных явлениях в желудке, при онкозаболеваниях, образуется в результате патологического брожения, вызванного палочкой молочнокислого брожения, и указывает на отсутствие свободной соляной кислоты, свидетельствует о застое в желудке или появлении опухоли желудка. Исследуется натошачевая порция. Проводится качественная **реакция Уффельмана** в натошачевой порции (нулевая порция) при отсутствии свободной соляной кислоты.

Принцип. Молочная кислота с солями трехвалентного железа изменяет цвет сока за счет образования лактата железа (желто-зеленое окрашивание).

Реактивы. 1. Раствор фенола (10 г/л).

2. Раствор хлорида железа (100 г/л).

Ход определения. К 2 мл раствора фенола добавляют одну каплю раствора хлорида железа. После появления фиолетовой окраски раствор разводят водой до светло-фиолетового оттенка. Далее добавляют по

каплям профильтрованный сок, при наличии молочной кислоты появляется лимонно-желтый цвет. Интенсивность окраски зависит от количества молочной кислоты в желудочном содержимом. Если в желудочном соке присутствует свободная соляная кислота, то она мешает определению молочной кислоты. В таких случаях проводят определение молочной кислоты с эфирной вытяжкой: к 5 мл желудочного сока приливают 8 мл эфира, перемешивают, отсасывают верхний эфирный слой. Остатки эфира выпаривают на водяной бане. К осадку приливают 2 мл воды и 2 капли раствора хлорного железа. Появляется зеленовато-желтое окрашивание в присутствии молочной кислоты, интенсивность окрашивания зависит от ее количества в желудочном содержимом.

Показатели желудочной секреции в норме.

Натощак: объем 5—50 мл, общая кислотность до 40 ммоль/л, свободная кислота до 20 ммоль/л, связанная кислота до 10 ммоль/л, кислотный остаток до 8 ммоль/л, дебит-час общей кислотности до 2 ммоль/л, дебит-час свободной кислотности до 1 ммоль/л.

Базальная секреция: часовое напряжение 50—100 мл, общая кислотность 40—60 ммоль/л, свободная соляная кислота 20—40 ммоль/л, связанная соляная кислота 10—20 ммоль/л, кислотный остаток 2—8 ммоль/л, дебит-час общей кислотности 1,5 ммоль/ч, дебит-час свободной соляной кислоты 1,0—4,0 ммоль/ч.

Показатели желудочной секреции на пищевые пробные раздражители: часовое напряжение 50—110 мл, общая кислотность 40—60 ммоль/л, свободная соляная кислота 20—40 ммоль/л, связанная соляная кислота 10—20 ммоль/л, кислотный остаток 2—8 ммоль/л, дебит-час общей кислотности 1,5—6,0 ммоль/ч, дебит-час свободной соляной кислоты 1,0—4,5 ммоль/ч.

Показатели желудочной секреции на субмаксимальный гистаминовый тест: часовое напряжение 100—110 мл, общая кислотность 80—100 ммоль/л, свободная соляная кислота 65—85 ммоль/л, связанная соляная кислота 12—23 ммоль/л, кислотный остаток 3—12 ммоль/л, дебит-час общей соляной кислоты 8,0—14,0 ммоль/ч, дебит-час свободной соляной кислоты 6,5—14,0 ммоль/ч.

Показатели желудочной секреции на максимальный гистаминовый тест: часовое напряжение 150—200 мл, общая кислотность 100—120 ммоль/л, свободная соляная кислота 90—120 ммоль/л, дебит-час общей кислотности 18—26 ммоль/ч, дебит-час свободной кислотности 16—24 ммоль/ч.

Гиперсекреция — увеличение количества соляной кислоты натошак до 100—150 мл и выше. Наблюдается при гиперацидном гастрите, язве желудка и 12-перстной кишки. Гиперацидное состояние — увеличение количества соляной кислоты выше нормы. Гипацидное состояние — снижение концентрации соляной кислоты в желудочном содержимом ниже нормы. Анацидное состояние — отсутствие с соляной кислоты. Ахилия — отсутствие свободной соляной кислоты и пепсина в желудочном содержимом.

Желудочная секреция у практически здоровых лиц варьирует в довольно широких пределах. Вариабельность показателей кислотности желудочного сока обусловлена конституциональными особенностями нейрогуморальной регуляции и структуры желудочных желез. Желудочная секреция меняется в зависимости от характера патологического процесса в слизистой желез желудка. Секреция повышается при эмоциональных состояниях, пилородуоденитах, антральных гастритах, гипертрофических гастритах, язвенной болезни желудка и 12-перстной кишки, гастриномах, тиреотоксикозах, гиперпаратиреодизме, опухолях мозга, неврастении. Высокие цифры базальной секреции, которые отражают степень возбудимости нервного аппарата желудка, наблюдаются у больных с гипертрофическими процессами в слизистой желез желудка, язвенной болезни 12-перстной кишки. В последнем случае так же отмечаются высокие цифры стимулированной секреции.

Снижается желудочная секреция у рабочих горячих цехов, при депрессии, при употреблении большого количества жира, дефиците или резком ограничении поваренной соли. Гипацидность имеет место при атрофических гастритах, язвенной болезни на фоне атрофического гастрита, раке желудка, энтероколитах, холециститах, циррозе печени, микседеме. Снижение или прекращение секреции соляной кислоты сопровождается повышением содержания гастрин в крови, что оказывает влияние на содержание других интестинальных гормонов. Уменьшение или отсутствие секреции соляной кислоты лежит в основе ряда нарушений пищеварения и появления клинических синдромов. Невысокие цифры кислотности желудочного сока, полученные при неоднократных исследованиях сильными раздражителями (гистамин, пентагастрин), в большей степени свидетельствуют об атрофических изменениях в слизистой оболочке желудка, что значительно снижает риск развития эрозивно-язвенных поражений пилорического отдела желудка и 12-перстной кишки. Снижение БКП и СКП наблюдается при хронических заболеваниях органов пищеварения (хронических энтеритах, холециститах, циррозе печени, при органических заболеваниях желудка).

В норме при употреблении обычных пищевых раздражителей БКП относится к СКП, как 1:1, при парентеральных раздражителях (простой и максимальный гистаминовый тест, введение пентогастрина) соотношение БКП:СКП:МКП = 1:3:6. При атрофических процессах, при истинной ахлоргидрии, при гистаминно-рефлекторной ахлоргидрии это соотношение будет равно 1:1,5:3. При гипертрофических процессах в слизистой желез желудка соотношение может быть 1:6:12. Такая картина имеет место при гипертрофических гастритах, язвах желудка на фоне гипертрофического гастрита, при язвенной болезни 12-перстной кишки.

Титрометрические методы исследования кислотности сока имеют ряд недостатков: не позволяют определить кислотообразующую функцию желудка непосредственно на раздражитель, нельзя установить характер патологических изменений главных и пилорических желез желудка. Предел чувствительности индикаторов недостаточно велик. Методы требуют использования большого количества посуды при титровании порций.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ФЕРМЕНТООБРАЗУЮЩЕЙ ФУНКЦИИ ЖЕЛУДКА

Определение активности пепсина по Туголукову В. Н.

Принцип. Пепсин расщепляет белковый субстрат раствора сухой плазмы. Об активности пепсина судят по количеству нерасщепившегося субстрата, осаждаемого трихлоруксусной кислотой.

Реактивы

1. Раствор сухой плазмы (20 г/л): 2 г растворяют в 60—70 мл 0,1 N соляной кислоты и доводят до 100 мл.
2. Раствор трихлоруксусной кислоты (100 г/л): 10 г ТХУ растворяют в 100 мл.

Ход определения. Желудочный сок разводят в 100 раз. В пробирку наливают 9,9 мл воды и приливают 0,1 мл смеси, хорошо перемешивают, 1 мл этого сока наливают в специальную градуированную пробирку — опытная проба.

Часть сока кипятят, охлаждают, разводят в 100 раз, 1 мл сока переносят во вторую пробирку, которая является контрольной.

В каждую пробирку доливают по 2 мл 20 г/л раствора сухой плазмы и ставят в термостат на 20 часов при 37°C. Затем в каждую пробирку приливают по 2,0 мл 100 г/л трихлоруксусной кислоты. Содержимое

перемешивают, центрифугируют 10 мин при 1500 об/мин, измеряют величину осадка в первой и второй порции. Расчет проводят по формуле:

$$M = (A-B) \times (40/A),$$

где М — показатель переваривания, А — величина осадка в контрольной пробе, В — величина осадка опытной пробы, 40 — константа, предложенная автором. По величине М находят содержание пепсина в 0,01 мл сока. Полученную величину умножают на 100, так как сок был предварительно разведён. В норме содержание пепсина на пробный завтрак равно 21—45 г/л, на гистаминовый тест — 50—65 г/л. Так как фармакологический препарат пепсина содержит 1 г/100 мл действующего начала, то истинная концентрация пепсина будет в 100 раз меньше (0,21—0,45 и 0,50—0,65 г/л).

Пример расчета. Если М=18, то содержание пепсина будет 0,067 г/л. Снижается количество пепсина при атрофических гастритах, язвенной болезни желудка на фоне атрофического гастрита.

Часть пепсиногена всасывается в кровь и выделяется с мочой в виде уропепсиногена, который переходит в уропепсин в кислой среде. Для анализа способности слизистой желудка вырабатывать пепсин предложен метод определения уропепсина в моче, используемый для диагностики гастродуоденальных заболеваний.

Рекомендуется также применять его для больных, получающих кортикостероидные препараты, для контроля за состоянием желудочной секреции и профилактики стероидных язв. Если количество уропепсина в моче увеличивается, то кортикостероидные препараты отменяют. Метод определения уропепсина используется при противопоказаниях к зондированию.

Исследование содержимого кишечника.

Строение кишечника

Тонкая кишка представляет собой длинную трубку, превышающая длину тела человека в 4—5 раз. Анатомически тонкая кишка делится на три отдела: 12-перстную размером 25—30 см; тощую, которая составляет 2/5 всей тонкой кишки; подвздошную кишку— остальные 3/5 длины. Толстый кишечник представлен слепой, ободочной кишкой с её восходящей, поперечной и нисходящей частями, сигмовидной, прямой кишкой. Стенки всех отделов кишки состоят из слизистой, подслизистой, мышечной и серозной оболочек. Слизистая кишечника покрыта цилиндрическим эпителием. Для эпителиального покрова характерна складчатая поверхность, бархатистая на вид за счет наличия ворсинок,

которые увеличивают поверхность эпителия в 8 раз, а наличие микроворсинок — в 30—60 раз. У основания ворсинок слизистая образует крипты. В каждой ворсинке располагаются сеть кровеносных капилляров и лимфатические сосуды. Расстояние между ворсинками 1—3 мкм. Каемчатые энтероциты, содержат 1500—2000 микроворсинок, расстояние между которыми 10—20 нм. Эти клетки принимают участие в процессах всасывания, т. е. обеспечивают мембранное пищеварение. Микроворсинки создают надежный защитный барьер, препятствуют проникновению кишечных микробов в слизистую оболочку, обеспечивая стерильность продуктов всасывания. Бокаловидные энтероциты (экзокриноциты) — одноклеточные железы, вырабатывающие слизь; особенно много их в толстом кишечнике. Гормональные клетки Панета вырабатывают холецистопанкреозимин, секретин; их еще называют эндокриноцитами с ацидофильными гранулами. Клетки Кульчицкого секретируют серотонин, мотилин, мелатонин.

В слизистой происходит умеренная лимфоидно-плазмоцитарная инфильтрация в 12-перстной кишке и выраженная в тощей и подвздошной кишке. Здесь располагается много одиночных и групповых (пейеровых бляшек) фолликул, с возрастом их число уменьшается.

В подслизистом слое много брунеровских и либеркюновых желез, которые вырабатывают кишечный сок только в момент соприкосновения пищевого комка с железами и имеют выводные протоки у основания боковой стенки крипт.

Мышечный слой представлен наружными, продольными гладкомышечными волокнами и внутренними круговыми складками. Мышечный слой толстого кишечника имеет ленты, гаустры, сальниковые отростки. Ленты ободочной кишки распределяются продольно за счет неравномерных мышечных пучков и стягивают, гофрируют кишку. Гаустры ободочной кишки углубляются за счет полулунных складок, при сокращении кругового слоя мышечных волокон.

Серозная оболочка состоит из двух листков: висцерального и париетального. Она покрыта мезотелием и плотно прилегает к мышечному слою тонкого кишечника, восходящему и нисходящему коленам ободочной кишки. Поперечная часть ободочной кишки и сигмовидная кишка с червеобразным отростком располагаются интраперитонеально.

Функции кишечника

Функции кишечника: секреторная, всасывательная, выделительная, эвакуаторно-моторная. Толстый кишечник выполняет еще и резервуарную функцию.

Секреторная функция проявляется в выработке кишечного сока. В среднем за сутки вырабатывается до двух литров сока, который включает жидкую часть, содержащую электролиты, и плотную, состоящую из детрита и ферментов, собственных и пришедших с соком поджелудочной железы. К адсорбированным ферментам относят γ -амилазу, липазу, трипсин, химотрипсин и др. К собственным кишечным ферментам принадлежат γ -амилаза, аминопептидаза, дипептидазы, мальтаза, лактаза, моноглицеролипаза, дисахаридазы, энтерокиназа, щелочная фосфатаза, нуклеазы, эстеразы.

К секреторной функции относится и выработка тканевых гормонов. Энтерохромофинные клетки ЖКТ являются частью АПУД-системы, располагающейся среди паренхиматозных элементов многих органов. Эти клетки способны поглощать предшественники биогенных аминов, декарбоксилируют их, превращая в биогенные амины. Апудоциты выделяют пептидные гормоны непосредственно в кровь или в окружающее пространство. Секреция их зависит от уровня соляной кислоты в желудке, концентрации электролитов в соке, концентрации пепсина, состава и количества желчи, поступающей в кишечник, от моторной деятельности желудка и кишечника. Клетки Панета вырабатывают холецистопанкреозимин (ХЦК П-3), который подавляет кислотообразовательную и эвакуаторно-моторную функции желудка, усиливает тонус привратника, но расслабляет сфинктер Люткенса — Мартынова и способствует выходу пузырной желчи, кроме того, стимулирует выработку сока поджелудочной железы, содержащего большое количество ферментов.

Секретин также является антагонистом гастрин и подавляет функции желудка. Клетки Панета принимают участие в метаболизме цинка и лизоцима, участвуют в поддержании гомеостаза кишечника. Клетки Кульчицкого вырабатывают серотонин и мотилин, который контролирует эвакуаторно-моторную функцию желудка и влияет на сокращение ворсинок и микроворсинок, тем самым усиливая процессы всасывания.

При нарушении секреторной функции кишечника развиваются ферментопатии — синдром недостаточности пищеварения. Они могут быть врожденными — недостаточность дисахаридаз (лактазы, сахаразы), пептидаз, глютенная энтеропатия (непереносимость мучнистых веществ,

содержащих глютен: пшеничная и ржаная мука, рис и овес). Приобретенные ферментопатии выявляются при хронических энтеритах, болезни Крона, резекции тонкой кишки, панкреатите, циррозе печени, гепатитах, гипертиреозе. Встречается алиментарная ферментопатия при употреблении бобовых, злаковых, риса, яиц, поскольку они содержат термостабильные специфические белковые ингибиторы, образующие стойкие комплексы с протеиназами ЖКТ, угнетая их активность. Загрязнение пищевых продуктов солями тяжелых металлов, пестицидов приводит к нарушению процессов всасывания в кишечнике.

Всасывание протекает в основном в тонком кишечнике и происходит внеклеточно на поверхности эпителия на щеточной каемке. Ферменты кишечного сока обеспечивают всасывание и абсорбцию гликокалексом расщепленных продуктов. Внутриклеточное всасывание — расщепление цитоплазматическими ферментами субстратов, проникающих через мембрану в клетку. Кальций, магний, железо реабсорбируются в 12-перстной кишке; глюкоза, тиамин, рибофлавин, пиридоксин, фолиевая кислота — в тощей. Жир, белки проникают через слизистую тощей кишки. В подвздошной кишке всасывается витамин В₁₂ желчные соли, вода, натрий, хлор, бикарбонат. В толстом кишечнике реабсорбируется вода, продукты, расщепленные микробной флорой кишечника. Интенсивность всасывания электролитов зависит от процессов абсорбции и секреции в слизистой кишки.

Простые белки расщепляются до аминокислот, которые реабсорбируются; сложные белки — до аминокислот и небелковой части, продукты их распада расщепляются эндопептидазами сока поджелудочной железы и собственными ферментами кишечника. Аминокислоты свободно реабсорбируются и током крови доставляются в печень, иногда тормозя всасывание друг друга, на пример, лизин тормозит всасывание аргинина. Попадая в толстый кишечник, аминокислоты образуют фенол, скатол, индол — токсические вещества для организма.

Полисахариды расщепляются до моносахаридов (глюкозы, фруктозы, галактозы) и хорошо всасываются. Мальтоза, фруктоза, сахара гидролизуются в гликоген непосредственно в печеночной клетке. Глюкоза, галактоза всасываются быстрее других моносахаридов. Считается, что манноза, ксилоза, арабиноза всасываются путем диффузии, другие — за счет активного транспорта. Часть моносахаридов идет в печеночную клетку, другая часть попадает в венозную систему и в ткани. Клетчатка расщепляется под действием ферментов бактерий толстого кишечника; в норме микробы переваривают 3/4 клетчатки, поступившей в пищеварительный тракт. При длительном нахождении каловых масс в толстом кишечнике большая часть клетчатки разрушается ферментами

бактерий и только небольшое ее количество выходит с калом. Мало клетчатки выделяется при запорах, много — при поносах. Крахмал начинает расщепляться ферментами слюны, желудочного сока, поджелудочной железы, кишечника; окончательное расщепление его происходит под действием ферментов бактерий в толстом кишечнике (главным образом в слепой).

Жиры начинают гидролиз в желудке. Так, липопротеины разрушаются в желудке, и появляется нейтральный жир. далее на нейтральный жир оказывает действие щелочная среда 12-перстной кишки, желчь, сок поджелудочной железы, вследствие чего происходит эмульгирование жира. Чем ниже точка плавления жира, тем полнее он усваивается. Поэтому легко всасывается (на 98%) жир молока, сливок, сливочного масла, куриный, гусиный жир, находящийся в эмульгированном состоянии. Хуже других усваивается тугоплавкий бараний жир. Жир молока у детей эмульгируется желудочной липазой. дальнейший гидролиз протекает под действием панкреатической липазы, которая расщепляет его на глицерин и жирные кислоты. Для всасывания жирных кислот необходимо наличие желчных кислот. Всосавшиеся жирные кислоты частично переходят в нейтральный жир в кишечной стенке, часть идет в лимфатическую систему, часть — в печеночные клетки. Хиломикроны легко проходят через стенку кишечника.

Нарушение усвоения жира связано отчасти с поражением поджелудочной железы, с недостаточностью выделения липазы или с недостаточностью поступления желчи в кишечник. Но если жир заключен в соединительную ткань, то для его освобождения необходима соляная кислота, которая переваривает соединительную ткань и освобождает жир для дальнейшего гидролиза. Стеаторея (появление жира в кале) возникает при нарушении лимфооттока, при туберкулезе и опухолях мезентериальных лимфоузлов, находящихся на пути оттока лимфы. Нарушение всасывания наблюдается при хронических заболеваниях кишечника, недостаточности внутриклеточного пищеварения. У детей отмечается непереносимость молока, сопровождающаяся диспепсиями. Процессы брожения в толстом кишечнике усиливаются за счет поступивших нерасщепленных дисахаридов и при активировании микробной флоры. При поступлении большого количества белковой пищи в толстый кишечник развиваются активные гнилостные процессы. Эвакуаторно-моторная функция кишечника обеспечивает процессы всасывания, перемешивание химуса с кишечным соком, формирование каловых масс и выведение их из кишечника. В норме имеют место частые слабые сокращения кишечной стенки, которые обеспечивают перемешивание содержимого кишечника. Сильные, хорошо

координированные сокращения передвигают пищевой комок по кишечнику. Тонические, незначительные сокращения уменьшают просвет кишечника. При нарушении моторной функции развивается диарея или запоры.

Выделительная функция кишечника проявляется в секреции через стенку электролитов, продуктов обмена и выведении из организма остатков непереваренной пищи, элементов секреции слизистой, флоры, т. е. каловых масс.

Химическое исследование кала

Его проводят для выявления скрытого кровотечения, для установления характера воспалительного процесса, дисбактериоза, при ахоличном кале. При исследовании применяются химические реакции. Для приготовления каловой эмульсии берут небольшое количество фекальных масс, тщательно перемешивают дистиллированной водой или физраствором в соотношении 1 : 10. Для определения рН и белка используют альбуфан, гемафан — для обнаружения эритроцитов и гемоглобина, иктофан — для выявления билирубина и стеркобилина. Можно применять гептофан, позволяющий установить наличие крови, билирубина, уробилиногена, глюкозы, белка, рН. Для выявления ***скрытой* крови** используется спиртовой раствор амидопирин (50 г/л), бензидина. Обнаружение крови в кале имеет значение для выявления кровотечений, изъязвлений и новообразований ЖКТ. Малое количество крови может быть обнаружено лишь химическим путем.

Реактивы. 1. Спиртовой раствор амидопирин (50 г/л), готовят перед употреблением.

2. Раствор уксусной кислоты (100 г/л).

. Раствор перекиси водорода (30 г/л).

Ход определения. Готовят эмульсию кала 1:10. К 2 мл эмульсии приливают 2 мл раствора амидопирин, добавляют 10 капель перекиси водорода и 10 капель уксусной кислоты. Появление серо-фиолетового окрашивания соответствует положительной реакции, результат читают через 2—3 мин. **Определение билирубина в кале** проводят при светлых, зеленых оттенках кала. Применяют пробу Фуше.

Реактивы: 1. Раствор хлористого бария (150 г/л).

2. Реактив Фуше: 26 г ТХУ растворяют в 70 мл дистиллированной воды, добавляют 1 г хлорного железа и доливают водой до 100 мл.

Ход определения. К эмульсии кала по каплям вносят раствор хлористого бария и реактив Фуше. При положительной реакции появляется зеленое окрашивание. Билирубин в кале выявляется при энтеритах, дисбактериозе, ускоренной эвакуации химуса по кишечнику, может быть в норме у новорожденных. В норме у практически здорового человека белок в кале отсутствует и появляется при воспалительных процессах ЖКТ, при усиленной выработке слизи, кровотечении, поступлении пищевого белка в толстый кишечник. Белок в испражнениях выявляется при гастрите, язве, раке желудка, дуоденитах, язвенной болезни.

Гемтологические исследования

Кровь, лимфа, межклеточная тканевая (интерстициальная) жидкость представляют собой внутреннюю среду организма. Кровь как структурный компонент организма — сложнейшая функциональная система, включающая в себя органы кроветворения и кроверазрушения, кровь в сосудистом русле и депо. Функцию системы крови обеспечивают также печень, почки, желудочно-кишечный тракт, эндокринные железы, нервная система. Так, печень — депо железа, витамина В₁₂ и фолиевой кислоты, место синтеза основных белков плазмы крови и т. п. Кровь состоит из жидкой части (плазмы) и взвешенных в ней форменных элементов: эритроцитов, лейкоцитов и тромбоцитов (кровяных пластинок). Форменные элементы составляют 41—45% объема крови у женщин и 44% — у мужчин (эту величину называют гематокрит).

В зависимости от наличия в цитоплазме лейкоцитов специфической зернистости их разделяют на гранулоциты (нейтрофилы, эозинофилы, базофилы) и агранулоциты (лимфоциты и моноциты).

Основные функции системы крови:

- обеспечение переноса кислорода и углекислого газа;
- транспорт продуктов обмена веществ, продуктов питания, биологически активных веществ-регуляторов работы различных органов и тканей;
- защитная: удаление из организма всего генетически чужеродного;
- способность свертываться (образовывать сгусток) при повреждении сосуда.

Кроветворение (гемопоз) — сложный многостадийный процесс образования форменных элементов крови.

Зрелые форменные элементы крови четко различаются (дифференцированы) по структуре и функциям. Специализация, созревание клеток крови — основной процесс в кроветворении. Чрезвычайно важна в этом процессе высокая пролиферативная активность (способность к делению) кроветворных клеток. Благодаря ей органы кроветворения у человека весом 70 кг ежедневно точно нарабатывают 2×10^{11} эритроцитов, $4,5 \times 10^{10}$ нейтрофилов, $1,0 \times 10^9$ моноцитов, $1,75 \times 10^{11}$ тромбоцитов. Именно это количество клеток ежедневно разрушается в организме в норме. Таким образом, система крови — постоянно обновляющаяся (регенерирующая) система клеток.

Количество клеток крови у человека в норме поддерживается на постоянном уровне.

Процесс кроветворения начинается в конце 2-й, начале 3-й недели развития человеческого эмбриона. Вначале гемопоэз происходит в желточном мешке, затем в печени и перед рождением — в костном мозге. Костный мозг в норме остается основным органом кроветворения на протяжении всей жизни человека. Формирующиеся в эмбриогенезе лимфоидные органы: селезенка и лимфатические узлы — вначале также являются местом образования всех форменных элементов крови (эритроцитов, гранулоцитов, тромбоцитов), но к моменту рождения в этих органах образуются только лимфоидные клетки. В местах эмбрионального кроветворения (печень, селезенка, лимфатические узлы) имеются все условия для кроветворения (соответствующее клеточное микроокружение), и поэтому именно здесь возникают очаги внекостно-мозгового образования клеток крови при лейкозах, тяжелых анемиях. Именно эти органы увеличиваются в объеме при этих заболеваниях, и их называют факультативными органами кроветворения. После рождения кроветворение можно условно разделить на две ветви: миелопоэз (костно-мозговое кроветворение) и лимфопоэз. В костном мозге образуются эритроциты (эритропоэз), гранулоциты (гранулоцитопоэз), моноциты (моноцитопоэз), тромбоциты (тромбоцитопоэз) и некоторая часть лимфоидных клеток. Костный мозг — также место функционирования клеток-предшественниц гемопоэза. В органах лимфоидной системы (вилочковая железа, селезенка, лимфатические узлы) образуются различные виды лимфоидных клеток: Т-лимфоциты, В-лимфоциты, К-клетки (естественные киллеры).

Исследование белкового обмена

В организации и свойствах живой материи первостепенное значение имеют белковые вещества. Белки — это органические

высокомолекулярные азотистые соединения. Название «белки» происходит от белка куриного яйца, который при денатурации приобретает белый цвет. В зарубежной литературе можно встретить другое название азотсодержащих веществ — протеины (от греческого слова *protos* — первый, главный). Белки встречаются всюду, где есть проявления жизни, причем для живых организмов характерно довольно широкое их разнообразие. Большинство белков являются структурными компонентами клеток, на их долю приходится до 45% сухого вещества.

ПЕРЕВАРИВАНИЕ И ВСАСЫВАНИЕ БЕЛКОВ

Гидролиз белков с образованием полипептидов, а затем аминокислот происходит в желудке и в тонком кишечнике. В ротовой полости пищевой комок подвергается лишь механической обработке ввиду кратковременного присутствия и отсутствия ферментов, расщепляющих белки. Процесс расщепления белков начинается в желудке под действием фермента пепсина и хлористоводородной (соляной) кислоты. Соляная кислота вызывает набухание белковых молекул, что увеличивает поверхность белков для контакта с пищеварительными ферментами. Под действием соляной кислоты неактивный пепсиноген превращается в активный пепсин, а затем пепсин активирует последующие порции пепсиногена. Это явление называется процессом аутоактивации. Кроме того, соляная кислота создает оптимальную реакцию среды, при которой пепсин обладает максимальной активностью, а также она обладает бактерицидным (антисептическим) свойством. Содержание соляной кислоты в желудке у здоровых людей составляет около 5 мг/мл, что обеспечивает рН в теле желудка 1,5—2,5. Нарушение пищеварительных процессов в желудке наблюдается при недостаточном выделении соляной кислоты (гипоацидные, ацидные состояния), что изменяет рН в желудке в щелочную сторону, и пепсин не проявляет свою активность. Пепсин расщепляет белки на отдельные пептиды, состоящие из 8—10 аминокислот, действуя в основном на внутренние пептидные связи в белковой молекуле. Активность пепсина столь велика, что 1 г его может переварить за 2 часа 50 кг яичного белка.

Полипептиды, образовавшиеся в желудке под действием пепсина, а также негидролизированные белки после ощелачивания в антральной части желудка поступают в 12-перстную кишку и тонкий кишечник. Там они подвергаются дальнейшему гидролитическому расщеплению под действием ферментов, вырабатываемых поджелудочной железой: трипсина, химотрипсина, карбоксипептидазы, эластазы, — и слизистой оболочкой тонкого кишечника: аминопептидаз и дипептидаз. Энзимы

поджелудочной железы вырабатываются в неактивном состоянии в виде трипсиногена, химо трипсиногена, прокарбоксипептидазы и проэластазы. Под действием фермента тонкого кишечника энтерокиназы трипсиноген превращается в активный трипсин, который в свою очередь переводит остальные ферменты в активное состояние. Под влиянием всех перечисленных ферментов поли- пептиды и нерасщепленные в желудке белки распадаются до аминокислот, которые всасываются в тонком кишечнике и по воротной вене поступают в печень, где частично используются для синтеза белков печени и белков плазмы крови. Часть аминокислот током крови разносится к органам и тканям, где они поступают в клетки и участвуют в синтезе собственных белков тканей. Незначительная часть невсосавшихся аминокислот поступает в толстый кишечник, где подвергается бактериальному разложению с образованием токсичных продуктов: путресцина, кадаверина, скатола, индола, фенола и др. Эти продукты большей частью удаляются из организма в составе каловых масс, частично обезвреживаются в печени.

БИОЛОГИЧЕСКИЕ ФУНКЦИИ БЕЛКОВ

Биологическая роль белков очень многообразна, по из всего этого многообразия можно выделить наиболее важные и специфические функции. Плазма крови человека в норме содержит более 100 видов белков. Из них большую часть составляют альбумины (около 90%), иммуноглобулины, гликопротеиды, фибриноген, трансверрин и другие белки, присутствующие в небольших количествах. В большинстве случаев для клинических диагностики достаточно определение общего белка плазмы или сыворотки крови. В литературе описано большое количество методов определения общего белка, большинство из которых достаточно сложны. Среди них особого внимания заслуживают методы, основа на биуретовой реакции, впервые описанной в 1914 г.

Метод определения белка по биуретовой реакции (Кингслея— Вейксельбаума)

Принцип метода: Белки реагируют в щелочной среде с сульфатом меди, при этом образуются соединения, окрашенные в фиолетовый цвет (биуретовая реакция).

Реактивы необходимые для работы: 1. Натрия хлорид ч.д.а, или ч., 154 ммоль/л (изотонический раствор): 9 г хлорида натрия помещают в

мерную колбу вместимостью 1 л, растворяют в воде и доводят до метки водой.

2. Натр едкий ч.д.а. или х.ч., 0,2 моль/л: 8 г едкого натра помещают в мерную колбу вместимостью 1 л, осторожно растворяют в воде и доводят до метки водой.

3. Калия йодид ч.д.а. или х.ч., 30 ммоль/л раствор йодида калия в 0,2 моль/л растворе едкого натра: 0,5 г йодида калия помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят 0,2 моль/л раствором едкого натра до метки и растворяют. Реактив стабилен в течение 2 нед. при хранении в посуде из темного стекла.

4. Калий-натрий виннокислый 4-водный (сегнетова соль) ч.д.а.

5. Меди сульфат 5- водный ч.д.а. или х.ч.

6. Биуретовый реактив: 4,5 г сегнетовой соли растворяют в 40 мл 0,2 моль/л растворе едкого натра, прибавляют 1,5 г сульфата меди и 0,5 г йодида калия и растворяют, доливают до 100 мл 0,2 моль/л раствором едкого натра. Реактив стабилен при хранении в посуде из темного стекла.

7. Рабочий раствор биуретового реактива: 20 мл биуретового реактива смешивают с 80 мл 0,5 % раствора йодида калия. Раствор стабилен.

8. Калибровочный раствор альбумина (из человеческой сыворотки); 100 г/л раствор альбумина 154 ммоль/л растворе хлорида натрия.

Материал для исследования. Сыворотка крови.

Ход определения Опытная проба: К 0,1 мл сыворотки прибавляют 5 мл рабочего раствора биуретового реактива и смешивают, избегая образования пены. Через 30 мин (и не позднее чем через 1 ч) измеряют на фотометре в кювете с толщиной слоя 1 см при длине волны 500—560 нм (зеленый светофильтр) против холостой пробы. Холостая проба: к 5 мл рабочего биуретового реактива прибавляют 0,1 мл 154 ммоль/л раствора хлорида натрия, далее обрабатывают как опытную пробу.

Расчет ведут по калибровочному графику.

Построение калибровочного графика из калибровочного раствора готовят рабочие растворы как указано ниже.

№ пробирки	Калибровочный раствор альбумина, мл	154ммоль/л раствор хлорида натрия, мл	Концентрация альбумина, г/л
1	0,2	0,8	20
2	0,4	0,6	40
3	0,6	0,4	60
4	0,8	0,2	80
5	1,0	-	100

Из каждого разведения берут по 0,1 мл рабочего раствора и прибавляют по 5 мл рабочего биуретового реактива: через 30—60 мин измеряют на фотометре, как в опыте, против холостой пробы. По полученным данным строят калибровочный график. Калибровочная кривая линейна до 101 г/л альбумина.

Нормальные величины 65—85 г/л (6,5-8,5 г/100 мл).

Остаточный азот и его компоненты

Под остаточным азотом понимают тот небелковый азот, который определяется в надосадочной жидкости, получаемой после осаждения белков сыворотки(плазмы) крови трихлоруксусной, фосфорно-молибденовой и фосфорно-вольфрамовой(вольфрамовой)кислотами. В остаточную фракцию входит азот мочевины(на долю которого у практически здоровых людей приходится более половины, точнее 46-60 % всего остаточного азота, выраженного в мг/100 мл), азот аминокислот(до 25%), азот креатинина и креатина (5-7%), азот мочевой кислоты(4%) и других небелковых азотсодержащих продуктов. У здоровых людей содержание остаточного азота составляет 14-28 ммоль/л. Разность между остаточным азотом и азотом мочевины представляет так называемый резидуальный азот.

Методы определения содержания остаточного азота в сыворотке крови делятся на две основные группы: азотометрические и гипобромитные. В настоящее время содержание остаточного азота в сыворотке крови практически не определяется: этот тест в подавляющем большинстве случаев подменяется установлением содержания мочевины в сыворотке крови.

Мочевина и методы её определения

Мочевина представляет собой диамид угольной кислоты, образующийся в печени в процессе обезвреживания аммиака. Молекулярная масса мочевины 60 D . из них 28D приходится на долю двух атомов азота, входящих в состав молекулы мочевины. При необходимости сопоставления концентрации остаточного азота с содержанием азота мочевины концентрацию последней следует разделить на 2,14(60:28).

Мочевина свободно проходит через мембраны клеток паренхиматозных органов и эритроцитов. Мочевина мало токсична, но токсичны накапливаемые вместе с ней ионы калия и производные гуанидина: гуанидинуксусная кислота, метилгуанидин. Будучи осмотически активным веществом и относительно легко проникая через мембраны клетки, она увлекает с собой воду, что приводит к отеку тканей паренхиматозных органов, миокарда, ЦНС, вызывая нарушение функций сердечно-сосудистой и других жизненно важных систем организма.

Методы определения содержания мочевины подразделяют на две основные группы: ферментативные(уреазные)и неферментативные (газометрические, или гипобромитные; ксантгидроловые; диацетилмонооксимные; гипохлоритные). Известны также полуколичественные, ориентировочные методы установления концентрации мочевины с помощью диагностических тест-полосок.

Наиболее точными и специфичными способами определения концентрации мочевины являются ферментативные(уреазные)методы. В прошлом в качестве препаратов уреазы использовали тыквенные или арбузные семечки, соевую муку. В настоящее время с этой целью используют кристаллический фермент, получаемый в промышленных условиях. В качестве методов определения уровня мочевины в биологических жидкостях применяются: 1) диацетилмонооксимный - простой, чувствительный, достаточно специфичный способ, позволяющий в течение короткого периода времени производить исследование в капиллярной крови и других биологических жидкостях; 2) ферментативный (наиболее специфичный) - с применением препарата уреазы.

Определение мочевины диацетилмонооксимным методом

Принцип. Мочевина образует с диацетилмонооксимом в сильноокислой среде в присутствии тиосемикарбазида и ионов

трехвалентного железа комплексное соединение красного цвета, по интенсивности окраски которого определяют ее концентрацию.

Реактивы (по наборам НТК Анализ-Х»).

1. Цветной реагент, содержащий диацетилмонооксим, тиосемикарбазид, соль трехвалентного железа.
2. Стандартный раствор мочевины 16,65 ммоль/л.
3. Раствор трихлоруксусной кислоты (ТХУ) 30%.

Приготовление растворов.

Раствор реактива 1. Реактив 1 (содержимое одного флакона) растворяют в мерной колбе на 500 мл при повышенной температуре. Раствор устойчив при комнатной температуре в течение нескольких недель. Наличие небольшого количества нерастворимого осадка не мешает определению.

Раствор серной кислоты. В мерную колбу на 500 мл помещают 300 мл дистиллированной воды и при постоянном перемешивании добавляют 50 мл концентрированной (96%-ной) серной кислоты. После охлаждения доливают водой до метки.

Рабочий раствор. Для приготовления рабочего раствора цветного реагента смешивают равные объемы реактива 1 и раствора серной кислоты, готовят непосредственно перед употреблением. Для осаждения белка раствор трихлоруксусной кислоты разбавляют в три раза.

Проведение анализа без депротенирования. В пробирку вносят 0,01 мл сыворотки крови или разведенной мочи, добавляют 2 мл рабочего раствора цветного реагента, нагревают 5 мин на кипящей водяной бане. Затем быстро охлаждают в токе холодной воды и фотометрируют. Измерение оптической плотности пробы проводят при длине волны 530 нм в кювете толщиной 0,5 см относительно холостой пробы, которую ставят так же, как опытную, но вместо сыворотки крови берут 0,01 мл дистиллированной воды. Ввиду нестабильности окрашенного комплекса следует фотометрировать раствор не позже, чем через 15 мин после охлаждения пробы. Расчет производят по формуле:

$$C_{\text{оп}} = A_{\text{оп}} / A_{\text{ст}} \times 16,65$$

где $C_{\text{оп}}$ — концентрация мочевины (ммоль/л); $A_{\text{оп}}$ -абсорбция опытной пробы; $A_{\text{ст}}$ — абсорбция стандартной пробы; 16,65 — концентрация мочевины (ммоль/л) в стандартном растворе.

Проведение анализа с депротеинированием. При определении мочевины в цельной крови, гемолитических или липемических сыворотках пробу необходимо депротеинировать 10% раствором ТХУ. В центрифужную пробирку вносят 0,4 мл дистиллированной воды, 0,1 мл крови (сыворотки) и 0,5 мл 10% раствора ТХУ.

Содержимое перемешивают и центрифугируют 5—10 мин при 3000 об/мин. Затем 0,1 мл надосадочной жидкости переносят в новую пробирку, добавляют 2,0 мл рабочего раствора цветного реагента. далее определение проводят, как при анализе без депротеинирования.

Мочу перед анализом разводят дистиллированной водой в соотношении 1 : 50, 1 : 100 и исследование проводят в той же последовательности как это описано для сыворотки без депротеинирования.

Расчет производят по формуле:

$$C_{\text{оп}} (\text{моль/сут}) = A_{\text{оп}} / A_{\text{ст}} \times 16,65 \times K \times V_{\text{сут}},$$

где $C_{\text{оп}}$ — количество мочевины в суточной моче; $A_{\text{оп}}$ — абсорбция опытной пробы; $A_{\text{ст}}$ — абсорбция стандартной пробы; 16,65 — концентрация мочевины (ммоль/л) в стандартном растворе; $V_{\text{сут}}$ — суточный объем мочи в литрах; K — коэффициент разведения.

Норма содержания мочевины в сыворотке крови равна 2,5— 8,3 ммоль/л; в суточном объеме мочи 330,0—582,8 ммоль/сут.

Примечание: при содержании мочевины в сыворотке крови выше 16,65 ммоль/л сыворотку разводят дистиллированной водой, а результат умножают на коэффициент разведения.

Клинико-диагностическое значение исследования содержания мочевины и других азотсодержащих компонентов плазмы крови

Возрастание концентрации остаточного азота свыше 28- 35 ммоль/л, мочевины более 8,5-9,0 ммоль/л, креатинина более 117-120 мкмоль/л обозначается термином «гиперазотемия». По своему характеру азотемия может быть абсолютной (связанной с действительным накоплением в крови компонентов остаточного азота) и относительной (обусловленной обезвоживанием, дегидратацией).

Абсолютная азотемия вызывается либо усиленным образованием компонентов остаточного азота(вследствие активации протеолиза и катаболизма белка), либо задержкой(ретенцией)азотсодержащих шлаков при нарушении выделительной функции почек при их патологии(почечная ретенционная азотемия): хроническая почечная недостаточность, острый и хронический гломерулонефрит, амилоидоз, туберкулёз, поликистоз почек и др.; и при уменьшении фильтрации в клубочках почек из-за ухудшения центральной гемодинамики(у больных с декомпенсацией сердечно-сосудистой деятельности).

Внепочечная ретенционная азотемия наблюдается при нарушении оттока мочи (камни мочевыводящих путей, сдавливание опухолью, аденома и гипертрофия предстательной железы).

Продукционная(метаболическая)азотемия наблюдается при усиленном распаде белков. Она сопутствует патологическим состояниям, сопровождающимся синдромом эндогенной интоксикации, пролонгированного стресса(часто наблюдается в послеоперационном периоде). Отмечается при инфекционных заболеваниях, протекающих с лихорадкой и прогрессирующим распадом ткани(сепсисе, дифтерии, скарлатине, крупозной пневмонии, туберкулёзе); сахарном диабете; злокачественном новообразовании (в стадии кахексии); острой желтой атрофии и тяжелых циррозах печени; ожогах; перитонитах; острой кишечной непроходимости; гиперфункции коры надпочечников; острым инфаркте миокарда; отравлении гепатотропными и другими ядами (четырёххлористым углеродом, хлороформом, мышьяком, фосфором, щелочами).

Относительная азотемия наблюдается у больных с явлениями сгущения крови при профузных поносах, усиленном потоотделении и др.

Определение креатинина в крови и моче

Известные к настоящему времени способы определения содержания креатинина, а также креатина в биологических жидкостях могут быть подразделены на две основные группы:

- 1) неферментативные (колориметрические и кинетические, базирующиеся главным образом на реакции образования окрашенного комплекса с пикриновой кислотой);
- 2) энзиматические.

Наибольшее распространение получили способы, основанные на реакции Яффе, открытой автором в 1886 г. и примененной им для определения креатинина в освобожденной от белка сыворотке крови. Суть

реакции сводится к тому, что при добавлении к креатинину пикриновой кислоты в щелочной среде появляется оранжево-красное окрашивание, обусловленное образованием таутомера пикрата креатинина. В последние годы используются кинетические методы, основанные на реакции Яффе, позволяющие получить достаточно точные результаты в течение короткого промежутка времени, притом без осаждения белка и при использовании микрообъемов сыворотки (плазмы) крови. Они базируются на регистрации усиления окраски в динамике развития цветной реакции Яффе.

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

Принцип. В результате взаимодействия креатинина с пикриновой кислотой в щелочной среде образуется оранжево-красное 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. Раствор оставляют на сутки при комнатной температуре (для осаждения избытка пикриновой кислоты), после чего фильтруют. Пикриновая кислота взрывоопасна и является ядовитым веществом! Обращаться с ней нужно осторожно.

2. Основной стандартный раствор креатинина, 8,80 ммоль/л.

100 мг креатинина растворяют в 100 мл 0,1N 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 (88 мкмоль/л). Этот раствор нестойк.

3. Раствор едкого натра 100 г/л (10 г NaOH растворяют в 100 мл дистиллированной воды). Срок хранения 7 суток.

4. 0,1N раствор соляной кислоты.

Ход определения. 1,0 мл сыворотки смешивают в пробирке с 3,0 мл прозрачного насыщенного раствора пикриновой кислоты. Через 5 мин пробирку помещают на 15—20 с. в кипящую водяную баню, затем содержимое пробирки центрифугируют. К 2,0 мл центрифугата добавляют 0,1 мл раствора NaOH, тщательно перемешивают, затем доводят до объема 5,0 мл дистиллированной водой.

Через 20 мин пробы колориметрируют при зеленом светофильтре (длина волны 500—560 нм) в кювете с шириной слоя 10 мм, результаты колориметрирования сравнивают с аналогичными данными контрольных проб. Контрольные пробы готовят следующим образом: к 1,5 мл насыщенного раствора пикриновой кислоты добавляют 0,1 мл раствора NaOH и доводят объем дистиллированной водой до 5,0 мл.

Стандартную пробу обрабатывают точно так же, как опытную, с той лишь разницей, что вместо сыворотки берут 1,0 мл рабочего стандартного раствора. Содержимое пробирки не центрифугируют. Рассчитывают концентрацию креатинина по формуле:

$$C_{\text{оп}} \text{ (мкмоль/л)} = (A_{\text{оп}} / A_{\text{ст}}) \times 88$$

где $C_{\text{оп}}$ — содержание креатинина в сыворотке крови, $A_{\text{оп}}$ — абсорбция опытной пробы, $A_{\text{ст}}$ — абсорбция стандартной пробы (за вычетом значений абсорбции контрольных проб), 88 мкмоль/л — концентрация креатинина в стандартной пробе.

В норме содержание креатинина в сыворотке крови составляет: у женщин 44—95 мкмоль/л, у мужчин 53—110 мкмоль/л.

Ход определения содержания креатинина в моче.

В мерной колбе или 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, затем доводят дистиллированной водой до объема 100 мл. Абсорбцию измеряют на ФЭКе в кювете с толщиной слоя 10 мм при зеленом светофильтре (длина волны 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, 0,2 мл раствора едкого натра и доводят водой до 100 мл. Рассчитывают концентрацию и суточную экскрецию креатинина по следующей формуле:

$$C_{\text{оп}} \text{ (моль/сут)} = (A_{\text{оп}} / A_{\text{ст}}) \times 8,80 \text{ ммоль/л} \times D$$

где $C_{\text{оп}}$ — концентрация креатинина в моче; $A_{\text{оп}}$ — абсорбция опытной пробы, $A_{\text{ст}}$ — абсорбция стандартной пробы, 8.80 ммоль/л – концентрация основного стандартного раствора креатинина, D- суточное количество мочи в мл.

Суммарное количество выделенного креатинина у мужчин составляет 8,8-17,6 ммоль/сут, т.е. 1-2 г/сут, а у женщин 7,4-15 ммоль/сут, т.е. 0,8-1.5г/сут.

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

Увеличение уровня креатинина в плазме (сыворотке) крови обусловлено как усиленным образованием, так и задержкой этого метаболита в организме. Ретенционная гиперкреатининемия обусловлена нарушением (острым и хроническим) функции почек любого происхождения, в том числе из-за уменьшения фильтрации, поражения воспалительным процессом паренхимы почек, обтурации мочевых путей ниже уровня почек.

Продукционная гиперкреатининемия (креатининемия) отмечается при кишечной непроходимости, острой желтой атрофии печени, хлоропривной азотемии (т.е.гиперазотемии вследствие уменьшения содержания осмотически активных ионов хлора), декомпенсации деятельности ССС, пневмонии, лихорадочных состояниях. Возрастание содержания креатинина в плазме (сыворотке) крови может быть вызвано изменением эндокринного баланса: при тяжело протекающем сахарном диабете, акромегалии и гигантизме, гипертиреозе, гипофункции надпочечников, а также голодании, усиленной мышечной работе.

Снижение уровня креатинина в плазме (сыворотке) крови коррелирует с уменьшением мышечной массы (мышечные дистрофии и атрофии, параличи, парезы и др.);

В моче помимо эндогенного креатинина содержится экзогенный, поступающий в организм с мясной пищей. Поэтому уровень экскреции креатинина с мочой несколько зависит от характера питания. Увеличение выведения креатинина с мочой отмечается при усиленной мышечной работе, лихорадочных состояниях (при которых происходит повышенный распад белков протоплазмы), пневмонии, выраженной недостаточности функции печени. Увеличение экскреции креатинина с мочой происходит при ряде эндокринных расстройств (акромегалии, гигантизме, сахарном диабете), острых инфекционных заболеваниях, большой физической нагрузке. Уменьшение выведения с мочой этого компонента остаточного

азота наблюдается при длительном обездвиживании больных вследствие мышечной атрофии, параличей, парезов, при остром дерматомиозите, гипертиреозе, хронических заболеваниях почек, анемии, лейкозах, дегенерации, амилоидозе почек, голодании.

МОЧЕВАЯ КИСЛОТА

Мочевая кислота (2,6,8-триоксипурин) - главный продукт обмена пуриновых оснований, входящих в состав сложных белков - нуклеопротеинов. Различают следующие известные методы количественного определения концентрации мочевой кислоты:

1. Химические с колориметрическим завершением, основанные на способности мочевой кислоты восстанавливать фосфорно-вольфрамовую, мышьяково-молибденовую кислоту, железосинеродистый калий и другие вещества с образованием окрашенных соединений и взаимодействовать с реактивом Фолина—Дениса, а также на ее участии в фенолгипохлоритной реакции.

2. Прямые фотометрические, в которых используется принцип регистрации поглощения (абсорбции) мочевой кислотой монохроматического светового потока с длиной волны 293 нм (Marimont, London, 1964).

3. Энзиматические (уриказные), наиболее точные и специфичные. Химизм реакции состоит в том, что под действием фермента уриказы мочевая кислота расщепляется до аллантаина, CO_2 и перекиси водорода H_2O_2 . Результаты реакции учитываются разными способами. Выраженность окраски фотометрируемого раствора прямо пропорциональна концентрации мочевой кислоты в анализируемой биологической жидкости.

Определение содержания мочевой кислоты колориметрическим методом Мюллера—Зейферта

Принцип. Основан на фотометрической оценке содержания окрашенных в голубой цвет продуктов, образующихся при восстановлении фосфорно-вольфрамового реактива мочевой кислотой.

Реактивы.

1. Реактив Фолина. 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) концентрации 850 г/л. Затем содержимое колбы с

установленным в нее обратным холодильником кипятят в течение 4—6 ч, раствор при этом из желтоватого становится бесцветным. Из колбы Эрленмейера смесь пере- ливают в мерную колбу и доводят дистиллированной водой до метки 1 л. Реактив стоек.

Упрощенный (в небольших объемах) способ приготовления реактива Фолина отличается от описанного уменьшением объемов всех растворов, используемых для приготовления реактива, в 10 раз. Берут термостойкую коническую колбу (емкостью около 200 мл). В ее широкое отверстие вставляется либо воронка, либо резиновая пробка, через которую введена стеклянная трубка, имитирующая обратный холодильник. После остывания жидкости до комнатной температуры ее переливают в мерную (на 100 мл) колбу и доливают дистиллированной водой до метки.

2. Трихлоруксусная кислота, 200 г/л. 20 г ТХУ растворяют в 100 мл дистиллированной воды.

3. Стандартный раствор мочевого к 1 кислоты. На аналитических весах отвешивают 100 мг мочевого кислоты, навеску количественно полностью переносят в колбу емкостью 500 мл. Затем в нее добавляют 25 мл раствора углекислого лития (Li_2CO_3 5 г/л) и 25 мл дистиллированной воды. После растворения мочевого кислоты доводят содержимое колбы дистиллированной водой до метки, предварительно прибавив в раствор 12,5 мл формалина (как консерванта). Хранят в холодильнике в течение месяца. Из основного (200 мг/л) стандартного раствора готовят рабочий раствор (2 мг/мл), разводя основной в 10 раз. Рабочий раствор нестойкий и может сохраняться лишь в течение 2—3 сут. 1 мл его содержит 0,02 мг мочевого кислоты.

4. Насыщенный раствор углекислого натрия.

Ход определения. В центрифужную пробирку вносят 1,0 мл сыворотки, 1,0 мл дистиллированной воды и 1,0 мл раствора трихлоруксусной кислоты. Содержимое пробы тщательно перемешивают и через 30 мин центрифугируют (15 мин при 3000 об/мин). Схема хода дальнейшего опр. сводится к тому, чтобы к 1,5 мл центрифугата (соответствующего 0,5 мл сыворотки) добавить 0,7 мл насыщенного раствора соды и одну каплю реактива Фолина.

К 0,5 мл стандартного рабочего раствора добавляют 0,5 мл раствора трихлоруксусной кислоты, 1), 5 мл дистиллированной воды и после перемешивания — 0,7 мл насыщенного раствора соды и 1 каплю реактива Фолина. Через 10 мин обе пробы колориметрируют на ФЭКе при красном светофильтре (630—670 нм) в кювете с шириной слоя 5 мм, используя для сравнения дистиллированную воду. Расчет производят по формуле:

$$C_{\text{оп}} = A_{\text{оп}} / A_{\text{ст}} \times C_{\text{ст}},$$

где $C_{\text{оп}}$ - это концентрация мочевой кислоты в сыворотке (мг/мл), $C_{\text{ст}}$ - концентрация мочевой кислоты в стандартной пробе, равная 2 мг/мл, что соответствует в системе SI 118 мкмоль/л; $A_{\text{оп}}$ - оптическая плотность опытной пробы, $A_{\text{ст}}$ - оптическая плотность стандартной пробы.

Норма мочевой кислоты в сыворотке крови у взрослых составляет 270-480 мкмоль/л.

Клинико-диагностическое значение исследования содержания мочевой кислоты

Увеличение уровня мочевой кислоты в крови (гиперурикемия) отмечается при патологических состояниях, связанных с усилением распада клеток (в особенности содержащих ядра), нарушением выделения мочевой кислоты с мочой, изменением эндокринной регуляции обмена пуриновых оснований (вторичные гиперурикемии), а также при подагре — заболевании, обусловленном первичным (вызванным врожденными ферментативными сдвигами метаболизма) нарушением обмена этого метаболита. Характерным патоморфологическим признаком подагры является образование депо урата мононатрия в суставных хрящах, эпифизах костей, околоуставных тканях, почках и других органах. Скопления уратов вызывают местный некроз и реакцию типа инородного тела в соединительной ткани. Подагрические узелки можно обнаружить в ушной раковине, около локтевого отростка, вокруг коленных суставов и вдоль сухожилий. Реже они встречаются в мягких тканях пальцев руки, в ладонной и подошвенной областях, в хрящах века, носа, роговице или склере. Узелки могут стать причиной сдавления нервов. В настоящее время принято считать, что гиперурикемия сама по себе еще не подагра. Необходимым условием клинического проявления болезни является оседание кристаллов уратов в тканях.

Вторичная подагра проявляется в виде двух основных форм. Одна из них связана с повышенным распадом нуклеопротеинов (вторичная метаболическая гиперурикемия), при другой понижено выделение уратов и других веществ при заболеваниях почек. Вызываемая усиленным распадом нуклеопротеинов вторичная гиперурикемия обнаруживается при ряде заболеваний: гемоглобинопатии (талассемии), полицитемии, эритремии, пернициозной анемии, гемолитической желтухе, злокачественных опухолях, лейкемии, лимфоме, множественной миеломе,

после облучения рентгеновскими лучами, печеночной недостаточности, декомпенсации ССС.

Отмечена связь гиперурикемии с ожирением, между уровнем мочевой кислоты и β -липопротеинов мочевой кислоты и холестерина.

Увеличение концентрации мочевой кислоты в крови происходит также при нарушении функции эндокринной системы: сахарном диабете, гипопаратиреозе (гипопаратиреоидизме), микседеме, акромегалии, аллергии, саркоидозе, псориазе (у 30—50% больных), хондрокальцинозе, илеусе, артрите, пневмонии в стадии резорбции, алкоголизме, отравлении свинцом и угарным газом, потреблении жирной пищи и голодании. Ретенционная гиперурикемия отмечается у больных с поражением клубочков почек: острым и хроническом гломерулонефрите, первично и вторично сморщенной почке.

Гипоурикемия (уменьшение концентрации этого метаболита) наблюдается при гепатоцеребральной дистрофии (болезни Вильсона—Коновалова), некоторых злокачественных новообразованиях (лимфогранулематозе, бронхогенном раке), у больных после приема пиперазина, атофана, салицилатов и кортикотропина (АКТГ).

Увеличение содержания мочевой кислоты в моче (гиперуриатурия) наблюдается при подагре, лейкозах, включая период после лечения больных лейкозами цитопрепаратами, серповидноклеточной анемии, полицитемии, вирусном гепатите; уменьшение — при ксантинурии, свинцовой интоксикации.

ФЕРМЕНТЫ

Ферменты (энзимы) — специфические белки, играющие роль биокатализаторов, т. е. ускорителей химических реакций. С помощью ферментов химические реакции протекают в сотни и даже тысячи раз быстрее, чем без них. Почти и все они функционируют внутри тех клеток, в которых синтезируются, за исключением ферментов органов пищеварения и отдельных энзимов плазмы крови. Так как ферменты — это вещества белковой природы, то для них характерны физико-химические свойства, присущие белкам. Они обладают высокой молекулярной массой; гидролизуются протеолитическими ферментами; при гидролизе расщепляются на аминокислоты; образуют коллоидные растворы; не проходят через полупроницаемую мембрану; как и белки, обладают антигенными свойствами; чувствительны к воздействию высоких температур, кислот, щелочей; имеют свой оптимальный рН и т. п.

КЛИНИКО-ДИАГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТОВ

Ферментная диагностика используется в двух главных направлениях:

- для распознавания наследственных нарушений обмена веществ (первичные наследственные энзимопатии);
- для диагностики и дифференциальной диагностики приобретенных заболеваний (вторичные приобретенные энзимопатии).

В основе любого патологического процесса лежит нарушение ферментных систем. Ферменты позволяют выявить особенность протекания болезни почти на молекулярном уровне. Ферментные тесты являются достаточно чувствительными и тонкими индикаторами при целом ряде патологических состояний.

Исследование активности ферментов нашло широкое применение во всех клинико-диагностических лабораториях. Обычно определяют не один какой-либо фермент, а несколько ферментов, т. е. ферментный спектр. Ферменты подразделяются на распространенные, которые содержатся в нескольких органах и тканях (АсАТ, АлАТ, ЛДГ и др.), и органоспецифические (тканеспецифические), которые содержатся преимущественно только в одной какой-либо ткани (КК, ФМФА и др). В печени содержатся в основном АлАТ, АсАТ, ЛДГ, ЛАП, ЩФ; в сердечной мышце — КК, ЛДГ, АсАТ; в почках — ЛдГ, ЩФ, ЛАП, АсАТ; в поджелудочной железе — α -амилаза, липаза, ЛДГ; в костной ткани — ЩФ; в предстательной железе — КФ.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ ФЕРМЕНТОВ

Методы определения активности ферментов могут быть подразделены, на 2 основные группы:

а) колориметрические методы, основанные на инкубации сыворотки с субстратом в соответствующем буфере в течение определенного времени, по истечении которого ферментативную реакцию останавливают и образующиеся продукты определяют при помощи подходящей химической реакции либо замеряют количество оставшегося субстрата;

б) спектрофотометрические методы, с помощью которых непрерывно или периодически в ходе ферментативной реакции определяют потребление субстрата или кофермента либо образование продукта. Эти методы часто называются кинетическими методами, поскольку измерения каталитической активности зависят от кинетики непрерывной реакции. Большинство кинетических методов основано на

оптическом тесте Варбурга с применением пиридиновых коферментов. Ферменты преимущественно локализируются внутри клеток, где и проявляется их действие. Поэтому повышение активности ферментов в плазме (сыворотке) при целом ряде заболеваний связано прежде всего с увеличением проницаемости плазматической мембраны, мембран лизосом, некрозом клеток, выходом энзимов из поврежденных тканей в кровяное русло. При этом содержание и активность фермента в поврежденном органе снижается, а в сыворотке (плазме) крови повышается. Полагают, что в результате общей реакции организма ферменты переходят в плазму крови не только из поврежденного органа, но также из клеток других органов и тканей, незатронутых патологическим процессом. Для исследования активности ферментов чаще всего используется плазма или сыворотка и в процессе свертывания крови и последующей ретракции сгустка высвобождаются содержащиеся в тромбоцитах биологически активные вещества, под влиянием которых возрастает активность многих энзимов. Наблюдаемое в процессе свертывания разрушение форменных элементов (эритроцитов и др.) крови обуславливает дальнейшее увеличение ферментативной активности, оказывающейся, как правило, в сыворотке более высокой, чем в плазме. Этим, в частности, объясняется и известное предостережение избегать гемолиза крови.

Хранение сыворотки как правило, сопровождается снижением активности ферментов. Для большинства из них активность не изменяется при комнатной температуре в течение 6—8 ч, при 4 °С — около недели, а в замороженном состоянии — на протяжении одного месяца. При определении активности ферментов в плазме крови следует, учитывать, что многие антикоагулянты способны ингибировать энзиматическую деятельность. Известно, что оксалаты подавляют активность ЛДГ. ЭДТА ингибирует активность кислой и щелочной фосфатаз.

Динитрофенилгидразиновый метод определения аминотрансфераз

Принцип: В результате переаминирования, происходящего под действием АсАТ и АлАТ, образуются щавелево-уксусная и пировиноградная кислоты. При добавлении 2,4 – динитрофенилгидрозина в щелочной среде образуются окрашенные гидразоны пировиноградной и щавелево-уксусной кислот.

Реактивы 1. Натрия фосфат двузамещенный (Na_2HPO_4) 0,1 моль/л: 14,2 г Na_2HPO_4 доводят до 1 л водой.

2. Калия фосфат однозамещённый, 0,1 моль/л: 13,60 г KH_2PO_4 доводят до 1 л водой.

3. 0,1 моль/л фосфатный буфер рН 7,4: смешивают 840 мл 0,1 моль/л раствора Na_2HPO_4 и 160 мл 0,1 моль/л раствора KH_2PO_4 . Полученный раствор с индикатором бромтимоловым синим должен давать голубую окраску. Величину рН буфера доводят под контролем рН-метра. К приготовленному раствору в качестве консерванта можно добавить 5-10 мл хлороформа.

4. Натр едкий, 0,05 моль/л; 1 моль/л.

5. Бромтимоловый синий, 0,04 % раствор: 100 мг индикатора растирают в ступке с 3,2 мл 0,05 моль/л раствора едкого натра. После растворения смывают водой в мерную колбу вместимостью 250 мл и доводят водой до метки.

6. DL-аспарагиновая кислота или L-аспарагиновая кислота (если берется вместо DL-аспарагиновой кислоты L-аспарагиновая, а вместо DL-аланина L-аланин, то навеска уменьшается вдвое).

7. DL-аланина или L-аланин (если берется вместо DL-аспарагиновой кислоты L-аспарагиновая, а вместо DL-аланина L-аланин, то навеска уменьшается вдвое).

8. α -кетоглутаровая кислота.

9. Субстратный раствор для определения АсАТ: 29,2 мг α -кетоглутаровой кислоты и 2,66г DL-аспарагиновой кислоты растворяют в 1 моль/л растворе едкого натра. Едкий натр следует прибавлять осторожно, небольшими порциями, до полного растворения составных частей и до получения рН 7,4. Раствор переливают количественно в мерную колбу вместимостью 100 мл, ополаскивая 0,1 моль/л фосфатным буфером рН 7,4. Добавляют буфер в колбу до метки, тщательно перемешивают, прибавляют 1 каплю хлороформа и сохраняют в холодильнике в замороженном виде. Перед употреблением замороженный раствор должен полностью оттаять (повторное оттаивание не рекомендуется).

10. Субстратный раствор для определения АлАТ: 29,2 мг α -кетоглутаровой кислоты и 1,78г DL-аланина отвешивают на аналитических весах. Дальнейшая работа проводится так же, как для субстратного раствора АсАТ.

11. HCl 1 моль/л.

12. Раствор 2,4-динитрофенилгилрозина: 19,8 мг 2,4-динитрофенилгилрозина растворяют в небольшом количестве 1 моль/л

раствора HCl при нагревании на водяной бане. После охлаждения доводят объем HCl до 100 мл. На следующий день реактив фильтруют. Раствор стабилен при хранении в холодильнике в посуде из темного стекла.

13. Натр едкий, 0,4 моль/л, свободный от карбонатов. Бутыли с реактивом и водой закрывают пробка ми с поглотительными трубками, наполненными натронной известью. 14. Пировинограднокислый натрий. Для приготовления калибровочного раствора 11 мг кристаллического пирувата натрия (белого цвета) растворяют в небольшом количестве воды, переносят в мерную колбу вместимостью 100 мл и доводят объёме раствора до метки водой; 1 мл раствора содержит 110 мкг пирувата натрия, что соответствует 88 мкг (или 1 мкмоль) пировиноградной кислоты.

Материал для исследования. Сыворотка крови, свободная от гемолиза.

Ход определения АсАТ Опытная проба: в пробирку вносят 0,5 мл субстратного раствора для определения АсАТ, нагревают при 37° в течение 5 мин, добавляют 0,1 мл сыворотки и инкубируют при 37°С 30 мин. Затем добавляют 0,5 мл раствора 2,4- динитрофенилгидразина и выдерживают в течение 20 мин при комнатной температуре. добавляют 5 мл 0,4 моль/л раствора едкого натра, тщательно перемешивают и оставляют для развития окраски на 10 мин при комнатной температуре. Измеряют на ФЭКе при длине волны 500—560 им (зеленый светофильтр) в кювете с толщиной слоя 1 см против холостой пробы.

Холостую пробу ставят так же, как опыт но сыворотку добавляют после инкубации.

Ход определения АлАТ В пробирку вносят 0,5 мл субстратного раствора АлАТ и нагревают при 37°С в течение 5 мин. Затем вносят 0,1 мл сыворотки и инкубируют при 37°С 30 мин. Дальнейший ход анализа осуществляют так же. как и при определении АсАТ.

Расчет активности ферментов в сыворотке крови производят по калибровочному графику. Построение калибровочного графика: из калибровочного раствора готовят ряд разведений, как указано ниже.

№ Пробирки	Калибровочный раствор пирувата натрия, мл	Дистиллированная вода, мл	Пировиноградная кислота		Активность фермента, нмоль/(с·л) АсАТ, АлАТ
			мкг	мкмоль	
1	0,05	0,55	4,4	0.05	278
2	0,13	0,5	8.8	0.1	556
3	0,15	0,45	13.2	0.15	834
4	0,2	0,4	17.6	0.2	1112
5	0,25	0,35	22.0	0.25	1390

Калибровочные пробы ставят так же, как опытные, но вместо сыворотки добавляют разведенные калибровочные растворы. Измеряют против холостой пробы, в которую вместо калибровочных растворов добавляют воду. Калибровочная кривая линейна до величины экстинкции 0,3.

Нормальные величины для АсАТ, АлАТ 28—190 нмоль/(с·л) (0,1—0,68 мкмоль/ (ч.мл)) при 37°C.

Метод определения α -амилазы со стойким крахмальным субстратом (методом Каравея)

Амилаза (старое название диастаза) — фермент, осуществляющий гидролитическое расщепление полисахаридов (крахмала, гликогена, амилозы и других продуктов, содержащих три и более остатков глюкозы) до декстринов и мальтозы.

Наиболее богаты этим ферментом поджелудочная и слюнные железы. α -Амилаза секретируется в кровь главным образом из этих органов. Кроме того, фермент содержится в фаллопиевых трубах, кишечнике, печени, почках, легких, жировой ткани.

Плазма крови человека содержит α -амилазу панкреатическую (Р) и слюнную (S). В каждом из этих типов амилаз имеется несколько изоформ. Так, показано существование 7 фенотипов амилазы слюны и 3 фенотипов амилазы панкреатического сока.

Макроамилаза образует комплекс с иммуноглобулинами и поэтому не проходит через почечный фильтр, обуславливая в отдельных случаях постоянно повышенную ферментативную активность крови.

С мочой выделяется в основном Р-амилаза, что обуславливает большую информативность определения активности α -амилазы в моче как теста оценки функционального состояния поджелудочной железы. Полагают, что 65% амилазной активности мочи обусловлено панкреатической амилазой, в то время как 60% амилазной активности сыворотки обеспечивается амилазой слюнных желез. Этим объясняется то обстоятельство, что при остром панкреатите именно Р-амилаза увеличивает свою активность в сыворотке крови (до 89%) и особенно в моче (92%) без изменения показателей активности амилазы слюнных желез в этих биологических жидкостях.

Существующие методы изучения активности α -амилазы в биологических жидкостях (сыворотке, моче, дуоденальном содержимом) делятся на две основные группы.

1. Сахарифицирующие, основанные на исследовании образующихся из крахмала сахаров по редуцирующему действию глюкозы и мальтозы. В последнее время получили распространение сахарогенные методы определения активности α -амилазы, основанные на ферментативном определении продукта реакции — глюкозы. Субстрат и ферменты способствующие образованию глюкозы, различаются в коммерческих наборах разных фирм.

2. Амилокластические, базирующиеся на определении остатка нерасщепленного крахмала по степени интенсивности его реакции с йодом. Наиболее удобным для практической работы является микрометод Смита и Роэ, в модификации Каравея (со стойким субстратом).

В амилокластических методах определения активности α -амилазы измеряют распад крахмального субстрата, используя турбидиметрический, йодометрический или нефелометрический принцип. Йодометрические методы основаны на способности избытка негидролизованного крахмала давать в реакции с йодом окрашенные соединения. Активность фермента определяют по убыли оптической плотности субстрата после гидролиза амилазой. Особое значение придается качеству субстрата, используемого для определения активности α -амилазы йодометрическим методом,— так называемому «растворимому» крахмалу. Широкое применение получили методы с использованием УФ-спектрометрии. В этих методах об сахаров сопряжено с восстановлением НАД, и активность α -амилазы определяют по скорости увеличения абсорбции при длине волны 340нм,

обусловленной формированием НАДН. Активность фермента выражают в Ед/Л. Ферментативные методы определения активности α -амилазы особенно удобны при наличии автоматического анализатора.

Принцип. α -амилаза гидролизует расщепление крахмала с образованием конечных продуктов, не дающих цветной реакции с йодом. Об активности α -амилазы судят по уменьшению интенсивности окраски.

Реактивы 1. Бензойная кислота ч.д.а. или х.ч.

2. Натрия фосфат двузамещенный безводный (Na_2HPO_4) ч.д.а.

3. Крахмал растворимый для нефелометрии или крахмал по Lintner. Крахмал по Lintner выпускается зарубежными фирмами специально для использования его в качестве субстрата при определении α -амилазы.

4. Натрия хлорид, 0,154 моль/л.

5. Субстратно - буферный раствор рН 7,0: 13,3 г 1 и 2 г бензойной кислоты растворяют в 250 мл 0,154 моль/л хлорида натрия и доводят до кипения. Суспендируют 0,2 г растворимого крахмала в небольшом количестве холодной воды и вводят в кипящий буферный раствор. Кипятят 1 мин, охлаждают и доводят водой до 500 мл. Стабилен, при хранении при комнатной температуре в течение 10—12 дней. Субстратно-буферный раствор должен быть прозрачным.

6. Калия йодид ч.д.а., х.ч.

7. Калий йодноватокислый ч.д.а., х.ч.

8. Калия фторид ч.д.а.

9. НСІ концентрированная, х.ч. 10. 0,01 н. раствор йода: 0,036 г йодноватокислого калия и 0,45 г йодида калия растворяют в 40 мл воды и медленно при помешивании добавляют 0,09 мл концентрированной НС 1. 5 г фторида калия растворяют в 50 мл воды, фильтруют в мерную колбу, приливают 40 мл раствора йода и доливают водой до 100 мл. Хранят в посуде из темного стекла. Годен в течение месяца. Если в рабочий раствор йода не добавляют фторид калия, то его следует готовить ежедневно.

Материал для исследования. Свежая сыворотка или плазма крови, моча или дуоденальное содержимое, предварительно разведенное 154 ммоль/л раствором хлорида натрия в 100 раз.

Ход определения Микровариант. Опытная проба: 0,5 мл субстратно-буферного раствора помещают в пробирку, нагревают 5 мин при 37°C , добавляют 0,01 мл биологической жидкости. Инкубируют 7,5 мин при 37. Время инкубации следует строго отсчитывать по секундомеру с момента добавления биологической жидкости в крахмальный субстрат. Тотчас же

после инкубации добавляют 0,5 мл 0,1 н раствора йода и доводят объем водой до 5 мл. Измеряют на ФЭКе в кювете с толщиной слоя 1 см при длине волны 630—690 нм (красный светофильтр) против воды.

Холостую пробу ставят так же, как опытную, биологическую жидкость добавляют после инкубации вместе с 0,1 н раствором йода. Измеряют при тех же условиях, что и опытную пробу против воды.

Микровариант Ход определения опытной и холостой проб тот же, что и при микроварианте, но объем всех реактивов и исследуемой жидкости увеличивают в 5—10 раз.

Расчет. Активность α -амилазы выражают в миллиграммах или граммах крахмала, гидролизованного 1 л биологической жидкости за 1 с инкубации при 37°C. Расчет производят по формуле:

$$\text{активность } \alpha\text{-амилазы, мг/(с\cdot л)} = ((E_1 - E_2)/E_1) \times C \times t \times K,$$

где: E — экстинкция холостой пробы; E — экстинкция опытной пробы; C — количество крахмала, введенного в опытную и холостую пробы (0,2 мг в микроварианте); t — коэффициент пересчета на 1 с инкубации; K — коэффициент пересчета на 1 л биологической жидкости с учетом разведения.

Нормальные величины. Сыворотка крови: 3,3-8,9 мг/(с\cdot л), или 12—32 мг/(ч\cdot мл). Моча: до 44 мг/(с\cdot л), или до 120 мг/(ч\cdot мл). дуоденальное содержимое: 1,7-4,4 г/(с\cdot л), или 6-16 г/(ч\cdot мл). Коэффициент пересчета в единицах СИ — МГ/(С\cdot Л) — равен 0,278.

Воспроизводимость. Коэффициент вариации 5—10 %. Линейность реакции сохраняется в течение 10 мин.

Примечания.

1. Слабый гемолиз не мешает исследованию.
2. Лимоннокислую и щавелевокислую плазму и плазму, приготовленную на ЭДТА, применять нельзя, так как цитраты, оксалаты и ЭДТА ингибируют активность фермента.
3. При активности фермента выше 30 г/(ч\cdot л) в сыворотке крови и выше 140 г/(ч\cdot л) в моче, сыворотку или мочу следует развести водой, что соответственно должно учитываться при расчете активности ферментов. В случае высокой гиперферментемии мочу разводят в 100 раз.

4. При определении амилазной активности нужно иметь в виду, что слюна содержит в 1000 и более раз больше фермента, чем сыворотка. Пот также обладает амилазной активностью, и при попадании его с кожных

покровов в пробирку (при перемешивании проб большим пальцем) активность амилазы завышается на 25—80%.

Клинико-диагностическое значение определения активности α -амилазы в крови и моче

Значительное возрастание активности фермента встречается, главным образом, при заболеваниях поджелудочной железы. При остром панкреатите активность фермента крови и мочи увеличивается в 10—40 раз. Гиперамилаземия наступает в начале заболевания, достигает максимума к 12—24 ч после развития панкреатита, затем быстро снижается и приходит к норме на 2—6-е сут. Обычно гиперамилазурия длится дольше, чем увеличение активности, α -амилазы в сыворотке. Встречаются острые панкреатиты без повышения активности фермента (в частности при тотально панкреонекрозе). Даже при обследовании больных в условиях стационара повышение активности α -амилазы выявляется в 80—95% случаев. Поэтому нормальная активность фермента в сыворотке (плазме) крови и моче не исключает наличия заболевания поджелудочной железы. Частота гиперферментемии при панкреатитах во многом зависит от сроков выполнения анализов с момента начала заболевания, необходимо повторять исследование активности α -амилазы ежедневно в ближайшие 3—5 сут. Уровень сывороточной α -амилазы не всегда соответствует тяжести панкреатита. Умеренно выраженный отечный панкреатит может сопровождать весьма высоким содержанием α -амилазы, тогда как геморрагический панкреатит и тотальный панкреонекроз — минимальным его увеличением, а в некоторых случаях даже снижением. Реже встречаемое и менее выраженное, чем при панкреатите, увеличение активности α -амилазы в сыворотке крови и моче наблюдается при остром холецистите и других заболеваниях желчевыводящих путей. При них уровень α -амилазы возрастает вследствие нарушения оттока желчи через ампулу большого дуоденального сосочка и всасывания этого фермента в кровь.

Уровень α -амилазы в сыворотке крови повышается также при перфорации пищевода, язве желудка, астрите, острой кишечной непроходимости, ишемии и инфаркте тонкой кишки, перитоните, разрыве трубы при внематочной беременности, сальпингите, аневризме аорты. Гиперамилаземия при ишемии, некрозе и перфорации органов брюшной полости обусловлена всасыванием из нее α -амилазы. Активность фермента в крови увеличивается и при злокачественных опухолях легких

(продуцирующих S-изомилазу), поджелудочной железы, поперечно-ободочной кишки.

В случае макроамилаземии (комплекс амалазы с белками) активность этого фермента повышается в сыворотке крови и снижается в моче. Исследование α -амилазы в суточной моче является более надежным биохимическим тестом выявления хронических заболеваний поджелудочной железы, чем в разовой ее порции. После того как активность α -амилазы крови после приступа панкреатита возвратится к норме, она может оставаться повышенной в моче до 7-ми сут.

Гиперамилаземия и гиперамилазурия выявляются при заболеваниях слюнных желез воспалительных процессах (паротиты), камнях и опухолях слюнных желез и др.

ИССЛЕДОВАНИЕ УГЛЕВОДНОГО ОБМЕНА

Углеводами называются органические вещества, в состав которых входит углерод, водород и кислород, причем соотношение водорода и кислорода находится в таком же количестве, как и в молекуле воды, г. е. водорода в 2 раза больше, чем кислорода. Отсюда произошло их название — углеводы, состоящее из начальной части слова «углерод» и слова «вода». Углеводы — это обширный класс органических соединений, составляющий приблизительно половину всех известных органических веществ. Углеводы широко распространены в природе, особенно в растениях, где они составляют 70—80% сухого вещества, В животных организмах содержание их значительно меньше, приблизительно 2% сухой массы, В рисе содержится 76% углеводов, в пшеничной муке-69,6%, в ржаной муке-70,4%, в гречке-67%, в картофеле-22%.

ПАТОЛОГИЯ УГЛЕВОДНОГО ОБМЕНА

Для усвоения поли- и дисахаридов необходимо их расщепление в кишечнике до моносахаридов. Нарушение образования или выделения сока поджелудочной железы, содержащего фермент α -амилазу, влечет за собой расстройство всасывания углеводов. Это может наблюдаться при поражениях ткани поджелудочной железы (панкреатиты) и при закупорке ее выводного протока (камни, опухоли). Наличие в кале непереваренных зерен крахмала является одним из показателей нарушения усвоения полисахаридов. Нарушение всасывания моносахаридов, в частности глюкозы, может быть обусловлено патологическим процессом в самой стенке тонкого кишечника. Нормальный процесс всасывания моносахаридов (глюкозы, галактозы, фруктозы) связан с их

фосфолированием и дефосфолированием в эпителии кишечника. При воспалении слизистой оболочки кишечника, злокачественном перерождении ее, отравлении ферментативными ядами, блокирующими процесс фосфолирования моносахаридов, нарушается всасывание углеводов. Патология всасывания углеводов особенно легко развивается у грудных детей, когда еще недостаточно сформированы и адаптированы к ингредиентам пищи как пищеварительные ферменты, так и ферменты, обеспечивающие процессы фосфолирования и дефосфолирования моносахаридов.

Нарушение образования и расщепления гликогена. Отложение углеводов в печени и мышцах в виде гликогена способствует созданию депо углеводов в организме. Уменьшение отложения гликогена может наблюдаться либо при повышенном распаде его, либо при нарушении его образования.

Усиленное расщепление гликогена (гликогенолиз) обычно происходит при повышении энергетических затрат в организме: мышечные нагрузки, голодание, состояние стресса. Распад гликогена в печени и мышцах активируется гиперпродукцией гормонов щитовидной железы, мозгового слоя надпочечников, гипофиза. Уменьшение отложения гликогена наблюдается при гипоксических состояниях, гипо- и авитаминозах, нарушении функции желез внутренней секреции (сахарный диабет, тиреотоксикоз, недостаточность коры надпочечников). Торможение процесса образования гликогена и повышенное его расщепление нередко сочетаются вместе. Такое сочетание, приводящее к значительному истощению запасов гликогена, наблюдается при патологических процессах в печени (гепатиты, злокачественные новообразования и т.п.), тиреотоксикозе, тяжелых инфекциях и интоксикациях, голодании, шоке любой этиологии.

Своеобразным нарушением обмена гликогена является гликогеноз, или болезнь Гирке. Это заболевание встречается в раннем возрасте и характеризуется ненормальной стабильностью гликогена, недостаточностью его расщепления. При этом в печени обнаруживается значительное количество гликогена, а сама печень увеличивается в объеме. Повышенное содержание гликогена отмечается также в сердечной мышце, почках, скелетной мускулатуре, головном мозгу. Причиной гликогеноза является снижение активности фосфорилазы, необходимой для расщепления гликогена, а также недостаточная активность глюкозо-6-фосфатазы. Последняя приводит к тому, что глюкоза в печени не поступает в кровь, а превращается в гликоген. Стабильность гликогена ограничивает возможность его использования и приводит к тем же последствиям, что и его недостаток.

При галактоземии у ребенка отсутствует фермент, обеспечивающий превращение галактозы в глюкозу. Галактоза накапливается в организме и оказывает токсическое действие - поражается печень, почки, развивается желтуха, катаракта, умственная отсталость. Ранняя диагностика и перевод ребенка на диету без галактозы способствует значительному улучшению состояния.

Встречается также непереносимость дисахаридов (лактозы и сахарозы), особенно среди детей грудного возраста. Она возникает при отсутствии в кишечнике ферментов лактазы и сахаразы, расщепляющих соответствующие дисахариды. В результате этого лактоза и сахароза накапливаются в кишечнике с последующим разложением их микроорганизмами до молочной, масляной и других кислот. У детей наблюдаются поносы, вздутие живота, снижение аппетита и может развиваться тяжелое состояние.

Нарушение межуточного обмена углеводов. Распад углеводов в организме человека складывается из двух фаз: анаэробной и аэробной. В условиях недостаточного снабжения организма кислородом начинает преобладать анаэробная фаза. Это приводит к избыточному накоплению пировиноградной и молочной кислот. Повышенное содержание молочной кислоты (гиперлактатацидемия) наблюдается при усиленной мышечной работе, разнообразных гипоксических состояниях (значительное уменьшение дыхательной поверхности легкого, нарушение кровообращения, сердечно-сосудистая недостаточность, анемии, гипо- и авитаминозы, понижение атмосферного давления кислорода, тяжелые инфекции и интоксикации).

Нарушение обмена углеводов с преобладанием анаэробного гликолиза ведет к менее эффективному использованию их энергии. Накопление молочной кислоты к тому же приводит к изменению кислотно-основного равновесия, смещая его в кислую сторону. Определенная часть молочной кислоты, образующаяся в процессе обмена углеводов (главным образом в мышцах), в печени превращается в глюкозу и гликоген. При недостаточности содержания в организме витамина В на ступает нарушение межуточного обмена углеводов, проявляющееся в накоплении пировиноградной кислоты. Одновременно происходит и накопление молочной кислоты, так как часть избытка пировиноградной кислоты восстанавливается в молочную.

Нарушение регуляции углеводного обмена прежде всего связано с изменением уровня глюкозы в крови и выражается гипергликемией, глюкозурией и гипогликемией (см. клинико-диагностическое значение определения глюкозы в крови).

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ГЛЮКОЗЫ В КРОВИ

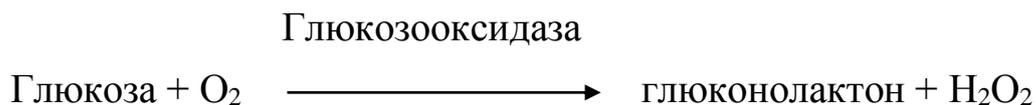
В плазме крови среди углеводов в наибольшем количестве представлена глюкоза. Она является ценнейшим питательным веществом для большинства клеток и особенно ткани мозга. Достаточно отметить, что половина энергии, расходуемой организмом, выделяется за счет окисления глюкозы.

Методы определения концентрации глюкозы в крови весьма многочисленны.

1. Редуктометрические основаны на свойстве глюкозы восстанавливать соли тяжелых металлов в щелочной среде. К этим методам относится и ставший уже историческим титриметрический способ Хагедорна и Йенсена (1923г.), в котором используется способность глюкозы восстанавливать при кипячении в щелочной среде железосинеродистый калий (красную кровяную соль) в железистосинеродистый (желтую кровяную соль).

2. Колориметрические методы базируются на методологии определения в конечной точке. В зависимости от химической природы аналитической реакции, эти методы могут быть подразделены на неферментные и ферментные. Первые состоят в образовании окрашенных соединений благодаря как способности глюкозы восстанавливать некоторые химические вещества, так и их свойству давать с определёнными реактивами цветные комплексы. Широко известная ортолуидиновая реакция основывается на способности многих ароматических аминов взаимодействовать в кислом растворе с альдегидной группой глюкозы с образованием глюкозаминов. Ортолуидиновый метод (Гультмана в модификации Хиваринена—Никкила) прост в исполнении, достаточно точен и специфичен, поэтому приобрел известность в клинико—диагностических лабораториях как ручной метод выполнения анализа.

Однако применение в лабораторной практике ароматического амина ортолуидина влечет за собой опасность канцерогенеза. Гораздо шире используются энзимные реагенты, благодаря при которых значительно увеличивается специфичность метода. Это глюкозооксидазный и гексокиназный методы, которые могут быть автоматизированы, что значительно повышает чувствительность и точность определения глюкозы. Принцип глюкозооксидазного метода основан на протекающей в присутствии кислорода специфической реакции, катализируемой ферментом глюкозооксидазой.



Количество связанного кислорода или образовавшейся перекиси водорода пропорционально содержанию глюкозы в исследуемом растворе.

За ходом реакции удается следить путем регистрации (с помощью амперометрических датчиков) скорости образования перекиси водорода или потребления кислорода. Для полуколичественной, скрининговой оценки содержания глюкозы в крови и моче обычно используются тест-полоски, позволяющие наряду с глюкозой устанавливать содержание некоторых других веществ.

УГЛЕВОДЫ

Применяемые в настоящее время, в биохимических лабораториях, методы определения глюкозы можно разделить на 3 основные группы: титрометрические, колориметрические, энзиматические.

Энзиматические (ферментативные) методы определения глюкозы подразделяются на: гексокиназные и глюкозооксидазные. Наибольшее распространения получили глюкозооксидазные методы, где концентрацию глюкозы можно определить по количеству потребленного кислорода; количеству образовавшейся глюкороновой кислоты; образовавшейся перекиси водорода.

Глюкозооксидазные методы специфичны по отношению к глюкозе. Фермент не катализирует окисление других моносахаридов.

Наиболее удобным и часто используемым в биохимической практике является регистрация количества образовавшейся в ходе реакции перекиси водорода. При ферментативном методе концентрацию перекиси водорода определяют при участии фермента-пероксидазы хрена или глюкозооксидазы, обладающих способностью окислять замещенные фенолы, анилины, орто-фенилдиамины (хромоген), и ряд других соединений.

Глюкозооксидазный метод определения глюкозы крови по окислению фенолфталеина

Принцип. Белки осаждают с трихлоруксусной кислотой, рН безбелкового раствора с помощью фосфата натрия доводят до точки, близкой к оптимуму действия глюкозооксидазы, и проводят ферментативную реакцию. Образующаяся перекись водорода в присутствия ионов меди окисляет фенолфталеин до фенолфталеата, который в нейтральной области бесцветен, а в щелочной области окрашен в красный цвет. Поэтому перед фотометрированием добавляют щелочь.

Реактивы: 1. Трихлоруксусная кислота, раствор 50 г/л. При титровании щелочью концентрация кислоты должна быть 0,3 н.

2. Натрия фосфат двузамещенный, 0,25 моль/л. Готовят, растворяя 9,7 г NaHPO_4 в 200 мл воды. При добавлении 2 мл этого раствора к 1 мл раствора трихлоруксусной кислоты рН должен быть в пределах 5,0—6,0.

3. Раствор глюкозооксидазы. Содержит около 3000 ед. в 1 мл. Готовят, растворяя соответствующее количество сухого препарата в 10 мл воды. Допускаются значительные колебания активности фермента, поэтому обычно нет необходимости проверять качество препарата.

4. Фенолфталеин, 0,5 % раствор. Для увеличения стойкости реактива к нему добавляют 3 мг трилона “Б” (натриевой соли этилендиаминтетрауксусной кислоты), который, связывая соли тяжелых металлов, препятствует самоокислению фенолфталеина кислородом воздуха.

5. Рабочий реактив. Готовят в день определения, смешивая 30 частей 0,3н.(реактив3) и 1/2 части 0,5% раствора фенолфталеина (реактив 4) и 1 часть 0,12 % раствора сульфата меди (120 мг CuSO_4 растворяют в 100 мл воды).

6. Калибровочные растворы. Глюкозу высушивают при 37°C и хранят в эксикаторе. Сначала готовят раствор с концентрацией 50 ммоль/л, для чего 180 мг препарата растворяют в 20 мл 5 % трихлоруксусной кислоты. Разведением этого раствора в 50 раз той же 5 % трихлоруксусной кислотой получают раствор, содержащий 1 ммоль/л. Берут 0,6; 1,2; 1,8 и 2,4 мл раствора 1 ммоль/л и объем каждой порции доводят до 10 мл, добавляя нужное количество 5 % трихлоруксусной кислоты. Получаются растворы, содержащие 60; 120; 180 и 240 мкмоль/л. При построении калибровочного графика окраска проб, в которых обрабатывались эти растворы, будет соответствовать концентрациям 3; 6; 9 и 12 ммоль глюкозы в 1 л крови.

Ход определения: 0,03 мл крови вливают в 1,5 мл 5% Трихлоруксусной кислоты, перемешивают и центрифугируют. К 1мл прозрачной надосадочной жидкости добавляют 2 мл 0,25моль/л фосфата натрия и 2 капли (примерно 0,1 мл) раствора глюкозооксидазы. Перемешивают и оставляют при комнатной температуре на 1 ч, затем добавляют 2 мл рабочего реактива и еще через 30 мин фотометрируют в кювете с длиной оптического пути 1 см при длине волны 520 нм (зеленый светофильтр). Одновременно ставят холостой опыт, в который берут 1 мл 5% трихлоруксусной кислоты и обрабатывают ее так же, как и надосадочную жидкость. В калибровочный опыт вместо надосадочной жидкости берут по 1 мл различных калибровочных растворов (реактив б). Расчет проводят по калибровочному графику или по правилу пропорций.

Нормальные величины натощак: 3,5-5,7 ммоль/л (60-100 мг%).

Определение глюкозы в крови и в моче по цветной реакции с орто-толуидином

Принцип. Глюкоза при нагревании с орто-толуидином в растворе уксусной кислоты даёт окрашенное соединение, интенсивность которого пропорциональна концентрации глюкозы.

Реактивы:

1. Орто-толуидин. Орто-толуидин (ч) - жёлтого цвета, обязательно подлежит перегонке в колбе-реторте при температуре 200⁰ С (на песочной бане). Свежеперегнанный орто-толуидин должен быть бесцветным или слабо-жёлтого цвета. Реактив стоек при хранении в посуде из тёмного стекла без доступа воздуха.

2. Ледяная уксусная кислота.

3. 3% раствор трихлоруксусной кислоты.

4. Тиомочевина.

5. Орто-толуидиновый реактив. В 94 мл ледяной уксусной кислоты растворяют 0,15 г тиомочевины и добавляют 6 мл орто толуидина.

6. Стандартный раствор глюкозы, 17,5 ммоль. В мерной колбе на 100 мл в 0,2% растворе бензойной кислоты растворяют 500 мг высушенной до постоянного веса при 1:100 глюкозы. Раствор бензойной кислоты готовят следующим образом: 0,2 г кристаллической бензойной кислоты растворяют в небольшом количестве воды, нагревая на водяной бане до полного растворения. После охлаждения до комнатной температуры переносят в мерную колбу на 100 мл и доливают до метки дистиллированной водой. Бензойная кислота увеличивает стабильность

стандартного раствора глюкозы. Реактив стоек при хранении в холодильнике.

Можно также пользоваться водным раствором глюкозы, однако время хранения такого стандарта значительно меньше. Экстинкция стандарта не должна давать резких колебаний, в противном случае необходимо приготовить новый стандарт. Хранить в холодильнике.

Специальное оборудование: Фотоэлектроколориметр, колба-реторта, песочная баня, колбы мерные.

Ход определения: В пробирку наливают 0,9 мл 3% трихлоруксусной кислоты и вливают в неё 0,1 мл крови, взятой из пальца. Центрифугируют. К 0,5 мл центрифугата добавляют 4,5 мл орто - толуидинового реактива. Пробирку помещают в кипящую водяную баню на 8 минут. Вода должна непрерывно кипеть. Следует точно соблюдать время выдерживания пробирки на водяной бане. Пробирку вынимают сразу и охлаждают под водопроводной водой до комнатной температуры. Измеряют на ФЭКе при длине волны 590- 650 нм.

ЛИТЕРАТУРА

1. Алексеева М. И., Красильников А. А. Лабораторная диагностика болезней. М., 1979.
2. Капиганенко А. М., Дочкин Ш. И. Клинический анализ лабораторных исследований. М., Воениздат, 1988.
3. Клиническая иммунология. Руководство для врачей / Под ред. Е. И. Соколова. М., 1999.
4. Долгов В. А., Морозова В., Марциевская. Р и др. Клинико - диагностическое значение лабораторных показателей. М., Центр, 1999.
5. Клинический диагноз — лабораторная основа. М., Лабинформ, 1997.
6. Кост Е. А. Справочник по клиническим лабораторным методам исследования. М., 1975.
7. Лабораторные методы исследования в клинике. Справочник / Под ред. В. В. Меньшикова. М., 1987.
8. Руководство к практическим занятиям по клинической лабораторной диагностике / Под ред. М. А. Базарновой, В. Т. Морозовой. Киев, 1
9. Руководство по клинической лабораторной диагностике. Ч. 1—2 / Под ред. М. А. Базарновой. Киев, 1982.
10. Ленинджер А. Основы биохимии. М., Мир, 1985.
11. Березов Т. Т., Коровкин Б. Ф. Биологическая химия. М., Медицина, 1990.
12. Горячковский А. М. Справочное пособие по клинической биохимии. Одесса, ОКФА, 1994.
13. Киселевская Ю., Колб В., Костян Г. и др. Аналитические основы лабораторной диагностики. Методические рекомендации. Гродно, 1996.

