**Методические рекомендации к занятию № 9**

**по дисциплине «Клиническая (био)химия»**

**Тема: Клинико-биохимические критерии** пигментного обмена **в норме и при патологии**

**Пигментный обмен** — совокупность процессов образования, превращения и распада в живых организмах окрашенных органических веществ сложного химического строения — пигментов.

Важнейшие пигменты — **порфирины, хромопротеиды, меланины, каротиноиды, флавоны и др.**

Такие хромопротеиды, как гемоглобин, миоглобин, каталаза, цитохромы, в качестве простетической (т. е. небелковой) группы содержат железопорфириновый комплекс (гем). Образование гемоглобина происходит в гемопоэтических клетках костного мозга; миоглобин образуется, по-видимому, внутри мышечных волокон, а цитохромы и каталаза непосредственно в содержащих их тканях.

**При биосинтезе порфиринсодержащих пигментов** сначала происходит синтез протопорфирина (из янтарной кислоты и глицина), в который затем включается атом железа, и в результате образуется гем. После присоединения к нему соответствующего белка завершается синтез того или иного хромопротеида. Скорость биосинтеза различных хромопротеидов неодинакова. Образование миоглобина и цитохрома с происходит более медленно, чем синтез гемоглобина.

**В процессе биологического** **распада порфириновых** белковых пигментов высвобождаются железо и белок (глобин), а протопорфирин превращается в желчные пигменты. Основным источником желчных пигментов является простетическая группа гемоглобина, а затем и миоглобина. Все эти реакции протекают в купферовских клетках печени и фагоцитарных клетках ретикулоэндотелиальной системы. В кишечнике билирубин под влиянием кишечных бактерий восстанавливается в уробилиноген и стеркобилиноген, бесцветные формы (лейкосоединения) пигментов мочи и кала. Из этих лейкосоединений при окислении образуются уробилин и стеркобилин.

В противоположность билирубину, биливердин в кишечнике не подвергается воздействию микрофлоры и выделяется из организма в неизмененном виде. Часть желчных пигментов выделяется с мочой.

Среди других пигментов важное место занимают пигменты кожи и волос — **меланины**, образующиеся из фенилаланина и тирозина, а также каротиноиды. Из β-каротина в стенке кишечника образуется витамин А, который в сетчатке глаза превращается в ретинин, и далее, соединяясь с белком, в родопсин— вещество, участвующее в фотохимических реакциях сетчатки.

***В цепи реакций биосинтеза и превращений пигментов могут возникнуть патологические нарушения, ведущие к тяжелым заболеваниям.***

Так, при блокировании некоторых стадий биосинтеза порфириновых пигментов наступает **порфирия**, сопровождаемая анемией (резкое уменьшение образования гемоглобина) и порфиринурией (выделение с мочой промежуточных продуктов пигментного обмена). Во всех случаях гемолиза усиливается распад гемоглобина. Под влиянием некоторых ядов (например, цианида, окиси углерода) может происходить окисление гемоглобина с образованием метгемоглобина. Следствием глубокого нарушения синтеза гемоглобина является образование различных форм патологически измененных гемоглобинов (возникающих при ряде наследственных заболеваний).

**Патология пигментного обмена**.

При различных заболеваниях у человека могут возникать разные **нарушения в обмене гемоглобина**. Ярким проявлением расстройств в биосинтетических реакциях являются порфирии, при которых в результате недостаточности соответствующих ферментных систем блокируются те или иные этапы биосинтеза протопорфирина III и гема.

При **острой порфирии** нарушается превращение порфобилиногена в порфириноген. Вследствие этого в начале приступа с мочой выделяются красный пигмент порфобилин и его бесцветная форма — порфобилиноген, который при стоянии спонтанно превращается в порфобилин. Кроме того, из организма выводятся небольшие количества уро- и копропорфиринов I и III типов в виде цинковых соединений. **Врожденная порфирия** характеризуется усилением продукции уро- и копропорфиринов I типа. Кости и зубы у больных становятся красными или коричневыми из-за отложения в них порфиринов. В моче присутствуют свободные уро- и копропорфирины I и следы протопорфирина III, а в фекальных массах — копропорфирин I. **В случае кожной формы порфирии** в период ремиссий из организма выводится почками и через кишечник около 20% всего нормально образующегося в нем протопорфирина. Во время приступа порфирины выделяются только с мочой в виде уро- и копропорфиринов I и III типов.

Порфиринурии наблюдаются и при некоторых других заболеваниях как следствие увеличения в организме количества свободных порфиринов, являющихся побочными продуктами при биосинтезе гема. Так, при **апластической анемии и полиомиелите** преобладает выделение копропорфирина III, в то время как в случаях пернициозной анемии, лейкемии, гемофилии, инфекционного гепатита и некоторых других заболеваний в основном выделяется копропорфирин I.

Патологические изменения в обмене гемоглобина имеют место и при **анемиях**. Так, например, **железодефицитные анемии** характеризуются резким уменьшением образования гемоглобина вследствие истощения депо железа в организме, дефицита железа в костном мозге и т. п. **При пернициозной анемии** образование гемоглобина замедлено, часть незрелых эритроцитов разрушается в костном мозге, что приводит к повышению содержания желчных пигментов и билирубинурии. В моче постоянно обнаруживаются уробилин (стеркобилин), а в кале повышается содержание стеркобилина (уробилина).

**При гемолитической желтухе** увеличение количества билирубина вызвано нарастанием свободной фракции до тех пор, пока в процесс не вовлекается значительная часть паренхимы печени. С этого момента начинает нарастать уровень связанного билирубина крови.

Глубокие нарушения в синтезе гемоглобина, носящие не только количественный, но и качественный характер, наблюдаются при **серповидноклеточной анемии**.

У лиц, страдающих этим заболеванием, синтезируется особый вид гемоглобина — гемоглобин S, аминокислотный состав которого отличается от обычного гемоглобина только в отношении одной аминокислоты (в гемоглобине S вместо молекулы глютаминовой кислоты, стоящей в полипептидной цепи, находится аминокислота валин). Это небольшое различие в структуре резко отражается на свойствах гемоглобина S, который плохо растворим в воде и выпадает внутри эритроцитов в виде кристаллов, благодаря чему эритроциты принимают серповидную форму.

Усиление распада гемоглобина наблюдается во всех **случаях гемолиза**, в результате которого освобождается значительное количество гемоглобина, возникают гемоглобинемия, гемоглобинурия, увеличивается образование желчных пигментов и превращение их в пигменты мочи и кала.

Под влиянием некоторых ядовитых веществ в крови может происходить окисление гемоглобина с образованием коричневого пигмента — **метгемоглобина**. В случаях тяжелых отравлений метгемоглобин выделяется с мочой. При этом возможно отложение метгемоглобина и продукта его распада — гематина — в почечных канальцах, что влечет за собой нарушение фильтрационной способности почек и развитие уремии.

**Нарушение обмена миоглобина** встречается при ряде заболеваний, сопровождающихся выходом миоглобина из мышц и выделением его с мочой. Эти еще малоизученные заболевания объединены под общим названием миоглобинурии. Они встречаются у животных (паралитическая миоглобинурия лошадей, беломышечная болезнь), реже у человека. При миоглобинуриях наблюдается ненормальная мобилизация миоглобина, потеря красными мышцами обычной окраски, атрофические или дегенеративные изменения в мышечной ткани. Миоглобинурия у человека возникает в результате травматических повреждений мышц, после длительных маршей, большого физического напряжения, при некоторых формах мышечной дистрофии и т. п.

**Нарушения обмена желчных пигментов.**

**Виды желтух.** Значение определения желчных пигментов для диагностики болезней крови, печени и желчевыводящих путей.

Механическая (подпеченочная,обтурационная) желтуха обусловлена вне- или внутрипеченочной обструкцией желчных путей с нарушением оттока желчи либо полным перекрытием общего желчного протока (камень, воспаление, опухоль и т. д.). В этом случае из-за скопления желчи в печени печеночные капилляры растягиваются, гепатоциты сдавливаются и пропускают конъюгированный билирубин в кровеносные капилляры.

Уровень конъюгированного билирубина в плазме крови повышается, и при превышении почечного порога (примерно 30 мкмоль/л) в моче появляется билирубин.

Уменьшение или исчезновение билирубина в моче указывает на полное или частичное восстановление проходимости желчных путей.

При печеночно-клеточной (паренхиматозной) желтухе, когда повреждена паренхима печени, одновременно повышается уровень конъюгированного и неконъюгированного билирубина. Первопричиной в этой ситуации могут быть нарушение клиренса неконъюгированного билирубина крови, нарушение выделения конъюгированного билирубина из печеночных клеток в желчные капилляры, проникновение конъюгированного билирубина из печеночных капилляров, переполненных желчью, в кровеносные капилляры через разрушенные печеночные клетки.

Паренхиматозной бывает желтуха при остром, вирусном гепатите в токсической фазе, токсикозах. Уровень как конъюгированного, так и общего билирубина первично повышается при синдроме Дубина - Джонсона и при синдроме Ротора.

Повышенная концентрация конъюгированного билирубина в крови сопровождается увеличенной экскрецией билирубина в мочу. При этой патологии интенсивность билирубинурии усиливается параллельно тяжести заболевания, достигает максимальных значений в разгар болезни, после чего начинает уменьшаться. В начале заболевания билирубин в моче практически не определяется, и этот тест не является ранним диагностическим признаком.

Гемолитическая(надпеченочная) желтуха характеризуется чрезмерным образованием неконъюгированного билирубина либо его задержкой в организме при нормальном выведении. В плазме крови повышается уровень общего билирубина за счет неконъюгированного билирубина. В моче же билирубин отсутствует, а реакция на уробилиноген положительная.

Повышенный уровень неконъюгированного билирубина в сыворотке крови наблюдается при нарушении его метаболизма, в частности, при наследственном нарушении поглощения и транспорта желчных пигментов (синдром Жильбера). У людей с этим синдромом в большинстве случаев постоянно желтушные кожные покровы и слизистые. Причиной этого является неспособность печени захватывать, конъюгировать и выделять билирубин в желчные капилляры.

Другой формой наследственной врожденной гипербилирубинемии является болезнь Криглера - Найяра, при которой значительно увеличен уровень неконъюгированного билирубина и может развиться поражение нервной системы.

Желтуха новорожденных – это окрашивание кожных покровов и видимых слизистых оболочек новорожденных детей, в связи с увеличением количества билирубина в крови в первые дни жизни ребенка. К первой причине повышенного уровня билирубина в крови относится замена фетального гемоглобина (гемоглобин F) на взрослый гемоглобин (гемоглобин А). В первые дни жизни новорожденного ребенка происходит усиленный распад фетального гемоглобина для замены на взрослый гемоглобин, в связи с чем количество продуктов распада гемоглобина (гем и глобин) повышается, в связи с чем увеличивается и образование билирубина.

Количество билирубина при желтухе новорожденных увеличивается за счет непрямого (свободного) билирубина. Вторая причина – это недостаточное содержание альбумина в крови. У новорожденных детей уровень альбумина может быть сниженным, в связи с чем перенос билирубина к печени, для дальнейшего поглощения билирубина гепатоцитами, замедлен. К третьей причине, способствующей увеличению билирубина в крови у новорожденных, является недостаточное развитие ферментов печени, в связи с чем процесс конъюгации билирубина, т.е. процесс связывания с глюкуроновой кислотой для перевода в водорастворимую форму, также замедлен.

**ОПРЕДЕЛЕНИЕ УРОВНЯ ПИГМЕНТОВ В крови**

**ГЕМОГЛОБИН**

**Гемоглобин** выполняет в организме важную роль переносчика кислорода и принимает участие в транспорте углекислоты. Общее содержание гемоглобина равно 700 г.

Гемоглобин состоит из белка глобина и четырёх молекул гема. Молекула гема, содержащая атом железа, обладает способностью присоединять и отдавать    молекулу кислорода. При этом валентность железа, к которому присоединяется кислород, не изменяется, **т. е. железо остаётся двухвалентным**.

**Оксигемоглобин** несколько отличается по цвету от гемоглобина, поэтому артериальная кровь, содержащая оксигемоглобин, имеет ярко - алый цвет. Притом тем более яркий, чем полнее произошло её насыщение кислородом. Венозная кровь, содержащая большое количество восстановленного гемоглобина, имеет тёмно – вишнёвый цвет.

**Метгемоглобин** является окислительным гемоглобином, при образование которого меняется валентность железа: двухвалентное железо, входящее в молекулу гемоглобина, превращается  в трёх валентное. В случае большого накопление в организме метгемоглобина отдача кислорода тканям становится невозможной и наступает смерть от удушения.

**Карбоксигемоглобин** представляет собой соединение гемоглобина с угарным газом. Это соединение примерно в 150 – 300 раз прочнее, чем соединение гемоглобина с кислородом. Поэтому примесь даже 0,1% угарного газа во вдыхаемом воздухе ведёт к тому, что 80% гемоглобина оказываются связанными с окисью углерода и не присоединяют кислород, что является опасным для жизни.

Внутрисосудистый гемолиз является осложнением целого ряда патологических состояний и приводит к развитию гиперкоагуляции с блокадой кровотока в мелких сосудах. Определение **свободного гемоглобина** позволяет выявить наличие внутрисосудистого гемолиза и проводить мониторинг лечебных мероприятий. Выявлено наличие статистически значимого большего повреждения эритроцитов у больных **артериальной гипертензией** по сравнению с контрольной группой, отмечена тенденция к уменьшению содержания **свободного гемоглобина** на фоне проводимой терапии.

Определение гемоглобина на электрофотоколориметре ФЭК-М или спектрофотометре.

В пробирку, содержащую точно отмеренные 4 мл 0,04% раствора аммиака, прибавляют 20 мм3 крови (1 пипетку от гемометра ГС-3).

Для получения 0,04% раствора аммиака берут 1,6 мл 25% раствора аммиака с удельным весом 0,91 и разбавляют водой до 1 л.

Определение на ФЭК-М ведут при зеленом светофильтре в кювете шириной 10 мм, отсчет по красной шкале правого барабана («второй способ измерения»). Содержание гемоглобина находят по градуировочной кривой или таблице. Определение гемоглобина в специальных фотоэлектрических приборах (ГФ-1 и др.) подробно описано в приложенных к ним инструкциях.

Для спектрофотометрии используют бензидиновый метод определения свободного гемоглобина.

**МИОГЛОБИН**

**Определение миоглобина в сыворотке крови**

Миоглобин - гемсодержащий хромопротеид. Является белком, транспортирующим кислород в скелетных мышцах и миокарде.

Миоглобин — железосодержащий белок с молекулярной массой около 18 кДа. Его молекула сходна по своей структуре с гемоглобином, что определяет основную функцию белка, доставляющего кислород в скелетные мышцы и миокард. В норме уровень миоглобина в сыворотке крови не превышает 100 нг/мл, определяется объемом мышечной массы, поэтому его содержание у мужчин выше, чем у женщин. Так как миоглобин выводится в неизмененном виде с мочой, его концентрация зависит от функции почек.

**Референтные значения**

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Норма | | | | | |
| Женский | | возраст | референтные значения  мин. макс. | | ед.изм. |
|  |  | все | 21 | 49 | мкг/л |
| Мужской | | возраст | референтные значения мин. макс. | | ед.изм. |
|  |  | все | 22 | 66 | мкг/л |

При повреждении данных мышц происходит повышение концентрации миоглобина в крови, что используется в диагностике инфаркта миокарда.

При повреждении миокарда и скелетных мышц миоглобин легко и быстро попадает в кровь и затем быстро экскретируется с мочой. Повышение концентрации в крови преходящее, возникает уже через 2-3 часа после появления боли при инфаркте миокарда (ИМ) и сохраняется 2-3 суток. Концентрация миоглобина при ИМ может повышаться в 4-10 раз и более. Степень ее повышения зависит от величины повреждения миокарда.

**При ИМ наряду с миоглобинемией выявляют миоглобинурию (повышение содержания миоглобина в моче).**

Определение миоглобина в крови имеет важное значение и у больных с синдромом длительного сдавления, при обширных травмах мышц, которые часто осложняются острой почечной недостаточностью вследствие массивного отложения миоглобина в почечных клубочках.

**Увеличение** концентрации миоглобина в крови:  
- ИМ;  
- тяжелый электрошок;  
- термические ожоги;  
- вторичная токсическая миоглобинурия (болезнь Хаффа);  
- повреждение скелетных мышц;  
- артериальная окклюзия с ишемией мышц;  
- уремия.

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Факторы повышения и понижения,**  другие | | | |
|  | Название фактора | Влияние на Миоглобин в сыворотке крови | |
|  | Повреждения мышц (травмы, манипуляции, гипоксия, токсические повреждения) | Повышение |  |
|  | Ожоги (тяжелые) | Повышение |  |
|  | Поражения электрическим током | Повышение |  |

**Миоглобин, бесприборный экспресс-тест, качественное определение**

**Принцип метода**

MGL-CHECK-1 представляет собой быстрый качественный одностадийный тест для определения человеческого миоглобина в сыворотке, плазме или цельной крови.

Метод основан на уникальной комбинации моноклонального окрашивающего конъюгата (коллоидное золото) и поликлональных адсорбированных на твердой фазе антител к миоглобину человека. Метод обладает высокой специфичностью. При прохождении исследуемого образца через адсорбирующую зону тестового устройства конъюгат, содержащий меченые антитела, связывается с миоглобином, образуя комплекс “антиген-антитело”. Этот комплекс взаимодействует с антителами к миоглобину в тестовой зоне устройства, и, если концентрация миоглобина превышает 100 нг/мл, образует окрашенную полосу.

При низкой концентрации миоглобина окрашенная полоса в тестовой зоне не образуется. Образовавшийся в адсорбирующей зоне комплекс “антиген-антитело” последовательно проходит через тестовую и контрольные зоны.

Не связавшийся конъюгат взаимодействует с реагентом в контрольной зоне тестового устройства, образуя окрашенную полосу, что указывает на правильное проведение теста.

**Существуют иммуноферментные методы** **количественного определения миоглобина в сыворотке крови** с помощью наборов реагентов фирм-производителей.

Принцип анализа: твердофазный одностадийный «sandwich»-вариант иммуноферментного анализа на планшетах.

Основные характеристики:

•Чувствительность — 4 нг/мл.

•Диапазон измерения — 0–1000 нг/мл.

•Исследуемый образец — 10 мкл сыворотки крови.

•Готовые к применению калибровочные пробы и контрольный образец.

•Общее время инкубации — 1 час 15 минут на шейкере.

•Учет результатов — спектрофотометрия на длине волны 450 нм или 450+620 нм.

•Срок хранения: 9 месяцев при температуре 2–8 °С.

**билирубин**

Определение билирубина в крови - унифицированный метод по диазореакции в присутствии акселератора (метод Ендрассика-Клеггорна-Грофа)

**Принцип метода определения билирубина**

Под воздействием НСl разрывается тетрапирроловая связь би­лирубина, в результате чего образуются два дипиррола, которые диазотируются диазобензосульфоновой кислотой с образованием розово-фиолетового азобилирубина.

Связанный билирубин реа­гирует быстро, несвязанный билирубин реагирует после добавления кофеинового реактива.

**Необходимые реактивы для определения билирубина**

1.  Кофеин.

2.  Натрия бензонат.

3.  Натрия ацетат 3-водный.

4.  Кофеиновый реактив: 5 грамм кофеина, 7,5 грамм бензоната натрия, 12,5 грамма ацетата натрия растворяют в 90 миллилитров воды, нагревают до тем­пературы 50—60 °С, хорошо перемешивают. После охлаждения доливают водой до 100 миллилитров. Раствор стабилен в течение 2 недель.

5.  Натрия хлорид, 154 ммоль/литр (изотонический раствор): 0,9 грамма хлорида натрия помещают в мерную колбу вместимостью 100 миллилитров и доливают до метки водой.

6.  НСl концентрированная.

7.  Сульфаниловая кислота.

8.  Диазосмесь. Диазореактив I: 5 грамм сульфаниловой кислоты раст­воряют при нагревании в 300—400 миллилитрах воды, прибавляют 15 миллилитров концентрированной НС1. Если сульфаниловая кислота полностью не растворяется, колбу помещают в теплую воду и помешивают. Только после растворения и охлаждения раствор доливают водой до 1 литра. Реактив стабилен при хранении в посуде из темного стек­ла. Диазореактив II — натрия нитрит, 5 грамм/литр (0,07 моль/литр): 0,5 грамма нит­рита натрия помещают в мерную колбу вместимостью 100 миллилитров и доливают водой до метки. Реактив стабилен в течение 2—3 не­дель при хранении в посуде из темного стекла. Перед работой смешивают 10 миллилитров диазореактива I и 0,3 миллилитра диазореактива II.

9.  Билирубин для построения калибровочного графика, 800 миллиграмм/литр, или 1 368 мкмоль/литр. Коммерческие препараты кристаллического билирубина содержат разные примеси, которые могут мешать ре­акции азосочетания. Рекомендуется использовать набор Био-Ла-Тест «Билирубин-эталон», содержащий билирубин высокой сте­пени чистоты с коэффициентом молярной экстинкции не менее 6,05 х 104 литра при 453 нм и растворении в хлороформе. Растворы билирубина нестойкие, поэтому их готовят с добавлением белка в качестве стабилизатора. Коммерческие препараты билирубина не связаны с глюкуроновой кислотой.

10.  Натрия карбонат, 0,1 моль/литр: 10,6 грамма безводного NaCO3 раст­воряют и доливают до 1 литра водой.

11.  Уксусная кислота, 4 моль/литр: 25 миллилитров ледяной уксусной кис­лоты доливают до 100 миллилитров водой.

**Ход определения билирубина**

В 3 пробирки (2 опытные пробы и холостая) вводят реактивы, как указано в таблице.

**Диазореакция**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Ингредиенты | Опытная проба, мл | | Холостая проба, мл |
| Общий билирубн | Связанный би­лирубин |
| Сыворотка | 0,5 | 0,5 | 0,5 |
| Кофеиновый ре­актив | 1,75 | — | 1,75 |
| Раствор хлорида натрия | — | 1,75 | 0,25 |
| Диазосмесь | 0,25 | 0,25 | — |

Для определения связанного билирубина измерение проводят спустя 5—10 минут после добавления диазосмеси, так как при дли­тельном стоянии в реакцию вступает несвязанный билирубин. Для определения общего билирубина пробу для развития окраски оставляют стоять 20 минут, после чего измеряют на фотометре. При дальнейшем стоянии окраска не изменяется.

Измерение проводят при длине волны 500-560 нм (зеленый светофильтр) в кювете с толщиной слоя в 0,5 сантиметров против воды. Из показателей, полученных при измерении общего и связанного билирубина, вычитают показатель холостой пробы.

Расчет производят по калибровочному графику. Находят со­держание общего и связанного билирубина.

**Построение калибровочного графика**

Способ I — Шелонга—Венде с использованием стабилизи­рующего свойства белка сыворотки крови. Основной раствор билирубина: в колбе вместимостью 50 миллилитров растворяют 40 миллилитров билирубина в 30—35 миллилитров 0,1 моль/литр раствора карбоната натрия Na2C03. Хорошо взбалтывают, не допуская образования пу­зырьков.

Доводят до 50 миллилитров 0,1 моль/литр раствором Na2C03 и несколько раз перемешивают. Раствор стоек только в течение 10 минут от на­чала приготовления. В дальнейшем происходит окисление били­рубина.

Рабочий раствор билирубина: к 13,9 миллилитра свежей негемолизйрованной сыворотки здорового человека добавляют 2 миллилитров свежепри­готовленного основного раствора билирубина и 0,1 миллилитров 4 моль/литр раствора уксусной кислоты. Хорошо перемешивают.

При этом выделяются пузырьки углекислого газа. Рабочий раствор стоек в течение нескольких дней.

Этот раствор содержит точно на 100 миллиграмм/литр, или 171 мкмоль/литр, билирубина больше, чем сыворотка, взятая для приготовления раствора.

Чтобы исключить при расчетах количество билирубина, со­держащегося в этой сыворотке, при измерении на фотометре из величин экстинкции калибровочных проб вычитают величины экстинкции соответствующих разведений компенсационной жидкости.

Для приготовления компенсационной жидкости смешивают 13,9 миллилитра той же сыворотки, которая использовалась для приготов­ления калибровочного раствора билирубина, 2 миллилитра 0,1 моль/литр раствора карбоната натрия и 0,1 миллилитра 4 моль/литр раствора уксусной кис­лоты.

Для построения калибровочного графика готовят ряд разведе­ний с различным содержанием билирубина.

К полученным разведениям прибавляют по 1,75 миллилитра кофеино­вого реактива и по 0,25 миллилитра диазосмеси. При появлении помутне­ния можно добавить по 3 капли 30%-ного раствора едкого натра. Измерение проводят при тех же условиях, что и в опытных про­бах, через 20 минут.

Из компенсационной жидкости готовят разведения, аналогич­ные калибровочным, и далее обрабатывают их так же, как калибровочные пробы.

**Определения связанного билирубина**

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Номер пробир­ки | Рабочий раствор билиру­бина, мл | Изотони­ческий раствор NaCl, мл | Количество билируби­на в пробе | | Концент­рация би­лирубина в сыворот­ке крови, мкмоль/л |
| мг | мкмоль |
| 1 | 0,05 | 0,45 | 0,005 | 0,00855 | 17,1 |
| 2 | 0,1 | 0,4 | 0,01 | 0,0171 | 34,2 |
| 3 | 0,15 | 0,35 | 0,015 | 0,02565 | 51,3 |
| 4 | 0,2 | 0,3 | 0,02 | 0,0342 | 68,4 |
| 5 | 0,25 | 0,25 | 0,025 | 0,04275 | 85,5 |

Способ II — калибровочный график строится по готовому набору реактивов «Билирубин-эталон» («Лахема»). Набор Био-Ла-Тест «Билирубин-эталон» включает:

- билирубин лиофилизированный (точная концентрация били рубина приведена на этикетке флакона);

- альбумин лиофилизированный.

Способ приготовления растворов билирубина указан в инст­рукции к набору.

Калибровочная кривая линейка до 170 мкмоль/литр.

**Примечание**

На правильность метода влияет способ построения калибро­вочной кривой.

Ряд веществ — гидрокортизон, андрогены, эрит­ромицин, глюкокортикоиды, фенобарбитал, аскорбиновая кисло­та — вызывают интерференцию.

**ОПРЕДЕЛЕНИЕ УРОВНЯ ПИГМЕНТОВ В МОЧЕ**

**ГЕМОГЛОБИН**

|  |
| --- |
| В норме свободный гемоглобин в моче не определяется. **Гемоглобинурия** возможна при гемолитической анемии, инфекционных заболеваниях, выраженной физической нагрузке или массивном внутрисосудистом гемолизе, обусловленном трансфузионной реакцией. Гемоглобин содержится в эритроцитах (красных кровяных тельцах) и состоит из гема (комплекса протопорфирина и ионизированного железа) и глобина (полипептида). Как правило, разрушение эритроцитов происходит в клетках ретикулоэндотелиальной системы. Однако при внутрисосудистом гемолизе свободный гемоглобин поступает в плазму крови и связывается с гаптоглобином. **Если уровень гемоглобина в плазме превышает концентрацию гаптоглобина**, избыток свободного гемоглобина экскретируется с мочой (гемоглобинурия). **Протопорфирин**, входящий в состав гема, действует в качестве фермента, катализирующего процесс окисления некоторых органических веществ. При этом проба мочи окрашивается в синий цвет, интенсивность которого зависит от концентрации гемоглобина (**пероксидазоподобная реакция**).  Для выявления неизмененных эритроцитов, которые могут обнаруживаться в моче наряду со свободным гемоглобином (гематурия), необходимо выполнить микроскопию мочевого осадка. |

**Цель -** диагностика гемолитической анемии, инфекционных заболеваний и трансфузионных реакций, сопровождающихся массивным внутрисосудистым гемолизом.

**Подготовка**

• Пациенту следует объяснить, что анализ позволяет выявить избыточное разрушение эритроцитов.

• Каких-либо ограничений в диете и режиме питания не требуется.

• Пациенту сообщают, что для анализа используют произвольно взятую пробу мочи, и объясняют, как ее собирать.

• Анализ не следует проводить во время менструации из-за возможности получения ложноположительных результатов.

• Сотрудники лаборатории и лечащий врач должны знать, принимает ли пациент препараты, которые могут повлиять на результат анализа (в некоторых случаях от их применения необходимо воздержаться).

**Процедура и последующий уход**

• Собирают произвольно взятую пробу мочи

**Определение кровяных пигментов в моче экспресс-методом**

Для определения кровяных пигментов в моче применяют

следующие экспресс-методы.

**Тест-полоски (Dipstisk, Multistix, Chemstrip)**

• Собирают пробу мочи.

• Опускают тест-полоску в мочу и быстро извлекают ее.

• Через 30 с сравнивают окраску тест-полоски со специальной шкалой. Голубая окраска свидетельствует о положи-

тельной реакции на кровяные пигменты, интенсивность окраски определяется их концентрацией в моче.

**Тест-таблетки**

• Собирают пробу мочи.

• Наносят 1 каплю мочи на фильтровальную бумагу, помещают поверх нее тест-таблетку, на которую наносят 2 капли воды.

• Через 2 мин изучают цвет фильтровальной бумаги вокруг таблетки. Голубая окраска свидетельствует о положительной реакции на кровяные пигменты, интенсивность окраски определяется их концентрацией в моче.

**Тест-раствор**

• Собирают пробу мочи.

• Наносят 1 каплю мочи на фильтровальную бумагу, помещенную в специальный пластиковый пакет. Закрывают пакет и переворачивают его. Открывают пакет и наносят 2 капли тест-раствора на фильтровальную бумагу.

• Через 30 с изучают цвет фильтровальной бумаги. Голубая окраска свидетельствует о положительной реакции на кровяные пигменты; интенсивность окраски определяется их концентрацией в моче.

**Выявление гемоглобина в моче**

Описанные методы позволяют выявлять в моче кровяные пигменты. Однако для проведения дифференциальной диагностики гемоглобинурии и, например, миоглобинурии необходимо выполнение иммунохимического анализа.

• После сбора мочи пациент может возобновить прием препаратов.

**Меры предосторожности**

• Анализ не следует проводить во время менструации, так как попадание в пробу мочи менструальной крови может привести к ложноположительному результату.

• Пробу мочи отправляют в лабораторию сразу после получения.

**Референтные значения.** В норме гемоглобин в моче не обнаруживается.

**Отклонение от нормы.** Причинами гемоглобинурии могут стать: массивный внутрисосудистый гемолиз, вызванный переливанием крови; ожоги и синдром длительного раздавливания;

приобретенная гемолитическая анемия, обусловленная токсическим действием химических или лекарственных веществ, и малярия; врожденная гемолитическая анемия (гемоглобинопатии или ферментопатии). Гемоглобин в моче появляется также при пароксизмальной ночной гемоглобинурии, реже - при цистите, камнях мочеточника или уретрите. Гемоглобинурия и гематурия наблюдаются при остром гломерулонефрите или пиелонефрите как следствие повреждения почечного эпителия, при опухолях почек и туберкулезе органов мочевой системы.

**Факторы, влияющие на результат анализа**

• Несвоевременная отправка мочи в лабораторию.

• Применение нефротоксических препаратов и антикоагулянтов (возможна положительная реакция).

• Применение витамина С в высоких дозах или препаратов, содержащих витамин С в качестве консервантов (возможны ложноотрицательные результаты).

• Разрушение эритроцитов в несвежей пробе мочи и и при щелочной ее реакции, загрязнение мочи менструальной кровью.

• Выраженная бактериурия (возможен ложноположительный результат из-за действия бактериальных пероксидаз).

**МИОГЛОБИН**

После разрушения миоцитов (например, при ИМ или синдроме длительного раздавливания) он попадает в кровь и быстро фильтруется в почечных клубочках, при этом развивается **миоглобинурия**. Например, миоглобин появляется в моче через 24 ч после развития **инфаркта миокарда**. Миоглобин и гемоглобин имеют сходное строение. Поэтому для проведения дифференциальной диагностики применяют **метод преципитации**: гемоглобин, связанный с гаптоглобином, выпадает в осадок после добавления к пробе мочи сульфата аммония; миоглобин остается в растворенном состоянии и может быть выявлен с помощью экспресс-методов.

**Цель**

• Диагностика заболеваний, сопровождающихся рабдомиолизом.

• Диагностика обширных повреждений (некроза) мышц.

• Оценка выраженности повреждения мышц при синдроме длительного сдавления.

**Подготовка**

• Пациенту следует объяснить, что анализ позволяет выявить в моче красный пигмент миоглобин, который содержится в мышечных клетках. Это облегчает диагностику заболеваний, протекающих с повреждением мышц, и помогает оценить тяжесть травмы.

 Каких-либо ограничений в диете и режиме питания не требуется.

• Пациенту сообщают, что для анализа используют произвольно взятую пробу мочи, и объясняют, как ее собирать.

**Процедура и последующий уход.** Собирают произвольно взятую пробу мочи. **Меры предосторожности.** Пробу мочи отправляют в лабораторию сразу после получения. **Референтные значения.** В норме миоглобин в моче не обнаруживается.

**Отклонение от нормы.** Миоглобинурия возникает при острых или хронических заболеваниях мышц, алкогольной полимиопатии, семейной миоглобинурии, обширном инфаркте миокарда и тяжелых травмах скелетных мышц (синдром длительного сдавления, выраженная гипертермия, ожоги). Кроме того, миоглобин появляется в моче после тяжелой физической нагрузки, однако исчезает после отдыха.

**Факторы, влияющие на результат анализа**

• Выраженное разведение мочи (снижается чувствительность тестов).

• Загрязнение пробы мочи йодом во время хирургических

вмешательств (возможен ложноположительный результат).

• Недавний прием витамина С в высоких дозах (подавление реакции при применении тестполосок Chemstrip).

• Несвоевременная отправка пробы мочи в лабораторию.

**ПОРФИРИНЫ**

Анализ является количественным и позволяет определить в моче уровень порфиринов, в частности уро- и копропорфиринов, и их предшественников порфириногенов, таких, как порфобилиноген и дельта-аминолевулиновая кислота. Порфирины представляют собой оранжевокрасные флюоресцирующие соединения, состоящие из 4 колец пиррола, которые образуются в процессе биосинтеза гема. Они обнаруживаются во всех клетках, принимают участие в энергетическом обмене и экскретируются с мочой в небольших количествах. Повышение в моче уровня порфиринов или порфириногенов свидетельствует о нарушении биосинтеза гема, которое бывает врожденным, например при наследственных ферментопатиях, и приобретенным, например при заболеваниях печени и гемолитической анемии.

|  |
| --- |
|  |

Определение в моче уровня отдельных порфиринов или порфириногенов позволяет выявить недостаточность отдельных ферментов, участвующих в биосинтезе гема. В некоторых случаях количественному анализу предшествует проведение качественных скрининговых тестов (для этого используют произвольно взятую пробу мочи). При получении положительных результатов исследуют суточную мочу.

Сопоставление уровней порфиринов в моче, плазме крови и кале повышает достоверность диагностики порфирий. **Цель -** диагностика врожденных и приобретенных порфирий.

**Подготовка**

• Пациенту следует объяснить, что анализ позволяет диагностировать нарушения синтеза гемоглобина.

• Каких-либо ограничений в диете и режиме питания не требуется.

• Пациенту сообщают, что для анализа используют суточную мочу, и объясняют, как ее собирать.

• Сотрудники лаборатории и лечащий врач должны знать, принимает ли пациент препараты, которые могут повлиять на результат анализа (в некоторых случаях от их применения необходимо воздержаться).

**Процедура и последующий уход**

• В течение 24 ч мочу собирают в специальный светонепроницаемый контейнер с консервантом, препятствующим разрушению светочувствительных порфиринов и их предшественников; первую (утреннюю) порцию мочи сливают, а последнюю сохраняют для анализа.

• После сбора мочи пациент может возобновить прием препаратов.

**Меры предосторожности**

• Следует помнить, что во время беременности или менструации точность результатов может снижаться.

• При сборе мочи контейнер хранят в холодильнике или во льду.

• Пробу мочи отправляют в лабораторию сразу после получения.

• В отсутствие светонепроницаемого контейнера мочу хранят в защищенном от света месте.

• Если мочу получают с помощью постоянного пузырного катетера, мочеприемник на время сбора мочи помещают в темный пластиковый мешок.

|  |
| --- |
|  |

**Референтные значения.** В норме экскреция уропорфиринов с мочой составляет от 27 до 52 мкг/ сут (СИ: 32-63 нмоль/сут), а копропорфиринов - от 34 до 230 мкг/сут (СИ: 52-351 нмоль/сут). **Отклонение от нормы.** Повышение в моче уровней порфиринов и их предшественников - характерный признак порфирий (см. Уровень порфиринов в моче при порфириях). Кроме того, экскреция порфиринов может возрастать при вирусном гепатите, лимфогранулематозе, поражении ЦНС, циррозе печени, а также отравлениях солями тяжелых металлов, бензолом и четыреххлористым углеродом.

**Факторы, влияющие на результат анализа**

• Неправильность хранения контейнера с мочой и несвоевременная отправка ее в лабораторию.

• Применение барбитуратов, хлоралгидрата, хлорпропамида, сульфаниламидов, мепробамата, хлордиазепоксида индуцирует порфирию или порфиринурию; от приема этих препаратов следует по возможности отказаться за 12 дней до проведения исследования.

• Прием пероральных контрацептивов, гризеофульвина (экскреция порфиринов с мочой увеличивается).

• Беременность или менструация (возможно повышение или снижение уровня порфиринов в моче).

• Применение рифампицина повышает уровень уробилиногена в моче.

Нарушение биосинтеза гема на разных этапах способствует по-

вышению в моче уровня порфиринов и их предшественников и развитию порфирий.

**ДЕЛЬТА-АМИНОЛЕВУЛИНОВАЯ КИСЛОТА**

Анализ подразумевает количественное определение в моче уровня дельта-аминолевулиновой кислоты (АЛК) методом колориметрии и позволяет диагностировать порфирии, заболевания печени и отравление свинцом. В отделениях неотложной медицинской помощи возможно применение скрининговых качественных тестов.

АЛК - основной предшественник порфиринов; в норме в процессе биосинтеза гема она превращается в порфобилиноген. При порфириях и отравлении свинцом процесс превращения нарушается, вследствие чего уровень АЛК в моче повышается до появления других химических или гематологических изменений.

|  |
| --- |
|  |

**Цель**

• Диагностика отравления свинцом.

• Диагностика порфирий и некоторых заболеваний печени, включая гепатит и рак.

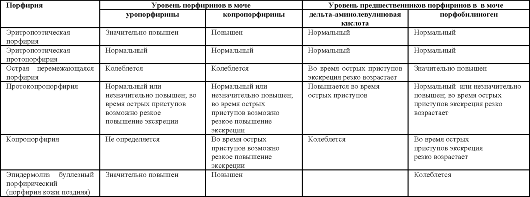
**Подготовка**

• Пациенту следует объяснить, что анализ позволяет диагностировать нарушения синтеза гемоглобина.

• При подозрении на отравление свинцом пациенту (а если это ребенок, то его родителям) объясняют, что исследование позволяет подтвердить избыточное количество свинца в организме.

• Каких-либо ограничений в диете и режиме питания не требуется.

**Уровень порфиринов в моче при порфириях**



• Пациенту (или его родителям) сообщают, что для анализа используют суточную мочу, и объясняют, как ее собирать.

• Сотрудники лаборатории и лечащий врач должны знать, принимает ли пациент препараты, которые могут повлиять на результат анализа (в некоторых случаях от их применения необходимо воздержаться).

**Процедура и последующий уход**

• В течение 24 ч мочу собирают в специальный светонепроницаемый контейнер с консервантом (как правило, ледяной уксусной кислотой), препятствующим разрушению АЛК; первую (утреннюю) порцию мочи сливают, а последнюю сохраняют для анализа.

• После сбора мочи пациент может возобновить прием препаратов.

**Меры предосторожности**

• При сборе мочи контейнер хранят в холодильнике или во льду.

• Пробу мочи отправляют в лабораторию сразу после получения.

• Проба мочи не должна подвергаться воздействию прямых солнечных лучей.

• Если мочу получают с помощью постоянного пузырного катетера, мочеприемник на время сбора мочи помещают в темный пластиковый мешок.

• Уровень свинца в крови не является чувствительным показателем отравления этим тяжелым металлом у детей.

**Референтные значения.** В норме экскреция АЛК с мочой колеблется от 1,3 до 7,0 мг/сут (СИ: 10-53 мкмоль/сут). **Отклонение от нормы.** Повышение уровня АЛК в моче отмечается при отравлении свинцом, наследственной тирозинемии, острой порфирии, раке печени и гепатите.

|  |
| --- |
|  |

**Факторы, влияющие на результат анализа**

• Невозможность собрать всю мочу за время исследования, неправильное хранение контейнера с мочой, несвоевременная отправка мочи в лабораторию.

• Применение барбитуратов и гризеофульвина (уровень АЛК в моче повышается из-за накопления порфиринов в печени).

• Применение витамина Е в терапевтических дозах (возможно снижение экскреции АЛК).

**БИЛИРУБИН**

В основе метода выявления пациентов с **билирубинурией** лежит цветная реакция между водорастворимым прямым (конъюгированным) билирубином и специальным реактивом. Появление билирубина в моче может быть следствием инфекционного или токсического поражения печени, а также заболеваний желчных путей.

Одновременное определение уровня билирубина и уробилиногена в моче помогает установить причину желтухи. Исследование можно выполнить как у постели больного (с помощью тест-полосок), так и в лабораторных условиях.

**Цель**

• Выяснить причину желтухи.

• Сравнить уровень билирубина в моче и сыворотке крови с результатами определения активности печеночных ферментов.

**Подготовка**

• Пациенту следует объяснить, что анализ позволяет выявить причину желтухи.

• Каких-либо ограничений в диете и режиме питания не требуется.

• Пациенту сообщают, что для анализа используют произвольно взятую пробу мочи.

• Пациента информируют о том, что анализ можно выполнить в домашних условиях или в лаборатории.

• Сотрудники лаборатории и лечащий врач должны знать, принимает ли пациент препараты, которые могут повлиять на результат анализа (в некоторых случаях от их применения необходимо воздержаться).

**Процедура и последующий уход**

• Собирают произвольно взятую пробу мочи в специальный контейнер.

*Экспресс-анализ с применением тест-полоски*

|  |
| --- |
|  |

• Тест-полоску погружают в мочу и немедленно извлекают.

• Через 20 с сравнивают цвет тест-полоски со специальной шкалой.

• Записывают полученные результаты в медицинскую карту больного.

*Экспресс-анализ с применением тест-таблетки (Ictotest)*

• Наносят 5 капель мочи на асбесто-целлюлозную пластину, способную абсорбировать билирубин.

• Тест-таблетку помещают на влажный участок пластины и наносят на нее 2 капли воды. Если в моче содержится билирубин, пластина окрашивается в цвета от голубого до фио-

летового. Розовая или красная окраска указывает на отсутствие билирубинурии.

• После анализа пациент может возобновить прием препаратов.

**Меры предосторожности**

• Для анализа используют только свежую пробу мочи, так как через 30 мин пребывания при комнатной температуре или на свету билирубин разрушается.

• Если исследование будет проводиться в лаборатории, пробу мочи отправляют туда сразу после получения.

• При проведении экспресс-анализа необходимо выдержать 20-секундный интервал перед сравнением цвета тест-полоски со специальной шкалой.

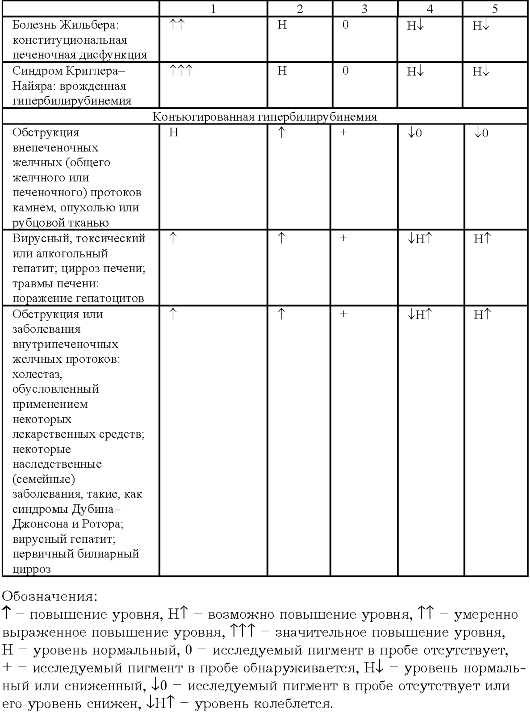
• Освещение в комнате должно быть достаточным для того, чтобы отчетливо различать цвета.

**Референтные значения.** В норме билирубин в моче не обнаруживается.

**Отклонение от нормы.** Моча при выраженной билирубинурии темная, с желтой пеной. Однако для диагностики причины желтухи простой констатации наличия или отсутствия прямого билирубина в моче недостаточно. Этот тест необходимо дополнить определением уровня билирубина в сыворотке крови, а также уровня уробилиногена в моче и кале (см. Изменение уровня билирубина и уробилиногена при различных типах желтухи).

**Изменение уровня билирубина и уробилиногена при различных типах желтухи**

****



**Факторы, влияющие на результат анализа**

• Невозможность выполнить анализ немедленно или отправить пробу мочи в лабораторию сразу после ее получения.

• Применение феназопиридина и производных фенотиазина (хлорпромазин и ацетофеназина малеат) может привести к

ложноположительному результату.

• Прием аскорбиновой кислоты в высоких дозах или нитритов (при использовании тест-полосок типа Chemstrip или N- multistix возможны ложноотрицательные результаты).

• Хранение пробы мочи при комнатной температуре или на све-

ту (билирубин разрушается; его уровень в моче снижается).

**УРОБИЛИНОГЕН**

Уробилиноген - бесцветное водорастворимое вещество, образующееся из билирубина под действием кишечных бактерий. Отсутствие или снижение уровня уробилиногена в моче может указывать на повреждение или нарушение функции печени. Повышенная экскреция уробилиногена наблюдается при гемолизе. Для количественного определения экскреции уробилиногена к 2-часовой пробе мочи добавляют специальный реактив и пробу подвергают спектрофотометрии. **Цель**

• Диагностика обструкции внепеченочных желчных протоков, например общего желчного.

• Дифференциальная диагностика заболеваний печени и гематологических нарушений.

**Подготовка**

• Пациенту следует объяснить, что анализ позволяет оценить функцию печени и состояние желчных путей.

• Пациента просят воздержаться от употребления бананов в течение 48 ч до проведения исследования.

• Пациенту сообщают, что для анализа используют 2-часовую пробу мочи, и объясняют, как ее собирать.

• Сотрудники лаборатории и лечащий врач должны знать, принимает ли пациент препараты, которые могут повлиять на результат анализа (в некоторых случаях от их применения необходимо воздержаться).

**Процедура и последующий уход**

• В большинстве лабораторий исследуют произвольно взятую

пробу мочи, однако в некоторых предпочитают использовать для анализа 2-часовую пробу. Как правило, мочу собирают с 13 до 15 ч, так как в это время экскреция уробилиногена достигает максимального значения.

• После сбора мочи пациент может перейти на обычную диету и возобновить прием препаратов.

**Меры предосторожности.** Пробу мочи отправляют в лабораторию сразу после получения. Исследование необходимо выполнить в течение ближайших 30 мин, так как уробилиноген быстро окисляется и превращается в оранжевый пигмент уробилин. **Референтные значения.** В норме экскреция уробилиногена составляет от 0,1 до 0,8 ЕД Эрлиха/2 ч (СИ: 0,1-0,8 ЕД Эрлиха/2 ч) или от 0,5 до 4,0 ЕД Эрлиха/сут (СИ:

0,5-4,0 ЕД Эрлиха/сут).

**Отклонение от нормы.** Отсутствие уробилиногена в моче возможно при обструктивной желтухе или терапии антибиотиками широкого спектра действия, которые подавляют кишечную микрофлору. Снижение экскреции уробилиногена может быть обусловлено врожденными ферментопатиями, сопровождающимися развитием гипербилирубинемии, или применением препаратов, подкисляющих мочу (хлорид аммония или аскорбиновая кислота). Повышение уровня уробилиногена в моче отмечается при гемолитической желтухе, гепатите и циррозе печени. **Факторы, влияющие на результат анализа**

• Несоблюдение требований, предъявляемых к исследованию, несвоевременная отправка мочи в лабораторию.

• Применение парааминосалициловой кислоты, феназопиридина, прокаина, фенотиазинов и сульфаниламидов (возможно снижение уровня уробилиногена в моче). • Применение ацетазоламида и бикарбоната натрия повышает экскрецию уробилиногена.

• Употребление бананов в течение 48 ч до проведения анализа сопровождается повышением экскреции уробилиногена.