

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«СЕВЕРО-ОСЕТИНСКАЯ ГОСУДАРСТВЕННАЯ МЕДИЦИНСКАЯ АКАДЕМИЯ»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

КЛИНИЧЕСКАЯ БИОХИМИЯ

УЧЕБНОЕ ПОСОБИЕ

*для ординаторов, обучающихся по Федеральным государственным образовательным
стандартам высшего образования*

(уровень подготовки кадров высшей квалификации)

ВЛАДИКАВКАЗ 2022

Клиническая биохимия: учебное пособие / Гурина А.Е., Лолаева А.Т.-

Владикавказ, 2020.- 106 с.

Гурина А.Е. - к.м.н., доцент, заведующая кафедрой биологической химии федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Северо-Осетинская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации сии. Лолаева А.Т. - доцент кафедры биологической химии федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Северо-Осетинская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации

В учебном пособии представлены современные методы изучения и оценки состояния здоровья, освещены основные разделы клинической биохимии.. Настоящее пособие предназначено для ординаторов 1-2 года обучения, обучающихся по УГНС «Клиническая медицина»

Рецензенты:

Джигоев И.Г.. – доктор медицинских наук, профессор. заведующая кафедрой патологической физиологии федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Северо-Осетинская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Митчиев А.К. - доктор медицинских наук, Главный врач ГБУЗ Респубилканская клиническая больница РСО-Алания

Утверждено и рекомендовано к печати Центральным координационным учебно-методическим советом ФГБОУ ВО СОГМА Минздрава России (протокол от 30.04.2020 № 4)

Северо-Осетинская государственная медицинская академия, 2020

СОДЕРЖАНИЕ:

№ П/П	НАЗВАНИЕ ТЕМЫ	СТР.
1.	Биохимические анализы в клинической медицине. Методы клинической биохимии	6-48
2.	Система гемостаза	49-58
3.	Обмен веществ и энергии. Общие пути катаболизма. Гликолиз.	59-85
4.	Цитокины, ишемия и реперфузия: клинические аспекты.	86-106

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АКТГ - адренокортикотропный гормон
17-КС - 17-кетостероиды
17-ОКС - 17-оксикетостероиды
2,4-ДНФГ - 2,4-динитрофенилгидразин
АДФ – аденозиндифосфат
АТФ – аденозинтрифосфат
АЧТВ - активированное частичное тромбопластиновое время
АлАТ – аланинаминотрансфераза
АФП - альфа-1-фетопротеин
АДГ - антидиуретический гормон
АсАТ – аспартатаминотрансфераза
БОФ - белки острой фазы
БКЗ - бромкрезоловый зеленый
БКФ - бромкрезоловый фиолетовый
БФС - бромфеноловый синий
БО - буферные основания
ВМК - ванилилминдальная кислота
ВЭЖХ - высокоэффективная жидкостная хроматография
ГГТП - гамма-глутамилтранспептидаза
ГК – гексокиназа
ГлДГ – глутаматдегидрогеназа
Г-6-ФДГ - глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа
ГВК - гомованилиновая кислота
ГРГ - гонадотропин-рилизинг гормон
ГРИГ - гонадотропин-рилизингингибирующий гормон
ИФА - иммуноферментный анализ
ИХЭД - иммунохроматографическая экспресс-диагностика
ИАП - ингибиторы активаторов пламиногена
КОС - кислотно-основное состояние
КРГ - кортикотропин-рилизинг гормон
КК – креатинкиназа
КБГ - кумасси бриллиантового голубого
ЛДГ – лактатдегидрогеназа
ЛЖСС - латентная (ненасыщенная) железосвязывающая
НЖСС – насыщенная железом способность сыворотки
ЛПВП - липопротеиды высокой плотности
ЛПОНП - липопротеиды очень низкой плотности
ЛППП - липопротеиды промежуточной плотности
ЛГ - лютеинизирующий гормон
МДГ – малатдегидрогеназа
МНО - международное нормализованное отношение
МЕ - международные единицы
МСГ - меланоцит-стимулирующий гормон
МК - мочева кислота
НО (ВЕ) - недостаток оснований
НСЕ - нейронспецифическая енолаза

НЭЖК - неэтерифицированные жирные кислоты
НАД – никотинамидадениндинуклеотид
НАДФ – никотинамидадениндинуклеотидфосфат
ОМ - опухолевые маркеры
ОФ - острая фаза
ПТТГ - пероральный тест на толерантность к глюкозе
п-НФ - п-нитрофенилфосфат
п-НФФ - п-нитрофенилфосфат
ПДФ - продукты деградации фибриногена
ПРГ - пролактин-рилизинг гормон
ПРИГ - пролактин-рилизингингибирующий гормон
ПСА - простатспецифический антиген
ПВ - протромбиновое время
ПО - протромбиновое отношение
РИА - радиоиммунный анализ
РЭА - раково-эмбриональный антиген
РФМК - растворимые фибрин-мономерные комплексы
РЭС - ретикуло-эндотелиальная система
СКФ - скорость клубочковой фильтрации
СТРГ - соматотропин-рилизинг гормон
СТГ - соматотропный гормон
СРБ - С-реактивный белок
ССК - сульфосалициловая кислота
ТРГ - тиреотропин-рилизинг гормон
ТТГ - тиреотропный гормон
ТПА - тканевой активатор плазминогена
ТГ – триглицериды
ТХУ - трихлоруксусная кислота
ТАФИ - тромбин-активируемый ингибитор фибринолиза
ТВ - тромбиновое время
УПА - урокиназный активатор плазминогена
ФСГ - фолликулостимулирующий гормон
ХМ – хиломикроны
ХС – холестерин
ХЭ – холинэстераза
ХГЧ - хорионический гонадотропин человека
ДГЭА – дегидроэпиандростерон
ДГЭА-С - дегидроэпиандростерон-сульфат
АМСт - антитела к микросомальному антигену тиреоцитов
Е₂– эстрадиол
SHBG - глобулин, связывающий половые гормоны

ТЕМА: БИОХИМИЧЕСКИЕ АНАЛИЗЫ В КЛИНИЧЕСКОЙ МЕДИЦИНЕ. МЕТОДЫ КЛИНИЧЕСКОЙ БИОХИМИИ.

Основные вопросы темы.

- 1) Место клинической биохимии среди других прикладных клинических дисциплин
- 2) Применение биохимических анализов (скрининг, мониторинг, диагноз, прогноз)
- 3) Отбор образцов для анализов (запрос на анализ)
- 4) Понятие о биохимических стандартах и контроле качества биохимического материала
- 5) Лабораторные методы оценки белкового обмена (азотометрические, гравиметрические, «преципитационные», спектрофотометрические, рефрактометрические, колориметрические)
- 6) Лабораторные методы оценки ферментативного обмена
- 7) Лабораторные методы оценки пигментного обмена
- 8) Лабораторные методы оценки углеводного обмена
- 9) Методы определения показателей липидного обмена
- 10) Лабораторные методы оценки кислотно-основного состояния

Актуальность темы.

Клиническая биохимия – клинко-диагностическая дисциплина, которая занимается разработкой и использованием стандартных методов диагностики, а также осуществляет контроль за течением заболеваний с позиций биохимии. Клиническая биохимия является важнейшим разделом лабораторной диагностики, наряду с клинической лабораторной гематологией, иммунологией, клинической серологией и микробиологией, клинической токсикологией и др. Данная дисциплина располагает специфическим набором аналитического оборудования, использует множество диагностических методов и позволяет врачу-клиницисту оценить диагностически и прогностически значимые нарушения биохимических процессов в организме человека. Эта область лабораторной диагностики достаточно бурно развивается. Современная клиническая биохимия позволяет существенно облегчить квалифицированную и обоснованную постановку диагноза, выбор лечения и оценку прогноза при многих заболеваниях.

Клинко-биохимические исследования выполняются практически всем пациентам. Их применяют главным образом для подтверждения или уточнения диагноза, характеристики формы, тяжести течения и определения прогноза болезни, выбора этиологической и патогенетической терапии, контроля за результатами лечения, а также для обнаружения патологии при скрининговых исследованиях.

В зависимости от клинических задач биохимические исследования могут производиться однократно и многократно (в динамике), а также в процессе проведения функциональных или фармакологических тестов

со стимуляцией или торможением этапов исследуемого обмена веществ, клеточных или гуморальных реакций либо других функций, выраженность или качество которых отражается в параметрах определяемого лабораторного показателя.

Биохимические технологии регулярно обогащаются новыми методами исследований. Повышение их чувствительности и специфичности способствует расширению объектов биохимического анализа. Помимо традиционного анализа сыворотки крови и мочи все шире в диагностических целях используется конденсат выдыхаемого воздуха, выпотная, слезная жидкость, ликвор, клеточные элементы и др. Широкое внедрение биохимических анализаторов позволяет проводить комплексный анализ с использованием все меньшего объема биологической пробы.

Преаналитический этап биохимических исследований.

Забор биологического материала для выполнения биохимического лабораторного исследования осуществляется до проведения лечебно-диагностических мероприятий или после него, временной промежуток определяется индивидуально.

В случае проведения забора биологического материала у пациентов, подвергнутых хирургическим и другим вмешательствам, для выполнения биохимического лабораторного исследования необходимо учитывать следующие обстоятельства:

- в послеоперационном периоде, в зависимости от его объема и характера, а также вследствие остаточного влияния самого патологического процесса, изменения различных показателей жизнедеятельности организма могут сохраняться от нескольких дней до трех недель;
- после инфузии внутривенных водных растворов веществ забор образца крови у пациента должен быть отсрочен не менее чем на 1 час;
- после инфузии жировой эмульсии – не менее, чем на 8 часов.

Существенное влияние на результаты биохимического исследования биологического материала оказывают условия периода, предшествующего забору у пациента образца биологического материала. С этой целью в обязательном порядке учитываются следующие факторы:

- лечебно-диагностические процедуры, проводимые пациенту (инъекции, инфузии, трансфузии, введение рентгеноконтрастных средств, иммуноцинтиграфия, диализ, эндоскопическое исследование, оперативные вмешательства, физиопроцедуры, методы функциональной диагностики);
- воздействие ионизирующего излучения в анамнезе пациента;
- назначение пациенту лечебного питания с учетом тяжести состояния и наличия хронического заболевания.

В случае проведения забора биологического материала у пациента, получающего лекарственные средства с учетом имеющегося заболевания, врач-специалист, оказывающий медицинскую помощь пациенту, обязан отменить за 2-3 суток лекарственные средства, назначенные пациенту и способные повлиять на результаты лабораторного исследования, если отмена лекарственных

ного средства не ухудшит состояние пациента. При невозможности отмены пациенту лекарственных средств, используемых в процессе оказания медицинской помощи, при интерпретации лабораторных исследований необходимо учитывать их влияние на достоверность полученных результатов. При этом забор образца крови должен быть произведен до приема очередной дозы лекарственных средств.

В бланке-направлении, сопровождающем доставку биологического материала в клинико-диагностическую лабораторию, в обязательном порядке указываются лекарственные средства, принимаемые пациентом, которые могут повлиять на результаты исследований.

Забор крови у пациента, которому произведено внутривенное введение лекарственного средства, проводится после завершения фазы его распределения, через 1–2 часа, с обязательным указанием в бланке-направлении на биохимическое лабораторное исследование времени после приема последней дозы лекарственного средства. В случае внутривенного введения лекарственных средств из группы сердечных гликозидов, забор крови проводится через 6–8 часов после него.

Если нет специальных указаний, для плановых биохимических исследований кровь забирают из вены утром (между 7 и 9 часами) натощак (через 8–12 часов после последнего приема пищи). В случае проведения клинических лабораторных исследований крови в иное время суток, в бланке-направлении указывается период времени, прошедший после последнего приема пищи (после еды в крови повышается содержание глюкозы, холестерина, триглицеридов, железа, неорганических фосфатов, аминокислот). Во внимание должны приниматься колебания содержания ряда аналогов аналитов в организме пациента в течение суток.

Суточные колебания значений концентрации некоторых аналитов.

Аналиты	Максимум содержания (время суток, часы)	Минимум содержания (время суток, часы)	Диапазон колебаний (% от среднеустойчивой величины)
АКТГ	6-10 0	0-4	150-200%
Альдостерон	2-4	12-14	60-80%
Гемоглобин	6-18	22-24	8-15%
Железо	14-18	2-4	50-70%
Калий	14-16	23-1	5-10%
Кортизол	5-8	21-3	18-200%
Пролактин	5-7	10-12	80-100%
Ренин	0-6	10-12	120-140%
Соматотропин	21-23	1-21	300-400%
T ₄	8-12	23-3	10-20%
Тестостерон	2-4	20-24	30-50%
ТСГ	20-2	7-13	5-15%
Фосфор неор-	2-4	8-12	60-80%

галический			
Эозинофилы	4-6	18-20	30-40%

Биохимические лабораторные тесты.

Биохимические лабораторные исследования широко используются в клинической практике в тех случаях, когда в основе заболевания лежат метаболические нарушения (например, сахарный диабет), повреждения тканей (например, инфаркт миокарда), воспалительные процессы (например, ревматические заболевания) или нарушения функций органов и тканей (например, почечная недостаточность). В практической медицине биохимические тесты используются для решения следующих задач:

1. скрининга – выявления болезни на доклинической стадии;
2. диагностики – подтверждения или исключения диагноза;
3. прогноза – определения величины риска развития заболевания, особенностей течения заболевания и его исхода;
4. мониторинга – наблюдения за течением заболевания или реакцией на лечение.

Биохимический анализ крови предполагает исследование различных химических аналитов – белков, липидов, углеводов, различных продуктов их превращений, активности ферментов индивидуальных белков и др, имеющих клиническое значение.

Материал для исследования: сыворотка венозной крови.

Взятие крови производится натошак из локтевой вены в специальную вакуумную систему активатором свертывания.

Виды пробирок для взятия крови:

- Вакуумная система (белая/красная крышка) с активатором свертывания;
- Вакуумная система (коричневая/желтая крышка) с активатором свертывания и разделительным гелем.

Полученная из крови сыворотка остается стабильной в течение 7 дней при 2–8 °С. Архивированная сыворотка может храниться в замороженном виде при -20 °С.

- Для исследования уровня гликированного гемоглобина необходима цельная венозная кровь, взятие которой производится в вакуумную систему с антикоагулянтom K2ЭДТА или K3ЭДТА (сиреневая крышка при использовании пробирок типа Vacutainer, красная крышка для пробирок типа Monovette). Полученная кровь может храниться при комнатной температуре – до 6 часов, при температуре 2–8 °С – не более 24 часа.

Исследование активности ферментов.

Активность ферментов определяется с диагностическими целями преимущественно в сыворотке крови. Большая часть ферментов в крови – это тканевые ферменты, попадающие в кровь в результате разрушения клеток, где их концентрация в 1000-10 000 выше, чем в крови. В норме в сыворотке крови регистрируется только очень незначитель

ная активность ферментов. Причинами повышения активности ферментов при патологии являются:

- прямое повреждение клеточных мембран (вирусами и химическими соединениями);
- гипоксия, аноксия и ишемия тканей;
- повышенный синтез в тканях (рост злокачественной опухоли).

В сыворотке крови определяют три основные группы ферментов: внутриклеточные, секреторные и экскреторные. Большинство ферментов являются внутриклеточными, в зависимости от локализации они разделяются на:

- неспецифические ферменты, которые катализируют общие для всех тканей реакции обмена и находятся в большинстве органов и тканей (например, АСТ, АЛТ, ЛДГ, амилаза, липаза и др.);
- органоспецифические, присутствуют только в определенном типе тканей или органе в высокой концентрации. Повышение в крови уровня органоспецифического фермента указывает прежде всего на повреждение клеток той ткани, в которой этот фермент представлен в наибольшем количестве.

Специфичность ферментов для диагностики патологии.

Фермент	Орган	Диагностическое значение
α-амилаза	Поджелудочная железа	Острый панкреатит, отит
АЛТ	Печень	Заболевания паренхимы печени
АСТ	Миокард, печень	Инфаркт миокарда, заболевания паренхимы печени, поражения скелетных мышц
ГГТ	Печень	Патология желчевыводящих путей, алкоголизм
КК	Скелетные мышцы, сердце, гладкие мышцы	Инфаркт миокарда, поражения скелетных мышц
КФ	Простата, костная ткань	Аденома, рак простаты, метаболические заболевания костной ткани
ЛДГ	Печень, сердце, скелетные мышцы, эритроциты, тромбоциты, лимфатические узлы	Заболевания паренхимы печени, инфаркт миокарда, гемолиз, неэффективный эритропоэз, лимфомы
Липаза	Поджелудочная железа	Острый панкреатит
Холинэстераза	Печень	Отравления фосфорорганическими соединениями, заболевания паренхимы печени
ЩФ	Печень, костная ткань,	Метаболические заболевания

	кишечник, почки	костной ткани, гепатобилиарная патология
--	-----------------	---

Секреторные ферменты (псевдохолинэстераза) синтезируются в печени и постоянно высвобождаются в плазму. Их активность в сыворотке крови выше, чем в клетках или тканях. В клинической практике они представляют интерес, когда их активность в сыворотке крови становится ниже нормы за счет нарушения функции печени.

Экскреторные ферменты образуются органами пищеварительной системы (поджелудочной железой, слизистой оболочкой кишечника, печени, эпителием желчных путей). К ним относятся α -амилаза, липаза, щелочная фосфатаза (ЩФ) и др. В норме их активность в сыворотке крови низка и постоянна. Однако при патологии, когда блокирован любой из обычных путей их экскреции, активность этих ферментов в сыворотке крови значительно увеличивается.

Единицы активности ферментов.

За единицу активности любого фермента в лабораторной диагностике принимают то количество, которое в оптимальных условиях катализирует превращение 1 субстрата в 1 (мкмоль/мин) при $t^0=37^{\circ}\text{C}$. При этом объемная активность фермента выражается как МЕ/л (или Ед/л), удельная активность – как МЕ/мг белка.

Аспартатаминотрансфераза (АСТ).

Референтные величины активности АСТ в сыворотке: 0–5–40 Ед/л.
Определение активности АСТ используют для выявления и оценки выраженности цитолитического синдрома при диагностике и мониторинге за болеваний печени, сердца. Тест используют вместе с определением активности АЛТ.

Активность АСТ повышена у 93–98% пациентов с инфарктом миокарда (ИМ) в 2–20 раз. При ИМ АСТ повышается в сыворотке через 6–8 ч, максимальной активности она достигает через 24–36 ч и снижается до нормального уровня к 5–6-му дню. Расширение зоны инфаркта приводит ко второму циклу повышения активности. Степень повышения активности АСТ является мерой массы миокарда, вовлеченной в патологический процесс. Иногда активность АСТ повышается еще до возникновения электрокардиографических признаков ИМ, а отсутствие снижения ее уровня после 3–4-го дня заболевания прогностически неблагоприятно.

При стенокардии активность АСТ, как правило, остается в пределах нормы. Однако повышение АСТ обнаруживают при тяжелой форме коронарной недостаточности в первые 24 ч после приступа (нормализация происходит на 2-й, реже 3-й день после приступа), а также при длительных приступах пароксизмальной тахикардии.

АСТ повышается также при остром гепатите и других тяжелых поражениях гепатоцитов. Умеренное увеличение наблюдается при механической желтухе, у пациентов с метастазами в печень и циррозом. Коэффициент Де Ритиса, т.е. отношение АСТ/АЛТ, в норме равно 1,33, при заболеваниях печени ниже этой величины, а при заболеваниях сердца – выше.

**Алгоритм для принятия клинических решений при установлении
этиологии поражения печени по значению активности уровня АСТ.**



В клинической практике нашло широкое применение одновременное определение в крови активности АСТ и АЛТ; поскольку оно намного информативнее с клинической точки зрения (позволяет судить о локализации и глубине поражения, активности процесса и прогнозировать исход болезни).

Аланинаминотрансфераза (АЛТ).

Референтные величины активности АЛТ в сыворотке: 0–7–40 Ед/л. АЛТ содержится в скелетной мускулатуре, печени, сердце. В сердечной мышце ее значительно меньше, чем АСТ. Самых больших концентраций АЛТ достигает в печени. Повышение активности аминотрансфераз (АСТ и АЛТ) в 1,5–5 раз по сравнению с верхней границей нормы рассматривают как умеренную гиперферментемию, в 6–10 раз – как гиперферментемию средней степени, более чем в 10 раз – как высокую. Степень подъема активности аминотрансфераз говорит о выраженности цитолитического синдрома, но не указывает прямо на глубину нарушений собственно функции органа.

При ИМ повышение активности АЛТ в сыворотке крови выявляется в 50–70% случаев, чаще при обширных некрозах сердечной мышцы. Наибольшее увеличение активности АЛТ отмечается в острой фазе, достигая в среднем 130–150% от нормы и заметно уступает таковому АСТ, составляющему в среднем 450–500% от нормы.

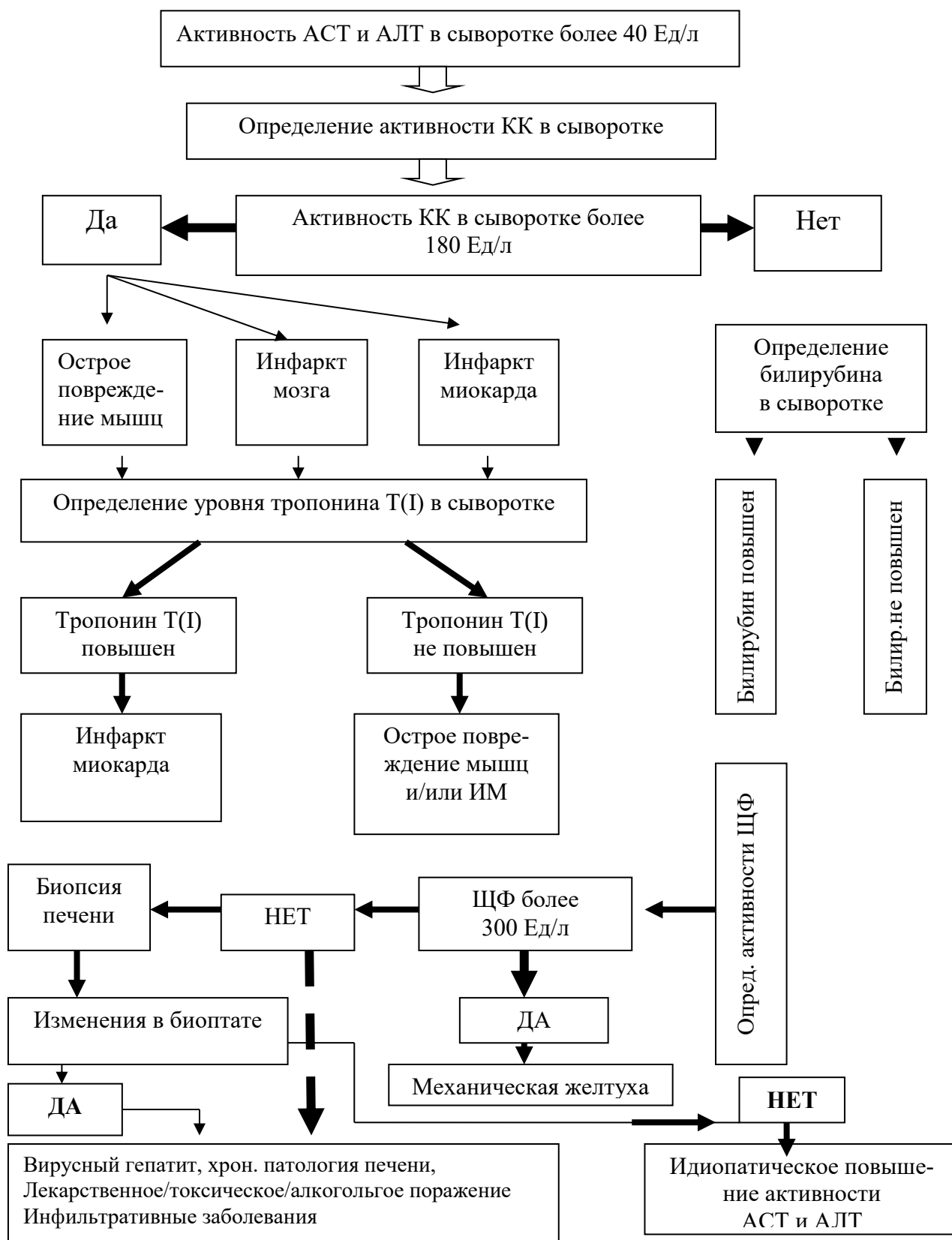
При заболеваниях печени прежде всего и наиболее значительно по сравнению с АСТ изменяется активность АЛТ. При остром гепатите, независимо от его этиологии, активность аминотрансфераз повышается у всех больных. Особенно изменяется активность АЛТ, содержащейся в цитоплазме, что способствует быстрому выходу ее из клетки и поступлению в кровяное русло, поэтому АЛТ – более чувствительный тест ранней диагностики острого гепатита, чем АСТ. Период полураспада АЛТ около 50 ч. АСТ расположена преимущественно в митохондриях, период полураспада около 20 ч, реагирует на более тяжелые повреждения гепатоцита. При остром вирусном гепатите АЛТ и АСТ повышаются за 10–15 дней до появления желтухи при гепатите А, и за много недель при гепатите В, причем повышаются они одновременно, но АЛТ – значительно больше. При типичном течении вирусного гепатита активность АЛТ достигает максимума на 2–3-й неделе заболевания. При благоприятном его течении активность АЛТ нормализуется через 30–40 сут, активность АСТ – через 25–35 сут. Повторное или прогрессирующее повышение активности аминотрансфераз свидетельствует о новом некрозе или рецидиве болезни. Удлинение периода повышенной активности аминотрансфераз часто служит неблагоприятным признаком, так как может свидетельствовать о переходе острого процесса в хронический.

В остром периоде вирусного гепатита при всех формах, кроме тяжелой, коэффициент Де Ритиса колеблется от 0,55 до 0,65 при тяжелом течении заболевания этот коэффициент составляет в среднем 0,83, что отражает более значительное повышение активности АСТ. В дифференциально-диагностическом отношении имеет некоторое значение то, что при алкогольных поражениях печени, в противоположность вирусным, характерно преимущественное повышение активности АСТ и коэффициента Де Ритиса бо-

лее 2. Для хронических гепатитов характерна умеренная и средняя гиперферментемия.

При латентных формах цирроза печени повышения активности ферментов не наблюдается. При активных формах стойкий, хотя и незначительный подъем активности аминотрансфераз встречается в 74–77% случаев.

Алгоритм лабораторной диагностики причин повышения активности трансаминаз.



Повышение активности АЛТ и АСТ может быть выявлено у практически здоровых носителей поверхностного антигена гепатита В, что указывает на наличие внешне бессимптомных активных процессов в печени. Активность АСТ и АЛТ, а также щелочной фосфатазы (ЩФ) повышается при разрешении хронической сердечной недостаточности (пик обычно на 3-й–4-е сутки).

Лактатдегидрогеназа (ЛДГ).

Референтные величины активности ЛДГ в сыворотке 120—480 Ед/л. Наибольшая активность ЛДГ обнаружена в почках, сердечной мышце, скелетной мускулатуре и печени. ЛДГ содержится не только в сыворотке, но и в значительном количестве в эритроцитах, поэтому сыворотка для исследования должна быть без следов гемолиза.

Большинство органов и тканей человека содержит пять изоферментов ЛДГ. Характер изоферментного спектра ЛДГ и тип обмена веществ в ткани коррелируют между собой. В тканях с преимущественно аэробным обменом веществ (сердце, мозг, почки) наибольшей ЛДГ-активностью обладают изоферменты ЛДГ1 и ЛДГ2 (или гидроксибутиратдегидрогеназа). В тканях с выраженным анаэробным обменом веществ (печень, скелетная мускулатура) преобладают изоферменты ЛДГ4 и ЛДГ5. В сыворотке крови здорового человека постоянно обнаруживаются все пять изоферментов ЛДГ. Имеется закономерность в отношении активности изоферментов ЛДГ: активность ЛДГ2 > ЛДГ1 > ЛДГ3 > ЛДГ4 > ЛДГ5. Повреждение того или иного органа изменяет изоферментный спектр сыворотки крови, причем эти изменения обусловлены спецификой изоферментного состава поврежденного органа.

В лаборатории наиболее часто определяют активность общей ЛДГ (сумму всех пяти изоферментов), но могут определять более специфичный для сердечной мышцы изофермент ЛДГ1 (гидроксибутиратдегидрогеназа) или ЛДГ5 – для заболеваний печени.

Повышенная активность ЛДГ в физиологических условиях наблюдается у беременных, новорожденных, а также после интенсивных физических нагрузок.

Повышение активности ЛДГ при ИМ отмечается через 8–10 ч после его начала. Спустя 48–72 ч достигается максимум активности (повышение обычно в 2–4 раза), и она остается увеличенной в течение 10 сут. Эти сроки могут варьировать в зависимости от величины участка поврежденной мышцы сердца. Увеличение активности общей ЛДГ у пациентов с ИМ происходит за счет резкого повышения ЛДГ1 и частично ЛДГ2. У пациентов со стенокардией повышения активности ЛДГ не наблюдается, что позволяет применять определение ЛДГ в пределах 2–3 сут после ангинозного приступа как высоконадежный критерий отсутствия поражения сердечной мышцы.

Умеренное увеличение общей ЛДГ наблюдается у большинства пациентов с острым коронарным синдромом (ОКС) (без инфаркта), миокардитом, у больных хронической сердечной недостаточностью, с застойными явле

ниями в печени. У больных аритмией сердца определяются нормальные величины ЛДГ, а применение электроимпульсной терапии иногда ведет к ее увеличению.

Источником увеличения активности ЛДГ может быть легочная ткань при эмболии и инфаркте легких. Сочетание нормальной активности АСТ, увеличенной ЛДГ и повышения концентрации билирубина может служить диагностической триадой легочной эмболии и дифференциации ее от ИМ. При пневмониях активность фермента иногда может не повышаться.

При миопатиях (мышечные дистрофии, травматические повреждения мышц, воспалительные процессы, расстройства, связанные с эндокринными и метаболическими заболеваниями) отмечается увеличение активности ЛДГ; при нейрогенных заболеваниях мышц активность ЛДГ не повышается.

При остром вирусном гепатите активность ЛДГ в сыворотке крови увеличена в первые дни желтушного периода, и при легкой и среднетяжелой формах заболевания довольно быстро возвращается к нормальному уровню. Тяжелые формы вирусного гепатита, и особенно развитие печеночной недостаточности, сопровождаются выраженным и более длительным повышением ЛДГ. При механической желтухе на первых стадиях закупорки желчных протоков активность ЛДГ в норме, на более поздних стадиях наблюдается подъем активности ЛДГ вследствие вторичных повреждений печени.

Щелочная фосфатаза (ЩФ).

ЩФ широко распространена в тканях, особенно в слизистой оболочке кишечника, остеобластах, стенках желчных протоков печени, плаценте и лактирующей молочной железе. В сыворотке крови можно определить активность общей ЩФ (ее называют печеночной), а также отдельно активность костной и интестинальной (кишечной) ЩФ.

Референтные величины активности ЩФ в сыворотке крови.

Возрастная группа	Общая ЩФ (Ед/л)
Новорожденные	Менее 420
Дети	Менее 480
Взрослые	Менее 150

Примерно лишь у 65% госпитализированных пациентов высокая активность ЩФ обусловлена заболеваниями печени. Активность ЩФ наиболее часто повышается вследствие повреждения или деструкции гепатоцитов или нарушения оттока желчи (холестаз). Некроз печеночных клеток как причина повышения активности ЩФ играет ведущую роль при вирусных и аутоиммунных гепатитах, токсических и лекарственных повреждениях печени. Холестаз как причина повышения активности ЩФ в крови развивается при внепеченочной обструкции желчных протоков например, при закупорке камнем или развитии послеоперационной стриктуры), сужении внутрипеченочных

протоков (например, при первичном склерозирующем холангите), повреждении желчных протоков (например, при первичном билиарном циррозе печени) или нарушении транспорта желчи на уровне мелких желчных протоков (при применении ряда лекарственных препаратов, например, хлорпромазина). В ряде случаев активность ЩФ повышается при одновременном действии обоих механизмов повреждения.

У 30% желтушных пациентов с циррозом печени выявляется увеличение активности ЩФ. Повышение активности ЩФ наблюдается у 90% больных первичным раком печени и при метастазах в печень. Резко возрастает активность ЩФ при отравлениях алкоголем на фоне хронического алкоголизма. Она может повышаться при приеме лекарственных средств, обладающих гепатотоксическим эффектом (тетрацилин, парацетамол, фенацетин, 6-меркаптопурин, салицилаты и др.). Приблизительно у 50% пациентов с инфекционным мононуклеозом на 1-ой неделе заболевания отмечается повышение активности ЩФ.

Закупорка внепеченочных желчных протоков сопровождается резким увеличением активности ЩФ. При тяжелой обструктивной желтухе активность ЩФ в сыворотке крови может превышать верхний предел нормы в 10 раз и более.

У женщин, принимающих противозачаточные препараты, содержащие эстроген и прогестерон, может развиваться холестатическая желтуха и с повышением активности ЩФ. Очень высокие цифры активности фермента наблюдаются у женщин с преэклампсией, что является следствием повреждения плаценты. Низкая активность ЩФ у беременных говорит о недостаточности развития плаценты.

Помимо названных, повышение активности ЩФ определяется при следующих заболеваниях и состояниях: повышенном метаболизме в костной ткани (при заживлении переломов); первичном и вторичном гиперпаратиреозе, остеомалации, почечном рахите, обусловленном витамин-D-резистентным рахитом, сочетающимся с вторичным гиперпаратиреозом; цитомегаловирусной инфекции у детей, внепеченочном сепсисе, язвенном колите, регионарном илеите, кишечных бактериальных инфекциях, тиреотоксикозе. Это обусловлено тем, что ЩФ вырабатывается не только в печени, но и в других органах – костях, кишечнике.

Значения уровня активности ЩФ (пороги для принятия клинических решений) при установлении клинического диагноза поражения печени представлены на рисунке. Ряд цифр представляет собой множители, на которые умножается значение верхнего референтного предела для ЩФ.

Снижение активности фермента отмечается при гипотиреозе, цинге, выраженной анемии, квашиоркоре, гипофосфатемии.

**Алгоритм для принятия клинических решений при установлении
этиологии поражения печени по значениям активности ЩФ.**



Костная щелочная фосфатаза (остаза).

Костная ЩФ продуцируется остеобластами кости. У детей ЩФ повышена до периода полового созревания. Референтные величины активности костной ЩФ в сыворотке крови представлены в таблице.

Референтные величины активности костной ЩФ в сыворотке.

Возраст	Активность, Ед/л
1 месяц	60 – 181
3 года	60 – 121
10 лет	90 – 181
Взрослые до 31 года	23 – 55
Взрослые старше 31 года	16 – 46

Увеличение активности общей и костной ЩФ сопровождается рахит любой этиологии, болезнь Педжета, костные изменения, связанные с гиперпаратиреозом. Быстро растет активность фермента при остеогенной саркоме, метастазах рака в кости, миеломной болезни, лимфогранулематозе с поражением костей. При лечении гипокальциемии витамином D необходимо контролировать его по уровню активности ЩФ в крови. Нормализация активности ЩФ является показанием к прекращению лечения.

При болезни Педжета содержание кальция и фосфатов в крови обычно в пределах нормы, но характерен очень высокий уровень активности ЩФ, в связи с чем следует регулярно мониторировать уровень ЩФ. Быстрое нарастание уровня ЩФ может указывать на малигнизацию пораженной кости.

Остеопороз, в основе которого лежит первичное уменьшение массы матрикса костной ткани (потеря кальция при этом вторична), сопровождается нормальным уровнем общей ЩФ в крови или незначительным ее повышением, плохо коррелирует с параметрами костеобразования. Однако костная ЩФ служит чувствительным маркером ускоренного метаболизма кости во время менопаузы.

Гамма-глутамилтрансфераза (ГГТ).

Референтные величины активности ГГТ в сыворотке: у мужчин – 10–70 Ед/л; у женщин – 6–45 Ед/л.

В значительных концентрациях ГГТ обнаружена в печени, поджелудочной железе, почках и предстательной железе (поэтому у мужчин активность ГГТ в сыворотке крови приблизительно на 50% выше, чем у женщин).

Повышение активности ГГТ в сыворотке крови может быть обусловлено следующими причинами:

- усилением синтеза в результате активации ферментов, обеспечивающих этот процесс, алкоголем и лекарственными препаратами;

- повреждением клеточных мембран под действием токсических агентов (в том числе спирта), при ишемическом повреждении и инфекционном поражении печени;
- освобождением фермента от связи с клеточными мембранами в результате детергентного действия поверхностно активных желчных кислот при всех видах холестаза.

Изменение активности ГГТ в сыворотке имеет большое диагностическое значение при заболеваниях печени и гепатобилиарного тракта. Этот фермент более чувствителен к нарушениям в клетках печени, чем АЛТ, АСТ, ЩФ и т.д. Отсутствие повышенной активности этого фермента при костных заболеваниях позволяет дифференцировать источник повышения ЩФ.

Особенно чувствительна ГГТ к влиянию на печень длительного потребления алкоголя. У лиц, злоупотребляющих алкоголем, уровень ГГТ в сыворотке коррелирует с количеством принимаемого алкоголя. Тест особенно ценен для контроля лечения алкоголизма. Прекращение приема алкоголя снижает активность фермента приблизительно на 50% в течение 10 дней.

Определение активности ГГТ используется для установления гепатотоксичности и положительно в 90% случаев заболеваний печени. В большинстве случаев у таких больных в крови наблюдается повышение активности трансаминаз и ГГТ. Изолированное повышение активности ГГТ наблюдают у 6–20% пациентов с патологией гепатобилиарной системы. Повышение активности ГГТ более чем в 3 раз вызывают антиконвульсантные препараты, жировая дистрофия печени и сердечная недостаточность.

При острых гепатитах активность ГГТ повышается раньше, чем активность АСТ и АЛТ. На высоте заболевания активность ГГТ ниже (повышена в 2–5 раз), чем активность АСТ и АЛТ, и нормализуется медленнее. Это позволяет использовать ГГТ при контроле за выздоровлением пациента.

Наиболее высокую активность ГГТ (в 5–30 раз выше референтного интервала) наблюдают при внутри- и внепеченочном холестазе. Несколько меньшие значения активности фермента регистрируют при первичных опухолях печени и метастазах в печень. При злокачественных опухолях другой локализации постепенное увеличение активности ГГТ указывает на наличие метастазов в печень. Активность ГГТ может быть использована в качестве маркера рака поджелудочной и предстательной железы, так как отражает ремиссии и рецидивы.

Необходимо еще раз заметить, что ГГТ многозначна в диагностическом отношении. По крайней мере пять процессов повышают ее активность: цитолиз, холестаз, интоксикация алкоголем, опухолевой рост в печени, лекарственная интоксикация. Такая этиологическая разнородность механизмов повышения ГГТ требует очень тщательной оценки причин гиперферментемии. Обнаружение высокой активности ГГТ заставляет искать причину этого повышения. Как «отсеивающий» тест и метод контроля за течением

известного патологического процесса, исследование ГГТ буквально незаменимо по клиническому значению.

Холинэстераза (ХЭ).

Референтные величины активности ХЭ в сыворотке: 3600–12900 Ед/л.

В тканях человека встречаются два различных фермента этого типа: ацетилхолинэстераза (истинная ХЭ), которая преимущественно находится в нервной ткани, скелетных мышцах, эритроцитах; и сывороточная, или псевдо-ХЭ, которая широко распространена, присутствует в печени, поджелудочной железе, секретируется печенью в кровь.

Определение активности ХЭ в сыворотке представляет наибольший клинический интерес для диагностики отравлений фосфорорганическими отравляющими веществами и инсектицидами, а также как показатель состояния белково-синтетической функции печени. Отравления фосфорорганическими веществами и инсектицидами сопровождаются выраженным снижением активности ХЭ.

Активность ХЭ наиболее резко снижается при тяжелых хронических заболеваниях печени, особенно при циррозе. Значительное снижение активности ХЭ наблюдается при распространенных blastomatosных поражениях печени. В начальных стадиях обтурационной желтухи снижение активности ХЭ встречается очень редко.

Ярким проявлением снижения белково-синтетической функции печени у пациентов с вирусным гепатитом при развитии острой печеночной недостаточности служит резкое снижение активности ХЭ, при этом степень снижения активности ХЭ обратно пропорциональна тяжести течения заболевания. Наиболее низкие показатели отмечаются у пациентов за несколько дней до развития печеночной комы. Однако длительный период полураспада сывороточной ХЭ (7–10 дней) снижает ее возможности в диагностике острой печеночной недостаточности.

При ИМ резкое падение активности ХЭ отмечается к концу первых суток заболевания и обусловлено шоком, который приводит к тяжелому повреждению печени.

В последнее время исследование этого фермента широко используется для контроля за применением релаксантов в хирургической практике. Курарепоподобные вещества (дитилин, сукцинилхолин), применяемые в хирургии для расслабления мышц, обычно быстро разрушаются. Тяжелые последствия применения этих средств (длительное апноэ, холинергический шок) возможны как при приобретенном недостатке ХЭ (чаще при хронических заболеваниях печени), так и при врожденном ферментном дефекте.

При нефротическом синдроме наблюдается повышение активности ХЭ. Это связано с увеличением синтеза альбуминов печенью из-за быстрой потери мелкодисперсной фракции белков с мочой.

Повышение ХЭ наблюдается также иногда при ожирении и экссудативной энтеропатии. Небольшое повышение активности ХЭ иногда отмечается при артериальной гипертензии, сахарном диабете, депрессивных неврозах, тревоге, маниакально-депрессивном психозе.

Альфа-амилаза в сыворотке и моче.

Референтные величины активности α -амилазы: в сыворотке: 10–100 Ед/л; в моче – 30–640 Ед/л.

Наиболее богаты α -амилазой поджелудочная и слюнные железы. Плазма крови человека содержит α -амилазы двух типов: панкреатическую (Р-тип), вырабатываемую поджелудочной железой, и слюнную (S-тип), продуцируемую слюнными железами.

В физиологических условиях амилаза сыворотки крови состоит на 40% из панкреатической амилазы и на 60% из слюнной амилазы.

Определение активности α -амилазы имеет важное значение в диагностике заболеваний поджелудочной железы. Повышение активности α -амилазы в сыворотке крови в 2 и более раз должно расцениваться как симптом поражения поджелудочной железы. Небольшая гиперاميлаземия дает основание заподозрить патологию поджелудочной железы, но может иногда наблюдаться при заболеваниях других органов.

С мочой выделяется в основном Р-амилаза, что является одной из причин большей информативности о функциональном состоянии поджелудочной железы уроамилазы, чем амилазы сыворотки крови. 65% амилазной активности мочи обусловлено панкреатической амилазой. Этим объясняется то обстоятельство, что при остром панкреатите именно она увеличивается в сыворотке (до 89%) и особенно в моче (до 92%), без изменения показателей амилазы слюнных желез.

При остром панкреатите активность амилазы крови и мочи увеличивается в 10–30 раз. Гиперамилаземия наступает в начале заболевания (уже через 4–6 ч), достигает максимума через 12–24 ч, затем быстро снижается и приходит к норме на 2–6-й день. Уровень повышения сывороточной амилазы не коррелирует с тяжестью панкреатита.

Активность амилазы в моче (используется суточная моча или разовая порция мочи) начинает повышаться через 6–10 ч после острого приступа панкреатита и возвращается к норме через 3 сут. В некоторых случаях уровень амилазы в моче имеет две волны повышения в течение 3 сут. Гиперамилазурия при остром и обострении хронического панкреатита регистрируется у 50% пациентов через 8–12 ч, у 25% – через 12–18 ч, у 66,6% – через 18–24 ч, у 75% – через 24–36 ч, у 100% – через 36–48 ч и у 62,5% – через 48–72 ч. Диагностическая чувствительность определения амилазы в сыворотке для острого панкреатита составляет 95%, специфичность – 88%.

Острые панкреатиты могут протекать без повышения активности амилазы (в частности, при панкреонекрозе). Более точную информацию получают при исследовании активности амилазы в суточном объеме мочи. Важ-

ное, а в ряде случаев и решающее значение для распознавания рецидивирующей формы острого панкреатита имеет повторное повышение активности амилазы крови и мочи во время повторяющихся рецидивов болевого синдрома. Данный признак имеет исключительно важное значение для распознавания легких форм рецидивирующего острого панкреатита. Поэтому следует еще раз подчеркнуть необходимость повторных исследований активности α -амилазы мочи на протяжении первых 2 сут заболевания. При различных формах острого панкреатита динамика повышения α -амилазы в крови и моче носит различный характер. Так, для отечного панкреатита характерна кратковременная амилаземия на 1-е-3-и сутки заболевания; для панкреонекроза – высокая и длительная амилаземия или, наоборот, кратковременная гиперамилаземия на 3-й сутки заболевания.

Выявление гиперамилаземии и гиперамилазурии является важным, но не специфичным маркером острого панкреатита; кроме того, повышение ее активности может быть кратковременным. Для большей информативности полученных результатов исследования полезно сочетать определение активности амилазы крови и мочи с параллельным определением концентрации креатинина в моче и сыворотке крови. На основании этих данных рассчитывается индекс амилазо-креатининового клиренса по формуле:

$$\frac{AM \times KpC}{KpM \times AC} \times 100,$$

где AM – амилаза мочи; AC – амилаза сыворотки; KpM – креатинин в моче; KpC – креатинин в сыворотке.

В норме амилазо-креатининовый индекс не выше 3, превышение считается признаком панкреатита. При остром панкреатите уровень амилазы сыворотки и показатель амилазо-креатининового клиренса обычно повышены за счет подавления почечного механизма канальцевой реабсорбции амилазы. При заболеваниях, протекающих под маской панкреатита, содержание амилазы сыворотки может увеличиваться, но показатель амилазо-креатининового клиренса остается нормальным, так как отсутствует канальцевый дефект. Для этого исследования очень важно проводить взятие крови и мочи в одно и то же время.

При хроническом панкреатите активность амилазы в крови и моче повышается (у 10–88 и у 21–70% пациентов соответственно) в период обострения процесса и при возникновении препятствий к оттоку панкреатического сока (воспаление, отек головки поджелудочной железы и сдавление протоков, рубцовый стеноз сосочка двенадцатиперстной кишки и др.). При склеротической форме панкреатита гиперамилаземия определяется также степенью нарушения проходимости протоков и функциональной способностью оставшейся части железы. При хронических панкреатитах с фиброзными изменениями поджелудочной железы обострения, нередко выраженные и распространенные, сопровождаются сравнительно небольшим подъемом активности амилазы. Вследствие нарушения функциональной

способности поджелудочной поджелудочной железы гиперاميлаземия нередко может отсутствовать при остром гнойном панкреатите (при обширных «тотальных» некрозах поджелудочной железы).

При раке поджелудочной железы уровень амилазы в крови и моче в одних случаях повышается; в других же случаях может оставаться нормальным и даже понижаться.

Оценка результатов исследования активности амилазы в крови и моче затруднена тем, что фермент содержится в слюнных железах, толстой кишке, скелетных мышцах, почках, легких, яичниках, маточных трубах, предстательной железе. Поэтому уровень амилазы может быть повышен при многих заболеваниях, имеющих сходную картину с острым панкреатитом: острым аппендиците, перитоните, перфоративной язве желудка и двенадцатиперстной кишки, кишечной непроходимости, холецистите, тромбозе брыжеечных сосудов, а также при феохромоцитоме, диабетическом ацидозе, после операций по поводу пороков сердца, после резекции печени, приема больших доз этанола, употребления препаратов опия, сульфаниламидов, морфина, тиазовых диуретиков, пероральных контрацептивов. Повышение амилазной активности при этих заболеваниях обусловлено разными причинами и носит в большинстве случаев реактивный характер. Вследствие значительных запасов амилазы в ацинарных клетках любое нарушение их целостности или малейшее затруднение оттока секрета поджелудочной железы может привести к значительному попаданию амилазы в кровь. У больных перитонитом увеличение амилазной активности может наблюдаться в результате развития образующих амилазу бактерий. Обычно активность α -амилазы при перечисленных заболеваниях повышается в крови в 3–5 раз.

Снижение активности α -амилазы в крови может быть обнаружено при тиреотоксикозе, ИМ, некрозе поджелудочной железы.

Панкреатическая α -амилаза.

Референтные величины активности панкреатической α -амилазы: сыворотка: 30–55% от общей амилазы в сыворотке (в среднем 43%) или 13–53 Ед/л; моча: 60–70% от общей амилазы в моче (в среднем 65%).

Основная ценность определения Р-типа α -амилазы заключается в том, что увеличение ее активности высокоспецифично для заболеваний поджелудочной железы. Панкреатическая α -амилаза повышается при остром панкреатите. Активность общей амилазы в этом случае повышена за счет панкреатической фракции. Диагностическая чувствительность панкреатической фракции амилазы в сыворотке крови для острого панкреатита составляет 92%, специфичность – 85%.

Определение активности панкреатической фракции амилазы особенно важно при хроническом панкреатите у пациентов с нормальным уровнем общей амилазы. У пациентов с хроническим панкреатитом панкреатическая амилаза составляет 75–80% общей амилазы крови. Повышение панкреатической амилазы указывает на атаку хронического панкреатита, а снижение – на экзокринную недостаточность поджелудочной железы при атрофии аци-

нарной ткани и фиброзе органа у пациентов, длительно страдающих данным заболеванием.

Активность панкреатической α -амилазы помимо диагностики острого панкреатита определяют также после операции на органах брюшной полости с целью ранней диагностики развития осложнения – послеоперационного

панкреатита. Панкреатическая α -амилаза в моче повышается при остром панкреатите, причем составляет основную часть общей амилазы, так как выводится с мочой лучше, чем слюнная фракция.

Активность панкреатической фракции амилазы, в отличие от общей, не повышается при паротите, диабетическом кетоацидозе, раке легкого, острых гинекологических заболеваниях. Вместе с тем, тест может быть ложноположительным при других непанкреатических заболеваниях.

Липаза.

Референтные величины активности липазы в сыворотке: 0–190 Ед/л. Определение активности липазы в крови служит наиболее информативным критерием диагностики острого панкреатита. В отличие от α -амилазы, активность липазы не повышается при паротите, внематочной беременности, аппендиците. Содержание липазы увеличивается и снижается параллельно повышению и снижению активности амилазы, но нормализация ее уровня происходит позже нормализации амилазы. Иногда уровень липазы в крови повышается раньше, чем увеличивается активность амилазы, и остается повышенным длительное время.

При остром панкреатите активность липазы в крови увеличивается в течение нескольких часов после острого приступа, достигая максимума через 12–24 ч (увеличивается до 200 раз), и остается повышенной в течение 10–12 дней. Прогноз заболевания плохой, если уровень липазы в крови повышается в 10 и более раз и не снижается до 3-кратного превышения нормы в течение ближайших нескольких дней. Диагностическая чувствительность липазы в сыворотке крови для острого панкреатита составляет 86%, специфичность – 99%. Одновременное определение уровня α -амилазы (кровь и моча) и липазы – основа диагностики острого панкреатита. Повышение обоих или одного из ферментов выявляется у 98% больных с острым панкреатитом. При 3-кратном повышении активности липазы в сыворотке крови диагностическая чувствительность теста в отношении острого панкреатита составляет 100%, специфичность – 99%, в то время как аналогичные изменения активности амилазы имеют чувствительность 72%, специфичность – 99%.

Активность липазы сыворотки крови обладает высокой чувствительностью в отношении диагностики острого алкогольного панкреатита, в то время как для пациентов с закупоркой желчевыводящих путей, большого дуоденального сосочка и панкреатических протоков характерен высокий уровень амилазы. В связи с этим для установления этиологии острого панкреатита иногда определяют липазо-амилазовый коэффициент: отноше-

ние активности липазы к активности амилазы в сыворотке крови. Величина липазо-амилазового коэффициента выше 2,0 позволяет диагностировать острый алкогольный панкреатит (чувствительность – 91%, специфичность – 76%). Только у пациентов с острым алкогольным панкреатитом коэффициент может быть выше 5,0.

Повышение активности липазы в крови может иметь место при инфаркте кишки, перитоните, желчной колике. Отмечено повышение активности липазы в крови при разрушении жировой ткани – костных переломах, ранениях мягких тканей, после операций, при раке молочной железы.

Креатинкиназа (КК) общая.

Референтные величины активности общей КК в сыворотке: мужчины – 39–308 Ед/л, женщины – 26–192 Ед/л.

Наибольшее диагностическое значение имеют следующие изоферменты КК: КК-ММ (мышечный), КК-МВ (сердечный), КК-ВВ (мозговой). Повышение активности КК в сыворотке крови наблюдается из-за выхода фермента из клеток при их повреждении.

Определение активности КК используют для выявления и мониторинга цитолитического синдрома при заболеваниях миокарда и скелетной мускулатуры. При ИМ поступление КК из сердечной мышцы в сыворотку опережает другие ферменты, поэтому определение активности КК широко использовалось для ранней диагностики ИМ. Увеличение активности КК находят у 95 – 99% пациентов с ИМ. КК повышается уже через 2–4 ч после острого приступа, достигая максимума через 24–36 ч, и превышает нормальные величины в 5–20 раз. Следует подчеркнуть, что уровень КК сравнительно быстро возвращается к норме (на 3-й–6-й день). Поэтому в случаях, когда определение КК не было выполнено в этот период после развития инфаркта, трудно рассчитывать на помощь данного показателя в диагностике. В то же время именно быстрота динамики КК делает определение этого фермента особенно ценным для распознавания повторных инфарктов, которые, не давая четких электрокардиографических изменений, могут вызывать повторный подъем активности КК (для выявления их рекомендуется проведение повторных регулярных исследований). Исследование активности КК существенно важно при атипичном течении ИМ и отсутствии характерных электрокардиографических изменений, что может наблюдаться при наличии блокады пучка Гиса, аритмиях, после терапии дигиталисом и в тех случаях, когда у больного уже был инфаркт.

Изменение активности ферментов при остром ИМ.

Фермент	Начало увеличения активности, часы	Максимум увеличения активности, часы	Возвращение к норме, сутки	Кратность увеличения, раз
АСТ	4-6	24-48	4-7	2-20
КК	2-4	24-36	3-6	3-30
ЛДГ	8-10	48-72	8-9	2-4

МВ-фракция креатинкиназы.

Референтные величины активности МВ-фракции КК в сыворотке составляют 6% от общей активности КК или 0–25 Ед/л.

Повышение активности КК-МВ более специфично для ИМ. При ИМ КК-МВ составляет более 6% общей КК, увеличение наблюдается уже после острого приступа, максимум достигается через 12–24 ч, на 3-й сутки активность КК-МВ возвращается к нормальным значениям при неосложненном течении ИМ. При расширении зоны инфаркта активность КК-МВ повышена дольше, что позволяет диагностировать инфаркт пролонгированного и рецидивирующего течения. Максимум активности КК-МВ часто достигается раньше максимума активности общей КК. Величина повышения КК и КК-МВ соответствует величине пораженной зоны миокарда. Если в первые часы ИМ больному начали проводить тромболитическую терапию, то пик активности КК и КК-МВ может появиться раньше, чем обычно, что объясняется вымыванием фермента из пораженной зоны (результат реперфузии – восстановления проходимости тромбированной коронарной артерии). Активность КК-МВ при ИМ колеблется от 6 до 25%.

Различные опухоли могут продуцировать КК-МВ, на долю которой приходится до 60% и более общей активности КК. В этой связи, если КК-МВ составляет более 25% общей КК, необходимо думать о злокачественном новообразовании как причине повышения активности фермента. Присутствие в крови ВВ-фракции может симулировать увеличение МВ-фракции, вплоть до превышения уровня МВ-фракции над общей КК. ККВВ появляется при нарушении гематоэнцефалического барьера (после операций на мозге или при травме мозга). ВВ-фракция также возникает при серьезных повреждениях кишечника и после родов (при кесаревом сечении).

Повышение фракции КК-МВ в отдельных случаях наблюдается при миокардитах и миокардиодистрофиях различного течения (наиболее часто при миодистрофии Дюшена), однако КК-МВ составляет менее 3% общей КК. При остром миокардите КК и КК-МВ могут быть нормальными или сильно увеличенными, похожими на ИМ, в зависимости от характера повреждения миокарда.

Повреждение скелетной мускулатуры сопровождается значительным увеличением ММ-фракции, которая может симулировать повышение МВфракции. При рабдомиолизе диагностическая чувствительность исследования активности КК (повышается в 5 раз и более) выше, чем АСТ и ЛДГ.

Заболевания и состояния, сопровождающиеся повышением уровня активности КК и КК-МВ.

1. Физический стресс и травмы мышц:

- увеличение мышечной массы в результате физических упражнений;
- физический стресс (перегрузка);
- хирургические вмешательства, прямая травма, внутримышечные инъекции;

- острый психоз, острое повреждение мозга, кома (некроз мышц при пролежнях);

- спазмы (эпилепсия, тетанус), роды;

- сильные ожоги; поражения электрическим током.

2. Дегенеративные и воспалительные повреждения:

- мышечная дистрофия;

- миозит (коллагенозы, вирусные инфекции, трихенелез);

- миокардит.

3. Токсические поражения мышц:

- острое алкогольное отравление, белая горячка;

- экзогенная интоксикация (бромиды, барбитураты, угарный газ);

- тетания;

- медикаменты (клофибрат, бронхолитики);

- токсический рабдомиолиз (героин, амфетамины);

- злокачественная гипертермия.

4. Метаболические поражения мышц:

- гипотиреоз;

- метаболический рабдомиолиз (гипокалиемия, гипофосфатемия, гиперосмолярные состояния);

- гликогеноз (тип V).

5. Гипоксические поражения мышц: шок, периферическая эмболия, гипотермия.

Очень высокая активность КК часто наблюдается при спазмах, гипоксии скелетных мышц, вызванной шоком, токсическим повреждением и очень

редко генетическими нарушениями метаболизма гликогена или липидов.

Кислая фосфатаза.

Референтные величины активности кислой фосфатазы в сыворотке:
0–6 Ед/л.

У мужчин половину содержащейся в сыворотке кислой фосфатазы вырабатывает предстательная железа, остальную часть – печень и разрушающиеся тромбоциты и эритроциты. У женщин фермент вырабатывается печенью, эритроцитами и тромбоцитами.

Определение активности кислой фосфатазы в клинической практике проводится для диагностики рака предстательной железы. Активность кислой фосфатазы повышается при раке предстательной железы далеко не всегда: только у 20–25% пациентов без метастазов и у 60% больных с метастазами. Степень повышения активности кислой фосфатазы особенно велика у пациентов при наличии костных метастазов рака предстательной железы. Определение активности кислой фосфатазы может быть использовано для дифференциальной диагностики метастазов рака предстательной железы

в кости и заболеваний костной ткани, в частности остеодистрофий, при которых обычно повышена активность ЩФ, в то время как при метастазах рака предстательной железы в кости повышается активность в крови как щелочной, так и кислой фосфатазы.

Следует иметь в виду, что массаж предстательной железы, катетеризация, цистоскопия, ректальные исследования повышают активность кислой фосфатазы, поэтому кровь на исследования надо брать не раньше чем через 48 ч после перечисленных процедур.

Повышение активности кислой фосфатазы может иметь место при повышенном разрушении тромбоцитов (тромбоцитопения, тромбоэмболии и др.), гемолитической болезни, прогрессирующей болезни Педжета, метастатических поражениях костей, миеломной болезни (не всегда), болезни Гоше и Нимана-Пика, через 1–2 дня после операции на предстательной железе или после биопсии.

Простатическая фракция кислой фосфатазы.

Референтные величины активности простатической фракции кислой фосфатазы в сыворотке равны 0,05–2,6 Ед/л.

Определение простатической фракции кислой фосфатазы – более специфический тест для диагностики рака предстательной железы, чем определение общей активности кислой фосфатазы. Повышение ее активности характерно для рака предстательной железы, особенно с метастазами, наблюдается также при инфаркте простаты после катетеризации мочевого пузыря. При болезни Гоше и Нимана-Пика повышения активности фермента не наблюдается, если отсутствует кистозное изменение предстательной железы. По своей чувствительности и специфичности для скрининга рака предстательной железы общая и простатическая фракция кислой фосфатазы уступают исследованию простатического специфического антигена (ПСА), поэтому не используются широко в клинической практике.

Субстраты и продукты биохимических реакций.

Исследование показателей пигментного обмена.

В клинических лабораториях измеряют концентрацию общего и прямого билирубина, по разнице рассчитывают концентрацию непрямого билирубина. Если общий билирубин не превышает референтных пределов, допустимо не проводить измерение прямого билирубина.

Общий билирубин.

Референтные величины содержания общего билирубина в сыворотке 1,7–21,0 мкмоль/л.

При гипербилирубинемии более 27–34 мкмоль/л развивается синдром желтухи (легкая форма – до 85 мкмоль/л, среднетяжелая – 86–169 мкмоль/л,

тяжелая форма – свыше 170 мкмоль/л), обусловленный накоплением билирубина в тканях организма с появлением желтой окраски кожи и конъюнктивы.

Это состояние может быть следствием трех основных групп заболеваний:

- болезней, связанных с повышенным образованием билирубина (в большем количестве, чем то, которое нормальная печень может экскретировать), при этом печень и желчные пути обычно не вовлечены в патологический процесс; наиболее частое заболевание этой группы – гемолитическая анемия, для которой характерно усиленное разрушение эритроцитов;
- болезней, связанных с повреждением клеток печени или врожденными ферментопатиями, а следовательно, с нарушением их способности конъюгировать билирубин (болезни печени);
- болезней, связанных с нарушением оттока желчи (следовательно, снижением экскреции билирубина), вследствие закупорки желчевыводящих протоков печени (болезни желчевыводящих путей).

В зависимости от того, какой тип билирубина присутствует в сыворотке крови – неконъюгированный (непрямой) или конъюгированный (прямой), гипербилирубинемия классифицируется как неконъюгированная и конъюгированная соответственно. В клинической практике наиболее широкое распространение получило деление желтух на гемолитические, паренхиматозные и обтурационные. Гемолитические и паренхиматозные желтухи – это неконъюгированная, а обтурационные – конъюгированная гипербилирубинемия.

При гемолитической желтухе гипербилирубинемия сочетается с повышенным выделением уробилиногена с мочой и калом, так как он образуется в кишечнике в большом количестве. Кроме гемолитических анемий гемолиз усилен при В₁₂-дефицитной анемии, малярии, массивных кровоизлияниях в ткани, инфаркте легкого, при синдроме разможнения мягких тканей (неконъюгированная гипербилирубинемия). Частой формой гемолитической желтухи и гипербилирубинемии является физиологическая желтуха у новорожденных (встречается у 60% младенцев в первые недели жизни).

Гемолитическими по своему происхождению могут быть желтухи, вызванные действием лекарственных средств, усиливающих распад (гемолиз) эритроцитов (например, ацетилсалициловой кислоты, тетрациклина и др.).

При паренхиматозной желтухе наступает деструкция гепатоцитов, нарушается экскреция прямого (конъюгированного) билирубина в желчные капилляры. Прямой билирубин попадает непосредственно в кровь, где его содержание значительно увеличивается. Кроме того, снижается способность печеночных клеток синтезировать билирубин-глюкурониды; вследствие чего количество непрямого билирубина также увеличивается. Повышение концентрации в крови прямого билирубина приводит к его появлению в моче вследствие фильтрации через мембрану почечных клубочков. Непрямой билирубин, несмотря на увеличение концентрации в крови, в мочу не поступает. Поражение гепатоцитов сопровождается нарушением их способности разрушать всосавшийся из тонкого кишечника мезобилиноген (уробилино-

ген). Повышение содержания уробилиногена в моче может наблюдаться еще в дожелтушный период. В разгар вирусного гепатита возможно снижение и даже исчезновение уробилиногена в моче. Это объясняется тем, что увеличивающийся застой желчи в печеночных клетках ведет к уменьшению выделения билирубина и, следовательно, к уменьшению образования уробилиногена в желчевыводящих путях. В дальнейшем, когда функция печеночных клеток начинает восстанавливаться, желчь выделяется в большом количестве, и уробилиноген снова появляется в больших количествах, что в данной ситуации расценивается как благоприятный прогностический признак. Стеркобилиноген попадает в большой круг кровообращения и выделяется почками с мочой в виде уробилина.

Основные причины паренхиматозных желтух – острые и хронические вирусные гепатиты, цирроз печени, токсические вещества (хлороформ, четыреххлористый углерод, ацетаминофен), массивное распространение в печени раковой опухоли, альвеолярный эхинококк и множественные абсцессы печени. При вирусных гепатитах степень билирубинемии коррелирует с тяжестью заболевания. Так, при легкой форме течения вирусного гепатита В содержание билирубина в сыворотке крови не выше 90 мкмоль/л, при среднетяжелой – в пределах 90–170 мкмоль/л, при тяжелой – свыше 170 мкмоль/л.

При развитии печеночной комы уровень билирубина может повышаться до 300 мкмоль/л и выше.

К различным типам гипербилирубинемии (паренхиматозная желтуха) относятся также некоторые редко встречающиеся синдромы – Криглера-Найяра, Жильбера, Дабина-Джонсона, Ротора.

При обтурационной желтухе (конъюгированная гипербилирубинемия) нарушается желчевыведение, вследствие закупорки общего желчного протока камнем или опухолью, как осложнение гепатита, при первичном циррозе печени, при приеме лекарств, вызывающих холестаз. Нарастание давления в желчных капиллярах приводит к увеличению проницаемости или нарушению их целостности и попаданию билирубина в кровь. Механическая желтуха обычно приводит к наиболее высокому уровню прямого (конъюгированного) билирубина в крови, величина которого иногда достигает 800–1000 мкмоль/л. В кале резко снижается содержание стеркобилиногена, полная обтурация желчного протока сопровождается полным отсутствием желчных пигментов в кале. Если концентрация конъюгированного (прямого) билирубина превышает почечный порог (13–30 мкмоль/л), то билирубин выделяется с мочой.

В клинической практике определение билирубина в сыворотке крови применяется для решения следующих задач:

- определение увеличенного содержания билирубина в крови в тех случаях, когда при осмотре больного желтуха не выявляется или наличие ее вызывает сомнение. Желтушная окраска кожи наблюдается при уровне содержания билирубина в крови, превышающем 30–35 мкмоль/л.

- объективная оценка степени билирубинемии;
- дифференциальная диагностика различных видов желтух;
- оценка течения заболевания путем повторных исследований.

Уменьшение содержания билирубина диагностического значения не имеет.

Прямой билирубин.

Референтные величины содержания прямого билирубина в сыворотке 0,0–5,0 мкмоль/л.

Исследование обычно проводится с целью дифференциальной диагностики форм желтух.

При паренхиматозной желтухе наступает деструкция печеночных клеток, нарушается экскреция прямого билирубина в желчные капилляры, и он попадает непосредственно в кровь, где содержание его значительно увеличивается. Кроме того, снижается способность печеночных клеток синтезировать билирубин-глюкурониды; вследствие этого количество непрямого билирубина в крови также увеличивается.

При механической желтухе нарушено желчевыделение, что приводит к резкому увеличению содержания прямого билирубина в крови. Несколько повышается в крови и концентрация непрямого билирубина. При гемолитической желтухе содержание прямого билирубина в крови не изменяется.

Непрямой билирубин.

Референтные величины содержания непрямого билирубина в сыворотке 3,4–13,7 мкмоль/л.

Исследование непрямого билирубина играет важнейшую роль в диагностике гемолитических анемий. В норме в крови 75% общего билирубина приходится на долю непрямого (свободного) билирубина и 25% на долю прямого (связанного) билирубина.

Непрямой билирубин повышается при гемолитических анемиях, пернициозной анемии, при желтухе новорожденных, синдроме Жильбера, синдроме Криглера–Найяра, синдроме Ротора. Повышение непрямого билирубина при гемолитической анемии обусловлено интенсивным образованием его вследствие гемолиза эритроцитов, и печень оказывается неспособной к образованию столь большого количества билирубин-глюкуронидов. При перечисленных синдромах нарушена конъюгация непрямого билирубина с глюкуроновой кислотой.

Ниже приведена патогенетическая классификация желтухи, которая позволяет легко установить этиологию гипербилирубинемии.

Преимущественно непрямая гипербилирубинемия

1. Избыточное образование билирубина:

- гемолиз (внутри- и внесосудистый);
- неэффективный эритропоэз.

2. Сниженный захват билирубина в печени:

- длительное голодание;
- сепсис.

3. Нарушение конъюгации билирубина:

3.1 Наследственная недостаточность глюкуронилтрансферазы:

- синдром Жильбера (легкая недостаточность глюкуронилтрансферазы);
- синдром Криглера-Найяра II типа (умеренная недостаточность глюкуронилтрансферазы);
- синдром Криглера-Найяра I типа (отсутствие активности глюкуронилтрансферазы).

3.2 Физиологическая желтуха новорожденных (преходящая недостаточность глюкуронилтрансферазы; повышенное всасывание непрямого билирубина).

3.3 Приобретенная недостаточность глюкуронилтрансферазы:

- прием некоторых препаратов (например, хлорамфеникола).
- желтуха от материнского молока (угнетение активности глюкуронилтрансферазы прегнандиолом и жирными кислотами, содержащимися в грудном молоке).
- поражение паренхимы печени (гепатиты, цирроз).

Преимущественно прямая гипербилирубинемия.

1. Нарушение экскреции билирубина в желчь.

1.1 Наследственные нарушения:

- синдром Дабина-Джонсона.
- синдром Ротора.
- доброкачественный рецидивирующий внутрипеченочный холестаз;
- холестаз беременных.

1.2 Приобретенные нарушения:

- поражение паренхимы печени (например, при вирусном или лекарственном гепатите, циррозе печени);
- прием некоторых препаратов (пероральные контрацептивы, андрогены, хлорпромазин);
- алкогольное поражение печени;
- сепсис;
- послеоперационный период;
- парентеральное питание;
- билиарный цирроз печени (первичный или вторичный).

2. Обструкция внепеченых желчных проходов:

1.1. Обтурация:

- холедохолитиаз;
- пороки развития желчных путей (стриктуры, атрезия, кисты желчных протоков);

- гельминтозы (клонорхоз и другие печеночные трематодозы, аскаридоз);
- злокачественные новообразования (холангиокарцинома, рак фатерова соска);
- гемобилия (травма, опухоли);
- первичный склерозирующий холангит.

2.2 СДавление:

- злокачественные новообразования (рак поджелудочной железы, лимфомы, лимфогранулематоз, метастазы в лимфатические узлы ворот печени);
- воспаление (панкреатит).

Исследование показателей азотистого обмена.

Для детального анализа состояния азотистого обмена в клинической практике целесообразно определять в крови концентрацию основных составляющих веществ остаточного азота (мочевина, азот аминокислот, мочевая кислота, креатинин, аммиак). При этом на долю мочевины приходится около 50% всего небелкового азота, поэтому уровень мочевины крови в большинстве случаев наиболее адекватно отражает состояние всего азотистого обмена в организме человека.

Мочевина.

Референтные пределы мочевины в сыворотке крови 2–8 ммоль/л. Определение уровня мочевины используется для оценки и мониторинга выделительной функции почек, а также для оценки мочевинообразующей функции печени при печеночной недостаточности различной этиологии.

Причины снижения концентрации мочевины в сыворотке крови:

- диета с низким содержанием белков;
- беременность – приводит к увеличению скорости клубочковой фильтрации (СКФ) и, как следствие, к повышению скорости выведения мочевины;
- болезни печени – основная причина патологического снижения уровня мочевины в крови.

Причины повышения концентрации мочевины в сыворотке крови:

1. внепочечные – связаны с повышенным образованием мочевины в организме при нормальной выделительной функции почек – продукционная уремия:

- потребление очень большого количества белковой пищи;
- длительное голодание, которое сопровождается усилением катаболизма белков собственных тканей; возросший распад белков приводит к повышению синтеза мочевины; данная ситуация может также наблюдаться при

различных воспалительных процессах, у тяжелых больных, находящихся в отделении реанимации;

- обезвоживание в результате рвоты, поноса; при дегидратации количество реабсорбированной из почечных канальцев в кровь мочевины (после клубочковой фильтрации) увеличивается;
- желудочно-кишечные кровотечения из язв;
- варикозно-расширенных вен пищевода, опухолей; кровь попадает в кишечник, в результате всасывания белков (кровь содержит большое количество белка) увеличивается и, следовательно, вызывает активацию синтеза мочевины.

Однако при этих состояниях избыток мочевины быстро удаляется из организма почками и ее концентрация в крови становится нормальной. Повышение уровня мочевины в крови наиболее часто возникает в результате нарушения выделительной функции почек. Уровень мочевины в крови возрастает, если СКФ снижается.

В соответствии с приведенными выше факторами, способствующими снижению СКФ, все причины, определяющие развитие почечной недостаточности, можно разделить на 3 группы:

- преренальные (уменьшение притока крови к почкам);
- ренальные (повреждение собственно почечного фильтра);
- постренальные (затруднение оттока мочи).

Патология, лежащая в основе преренальных механизмов нарушения функции почек, приводит к повышению уровня мочевины в крови и характеризуется низкой СКФ вследствие уменьшения тока крови через почечные клубочки. При этом структура нефрона остается в норме, но нарушается его функция. Причинами преренальной дисфункции почек являются:

- дегидратация и снижение ОЦК: шок, сильное кровотечение, тяжелая диарея, обильная рвота;
- острая или хроническая сердечно-сосудистая недостаточность; снижение АД или недостаточность сократительной функции миокарда.

Ренальная патология сопровождается низкой СКФ вследствие «блокирования» клубочкового фильтра. Структура нефронов нарушена, и соответственно нарушена их функция. Причинами нарушения функции почек могут быть следующие формы патологии:

- острые и хронические гломерулонефриты (ГН); при остром ГН повышение уровня мочевины наблюдается редко и кратковременно; при хроническом ГН уровень мочевины может колебаться, повышаясь при обострении процесса и снижаясь при его затихании;
- хронические пиелонефриты; повышение уровня мочевины зависит от выраженности нефросклероза и воспалительного процесса в почках;
- нефросклерозы, вызванные отравлениями токсическими веществами;
- синдром длительного СДавливания (размозжения); уровень мочевины в крови оказывается очень высоким, что объясняется сочетанием задержки выведения мочевины с повышенным распадом белков;

- диабетическая нефропатия;
- гипертоническая болезнь со злокачественным течением;
- подагра;
- гидронефроз, выраженный поликистоз, туберкулез почки;
- амилоидный или амилоидно-липидный нефроз; повышение мочевины в крови наблюдается только на поздних стадиях заболевания.

Патология, лежащая в основе постренальных механизмов нарушения функции почек, проявляется низкой СКФ вследствие блокирования мочевыводящих путей. Она возникает при задержке выделения мочи из-за какого-либо препятствия в мочевыводящих путях (камень, опухоль, в частности, аденома или рак предстательной железы).

Значительное и продолжительное повышение уровня мочевины в крови ($>10,0$ ммоль/л) всегда свидетельствует о поражении почек, более умеренное повышение этого показателя (от 6,5 до 10,0 ммоль/л) является признаком другой патологии.

Необходимо помнить, что нормальная концентрация мочевины в крови не исключает ранней стадии почечного заболевания. Увеличение концентрации мочевины в крови отмечается только при значительном снижении функции почек. Концентрация мочевины в крови не выходит за пределы нормы до тех пор, пока СКФ не становится ниже 40 мл/мин, т.е. менее 50% от нормального значения. При развитии острого повреждения почек концентрация мочевины крови нередко достигает очень высоких величин – 133,2–149,8 ммоль/л.

Креатинин крови и мочи.

Содержание креатинина в крови здоровых людей – величина довольно постоянная и мало зависящая от питания и других внепочечных факторов.

Референтные величины содержания креатинина в сыворотке.

Возраст	Содержание креатинина в сыворотке	
	мкмоль/л	мг/дл
Новорожденные	27-88	0,3-1,0
Дети до 1-го года	18-35	0,2-0,4
Дети от 1-го года до 12 лет	27-62	0,3-0,7
Подростки	44-88	0,5-1,0
Взрослые:	женщины	0,7-1,4
	мужчины	0,5-1,1

Снижение уровня креатинина в крови не имеет, за редким исключением, существенного значения. Его уровень может снижаться при беременности в результате увеличения экскреции креатинина почечными канальцами. При любом заболевании, сопровождаемом существенным снижением мы-

шечной массы (например, мышечная дистрофия), может отмечаться патологическое снижение уровня креатинина в сыворотке крови.

Причины повышения уровня креатинина в крови.

Уровень креатинина в крови, в отличие от мочевины, не повышается при сепсисе, травмах, лихорадочных состояниях, не зависит от степени гидратации организма, повышенного потребления белка.

Определение креатинина широко используется в диагностике и мониторинге заболеваний почек. Креатинин в меньшей степени, чем мочевина, зависит от уровня катаболизма, не реабсорбируется в почках, поэтому в большей мере отражает степень нарушения фильтрационной и выделительной функций почек. В большинстве случаев повышение уровня креатинина в крови – это признак нарушения функций почек.

Гипертиреоз, акромегалия, гигантизм, сахарный диабет, кишечная непроходимость, мышечная дистрофия, обширные ожоги, также могут сопровождаться повышением уровня креатинина в крови.

Определение концентрации креатинина в крови и моче значительно расширяет диагностические возможности оценки функционального состояния почек.

Референтные величины содержания креатинина в моче.

Возраст	Содержание креатинина в сыворотке	
	мг/(кг в сутки)	мкмоль/(кг в сутки)
Дети до 1-го года	8-20	71-177
Дети от 1-го года до 12 лет	8-22	71-194
Подростки	8-30	71-265
Взрослые: женщины и мужчины	11-20	97-177
	14-26	124-230
Взрослые: мужчины и женщины	800-2000	7,1-17,7
	600-1800	5,3-15,9

В клинической практике важное значение имеет определение отношения креатинина в моче (Км) к креатинину сыворотки крови (Ккр).

Клиренс эндогенного креатинина (проба Реберга-Тареева).

Концентрация мочевины и креатинина в сыворотке крови отражает СКФ и влияет на нее, однако не позволяет прямо измерить СКФ. Это обусловлено тем, что уровни этих метаболитов в крови не увеличиваются существенно до тех пор, пока почки не теряют свою функцию (образовывать первичную мочу) на 50%. Поэтому концентрации мочевины и креатинина в сыворотке крови являются слабыми индикаторами незначительных нарушений функции почек на ранних стадиях почечных заболеваний. В связи с этим для повышения информативности оценки СКФ в клинической практике определяют клиренс креатинина (проба Реберга–Тареева). Определение клиренса креатинина также имеет некоторые недостатки, тем не менее это довольно адекватный и доступный метод прямого измерения СКФ и следовательно бо-

лее чувствительный и специфичный способ диагностики почечной недостаточности на ранних ее стадиях, чем оценка содержания мочевины и креатинина в крови. Клиренс креатинина – это объем плазмы крови, который очищается от креатинина за 1 минуту при прохождении через почки. Чем эффективнее работают почки по очищению крови от креатинина и выведению его с мочой, тем выше клиренс.

В норме клиренс креатинина, или СКФ, у здоровых людей колеблется от 80 до 160 мл/мин, составляя 120 ± 25 мл/мин у мужчин и 95 ± 20 мл/мин у женщин. При заболеваниях почек величину клиренса креатинина (СКФ) принято считать достаточно корректным критерием оценки массы действующих нефронов, параметра важного, в том числе с позиций клинической фармакологии, поскольку фармакокинетика многих медикаментов зависит от величины этого показателя.

Общепринятой методикой оценки СКФ служит исследование клиренса креатинина (проба Реберга–Тареева). Креатинин, будучи низкомолекулярным веществом, беспрепятственно проходит из крови в состав первичной мочи в процессе клубочковой фильтрации безбелковой плазмы крови. Таким образом, концентрация креатинина в фильтрате, т.е. первичной моче, соответствует его плазматической концентрации – концентрации креатинина в исследуемой сыворотке крови (Ккр). Следовательно, количество креатинина (ммоль/мин), поступающее в фильтрат, соответствует произведению концентрации креатинина в фильтрате на минутный объем фильтрата:

$$\text{Ккр} \times V.$$

Порядок проведения пробы Реберга–Тареева.

Специальной подготовки пациента не требуется. Пациент в течение суток собирает мочу (всю выделенную мочу за 24 ч). Утром он идет в туалет. Обязательно фиксируется это время (нулевое время). Первую утреннюю порцию пациент не собирает (выпускает в унитаз), а собирает все последующие порции точно до этого же времени следующего дня (за сутки в емкость 3 л). По окончании сбора мочу перемешивают, измеряют объем и указывают его в направлении; около 50 мл мочи отливают в отдельную посуду и доставляют в лабораторию. Утром дня окончания сбора мочи у пациента берется венозная кровь для определения концентрации креатинина.

Для получения точных результатов чрезвычайно важно полностью собрать мочу за 24 ч и указать в направлении на исследование, что это суточная моча. Неправильный сбор мочи приведет к ложным результатам.

В лаборатории определяют концентрацию Ккр и Км пациента, а также рассчитывают минутный диурез – Д, исходя из суточного объема мочи, собранного пациентом. Например, за сутки пациент выделил 1350 мл мочи; это количество в мл необходимо разделить на 24 ч, переведенные в минуты – 1440 мин; следовательно, в данном примере минутный диурез составил 0,94 мл/мин. *Клиренс креатинина рассчитывают по следующей формуле:*

$$\text{клиренс креатинина} = \frac{K_m}{K_{кр}} \times D$$

Проба Реберга–Тареева может выполняться и за более короткий отрезок времени (например, за 1–2 ч). Однако, проводя исследование клиренса креатинина в более короткий отрезок времени, необходимо учитывать возможность значительной ошибки при сборе небольшого объема мочи из-за неучета «остаточной мочи» в мочевом пузыре, низкого диуреза и аналитической вариации метода определения концентрации креатинина. Для повышения адекватности определения клиренса креатинина желательно добиваться диуреза у обследуемого пациента в объеме не менее 1,5 мл/мин, что обеспечивается дополнительной небольшой водной нагрузкой в объеме 1–2 стаканов воды.

Порядок проведения пробы Реберга–Тареева за короткий промежуток времени. Больной утром мочится, выпивает 200 мл воды, и затем натошак в состоянии полного покоя собирает мочу за точно определенное непродолжительное время (2 ч). Посередине этого отрезка времени берут кровь из вены. При направлении проб в лабораторию для получения правильных результатов определения СКФ в направлении на исследование очень важно указать за какой отрезок времени собрана моча.

В норме величины клубочковой фильтрации наиболее низки утром, повышаются до максимальных величин в дневные часы и вновь снижаются вечером. У здоровых людей снижение СКФ происходит под влиянием тяжелой физической нагрузки и отрицательных эмоций; возрастает после питья жидкости и приема высококалорийной пищи.

Так как определение клиренса креатинина является прямым методом измерения СКФ, его величина снижается при уменьшении СКФ. Уменьшение величины клиренса креатинина по сравнению с нормой свидетельствует о повреждении почек. По уровню снижения клиренса креатинина можно судить о тяжести их поражения, но не о диагнозе, так как СКФ уменьшается при заболеваниях почек разной этиологии. Этот показатель – более чувствительный индикатор ранних стадий почечной дисфункции.

На СКФ оказывают влияние экстраренальные факторы. Так, СКФ снижается при сердечной и сосудистой недостаточности, обильном поносе и рвоте, гипотиреозе, механическом затруднении оттока мочи (опухоли предстательной железы), при поражении печени. В начальной стадии острого ГН снижение СКФ происходит не только вследствие нарушения проходимости клубочковой мембраны, но и в результате системных расстройств гемодинамики. При хроническом ГН снижение СКФ может быть обусловлено также азотемической рвотой и поносом.

Ряд лекарственных препаратов (например, циметидин, триметоприм) снижает тубулярную секрецию креатинина, способствуя повышению его концентрации в сыворотке крови. Антибиотики группы цефалоспоринов,

вследствие интерференции, приводят к ложноповышенному уровню креатинина в сыворотке.

Повышение СКФ наблюдается при хроническом ГН с нефротическим синдромом, в ранней стадии гипертонической болезни; высокие цифры СКФ отмечаются и при нефрозах.

Наряду с определением СКФ в пробе Реберга-Тареева также оценивают состояние канальцевой реабсорбции, которая рассчитывается по формуле:

$$КР = \frac{СКФ - Д}{СКФ} \times 100$$

В норме канальцевая реабсорбция составляет от 95 до 99% клубочкового фильтрата.

Канальцевая реабсорбция может значительно меняться в зависимости от физиологических факторов, снижаясь до 90% при водной нагрузке. Выраженное снижение реабсорбции происходит при форсированном диурезе, вызванном мочегонными средствами. Наибольшее снижение канальцевой реабсорбции наблюдается у больных несахарным диабетом.

При различных заболеваниях почек периоды (время) возникновения нарушения (снижения) СКФ и канальцевой реабсорбции могут существенно отличаться, что используется для оценки динамики заболеваний.

При острых и хронических ГН, нефросклерозах, когда первично поражается фильтр почечного клубочка, канальцевая реабсорбция снижается позже, чем СКФ, т.е. СКФ, как правило, уменьшается намного раньше, чем происходит снижение концентрационной функции почек и накопление в крови мочевины и креатинина. При первичных клубочковых поражениях недостаточность концентрационной функции почек выявляется при резком снижении СКФ (приблизительно на 40-50%).

При пиелонефритах канальцевая реабсорбция снижается раньше уменьшения СКФ. Это обусловлено тем, что при хронических пиелонефритах первоначально поражается преимущественно дистальный отдел канальцев нефрона, а только затем гломерулярный клубочек, поэтому СКФ уменьшается позже, чем канальцевая реабсорбция.

Мочевая кислота.

Референтные значения мочевой кислоты в сыворотке:

до 14 лет: 120–320 мкмоль/л;

старше 14 лет, мужчины: 210–420 мкмоль/л,

женщины: 150–350 мкмоль/л.

Повышение уровня мочевой кислоты в крови (гиперурикемия) может возникнуть вследствие избыточной продукции мочевой кислоты, нарушения ее экскреции или сочетания этих факторов.

Основные причины, которые приводят к увеличению концентрации мочевой кислоты в плазме крови.

Увеличение образования мочевой кислоты	Снижение почечной экскреции мочевой кислоты
Первичное	Первичное
Увеличение синтеза пуринов: идиопатическое (неустановленное) наследственное нарушение метаболизма	Идиопатическое
Вторичное	Вторичное
Избыточное поступление пуринов с пищей. Нарушение метаболизма АТФ: • алкоголь; • гипоксия тканей. Увеличение обмена нуклеиновых кислот: • злокачественные новообразования; • псориаз; • цитотоксические препараты; • ионизирующее излучение; лучевая терапия	Хроническая болезнь почек. Увеличение почечной реабсорбции/уменьшение секреции: • тиазидные диуретики; • салицилаты (низкие дозы); • свинец; • органические кислоты (например, молочная кислота, в том числе вследствие приема алкоголя)

Определение содержания в крови мочевой кислоты имеет особенно большое значение в диагностике бессимптомной гиперурикемии (мочевая кислота в крови у мужчин – выше 480 мкмоль/л, у женщин – выше 350 мкмоль/л) и скрытого развития подагрической почки (у 5% мужчин). У 5–10% больных с бессимптомной гиперурикемией возникает острый подагрический артрит. Примерно у 25% пациентов с симптомами подагры обнаруживают камни мочевой кислоты и 25% пациентов с камнями мочевой кислоты страдают подагрой. Гиперурикемия у пациентов с подагрой непостоянна, может носить волнообразный характер. Периодически содержание мочевой кислоты может снижаться до нормальных цифр, однако часто наблюдается повышение в 3–4 раза по сравнению с нормой.

Во время острого приступа подагры у 39–42% пациентов уровень мочевой кислоты в сыворотке крови снижается до нормальных значений. Поэтому при нормальных значениях мочевой кислоты таким пациентам необходимо повторить анализы крови через 3–5 суток после купирования приступа для получения объективных величин концентрации этой кислоты.

Для получения точных данных о содержании мочевой кислоты в крови, наиболее адекватно отражающих уровень эндогенного образования мочевой кислоты, необходимо в течение 3 дней перед исследованием назначать пациентам малопуриновую диету.

Снижение уровня мочевой кислоты в крови встречается редко, в основном при врожденных нарушениях метаболизма (генетические дефекты синтеза ферментов, участвующих в образовании мочевой кислоты) и дефектах реабсорбции мочевой кислоты в почечных канальцах. Гипоурикемия наблюдается при врожденном дефиците фермента ксантиноксидазы (катализирует превращение гипоксантина в ксантин и ксантина в мочевую кислоту), который сопровождается ксантинурией. Тяжелые заболевания печени, поражения почечных канальцев (например, синдром Фанкони), прием аллопуринола приводят к снижению уровня мочевой кислоты в крови.

Гомоцистеин.

Референтные величины содержания гомоцистеина в сыворотке составляют: у женщин – 5–12 мкмоль/л, у мужчин – 5–15 мкмоль/л.

Высокие уровни гомоцистеина служат важнейшим фактором, определяющим риск развития раннего атеросклероза и тромбоза. Гипергомоцистеинемия встречается у 13–47% больных ИБС. Поэтому в настоящее время определение гомоцистеина в сыворотке крови используется в качестве маркера прогноза исхода ИБС. Высокие уровни гомоцистеина у больных ИБС – четкие предвестники острых явлений, которые могут привести к летальному исходу. По степени выраженности гипергомоцистеинемии делят на легкую – уровень гомоцистеина – 15–25 мкмоль/л, умеренную – 25–50 мкмоль/л и тяжелую – 50–500 мкмоль/л. У больных ИБС с уровнем гомоцистеина в крови ниже 10 мкмоль/л стеноз коронарных артерий обычно менее 50%, при уровне 10–15 мкмоль/л – 80%, выше 15 мкмоль/л – 90%.

Врожденная гомоцистинурия представляет собой моногенный дефект метаболизма, обусловленный дефицитом метилентетрагидрофолатредуктазы. Пациенты с таким довольно редким заболеванием (1 на 200 000 новорожденных) обычно страдают тяжелой задержкой умственного развития, патологией скелета и ранним развитием атеросклеротической болезни. В сыворотке крови концентрация гомоцистеина очень высокая – от 50 до 500 мкмоль/л.

Гипергомоцистеинемия встречается как одно из проявлений неопластического процесса, в частности при раке молочной железы, яичников и поджелудочной железы, остром лимфобластном лейкозе. Увеличение уровня гомоцистеина в сыворотке крови может отмечаться при гипотиреозе, тяжелом течении псориаза, длительном приеме препаратов теофиллина, эстрогенсодержащих контрацептивов, цитостатиков (метотрексат) и противоэпилептических препаратов (фенитоин, карбамазепин), вследствие нарушения метаболизма и всасывания витамина В₁₂ и фолиевой кислоты.

Исследование показателей углеводного обмена.

Глюкоза крови и мочи.

Концентрация глюкозы в сыворотке крови примерно на 11–14% выше, чем в цельной крови, из-за разведения растворенной в плазме глюкозы форменными элементами крови. Концентрация глюкозы в гепаринизированной плазме на 5% ниже содержания глюкозы в сыворотке. Вследствие утилизации глюкозы в тканях цельная венозная кровь содержит меньше глюкозы, чем капиллярная кровь из пальца (натошак примерно на 0,1 ммоль/л, после приема пищи – на 15–20%, большая разница может быть у пациентов с нарушениями микроциркуляции, например при шоке).

Референтные пределы глюкозы.

Возраст	Глюкоза сыворотки крови ммоль/л	Глюкоза цельной (капиллярной) крови ммоль/л
Новорожденные	2,8-4,4	2,4-4,1
Дети	3,9-5,8	3,3-5,5
Взрослые	4,0-6,1	3,3-5,5

Определение уровня глюкозы в клинической практике используется для следующих целей:

- диагностики и мониторинга сахарного диабета, диабета беременных, нарушения толерантности к глюкозе;
- выявления и мониторинга нарушений углеводного обмена при недостаточности надпочечников, гипопфиза, заболеваниях печени, сепсисе, шоке и других критических состояниях;
- скрининг нарушений углеводного обмена в группах риска развития сахарного диабета (ожирение, возраст старше 45 лет, сахарный диабет 1-го типа в семейном анамнезе);
- дифференциальной диагностики комы (гипо- и гипергликемической).

Увеличение концентрации глюкозы (гипергликемию) вызывают:

- умеренная физическая нагрузка;
- эмоциональный стресс, боль;
- сахарный диабет;
- увеличение продукции гипергликемических гормонов (феохромоцитома, тиреотоксикоз, акромегалия, гигантизм, синдром Кушинга);
- снижение продукции инсулина при заболеваниях поджелудочной железы (острый и хронический панкреатит, опухоли поджелудочной железы);
- травма, опухоли, операционные повреждения головного мозга, кровоизлияние в мозг.

Уменьшение концентрации (гипогликемию) вызывают:

- передозировка гипогликемических препаратов, инсулина;
- повышение продукции инсулина (аденома или карцинома β -клеток островков Лангерганса – инсулинома);
- снижение продукции гипергликемических гормонов (недостаточность α -клеток островков Лангерганса, болезнь Аддисона, адреногенитальный синдром, гипопитуитаризм, гипотиреоз);
- ослабление гликогенной функции печени при циррозе, тяжелых гепатитах разной этиологии, первичном раке печени, гемохроматозе, алкогольной интоксикации;
- ферментопатии (болезнь Гирке, галактоземия, нарушенная толерантность к фруктозе);
- длительное голодание;
- синдром мальабсорбции;
- интенсивная физическая нагрузка;
- лихорадочные состояния.

Диагностические критерии сахарного диабета и других категорий гипергликемии, рекомендованные ВОЗ (1999).

Диагноз	Момент взятия пробы	Цельная кровь		Плазма венозной крови
		Венозная	Капиллярная	
Норма	Натощак	3,3 – 5,5	3,3 – 5,5	4,0 – 6,1
	Через 2 ч после нагрузки глюкозой	<6,7	<7,8	<7,8
Нарушение толерантности к глюкозе	Натощак	<6,1	<6,1	<7,0
	Через 2 ч после нагрузки глюкозой	$\geq 6,7$ и <10,0	$\geq 7,8$ и <11,1	$\geq 7,8$ и <11,1
Сахарный диабет	Натощак	$\geq 6,1$	$\geq 6,1$	$\geq 7,0$
	Через 2 ч после нагрузки глюкозой	$\geq 10,0$	$\geq 11,1$	$\geq 11,1$

Глюкоза в моче.

Референтные пределы: менее 0,08 ммоль/сутки (большинство тест-систем нечувствительны к такой концентрации и дают отрицательный результат).

Определение глюкозы в моче используется для следующих целей:

- мониторинга сахарного диабета беременных, нарушения толерантности к глюкозе;

- диагностики и мониторинга почечного диабета, патологий почек с нарушением канальцевой реабсорбции.

С мочой глюкоза в норме не выводится, поскольку после фильтрации в почечных клубочках полностью реабсорбируется в проксимальных канальцах. При гипергликемии выше 9–10 ммоль/л (почечный порог для глюкозы) развивается глюкозурия. Глюкозурия не является диагностическим критерием сахарного диабета, поскольку экскреция глюкозы с мочой зависит не только от уровня гликемии, отражающей инсулярную функцию, но и от функционирования почек – способности почечных канальцев реабсорбировать глюкозу, скорости клубочковой фильтрации. Глюкозурия на фоне нормогликемии может развиваться при некоторых заболеваниях почек из-за снижения почечного порога, а также во время нормальной беременности из-за того, что физиологическое повышение клубочковой фильтрации неадекватно абсорбционной способности канальцев. Одним из критериев компенсации сахарного диабета 2-го типа является аглюкозурия, при сахарном диабете 1-го типа допускается потеря глюкозы с мочой 20–30 г/сут. При диабетическом гломерулосклерозе почечный порог для глюкозы возрастает, поэтому глюкозурия не развивается даже при выраженной гипергликемии.

Увеличение экскреции глюкозы (глюкозурия) связано:

- с гипергликемией при сахарном диабете, гипертиреозе, стероидном диабете, синдроме Кушинга, феохромоцитоме, заболеваниях поджелудочной железы и других состояниях;
- со снижением почечного порога для глюкозы при тубулоинтерстициальных поражениях почек любой этиологии, врожденных тубулопатиях.

На уровень глюкозы в моче оказывает влияние (в сторону повышения) прием глюкокортикоидов, нестероидных противовоспалительных препаратов, некоторых диуретиков.

К тестам, которые используются в диагностике и мониторинге патологии углеводного обмена, относятся определение уровня гликозилированного гемоглобина, фруктозамина, а также альбумина в моче (тест на микроальбуминемию).

Гликозилированный гемоглобин.

Гликозилированный (или гликированный) гемоглобин (HbA1c) образуется в результате неферментативной реакции между гемоглобином A, содержащимся в эритроцитах, и глюкозой сыворотки крови. Для определения уровня HbA1c необходима цельная венозная кровь, взятая с антикоагулянтом.

Референтные величины содержания HbA1c в крови составляют 4,0–5,2% от общего гемоглобина.

Степень гликозилирования гемоглобина (а, следовательно, его концентрация) зависит от концентрации глюкозы в крови и от длительности контакта глюкозы с гемоглобином (срока жизни эритроцита). Эритроциты, циркулирующие в крови, имеют разный возраст, поэтому для усредненной характеристики уровня связанной с ними глюкозы ориентируются на полупериод жизни эритроцитов – 60 сут. Существуют три варианта гликозилированного

гемоглобина: HbA1a, HbA1b, HbA1c, но только вариант HbA1c количественно преобладает и дает более тесную корреляцию со степенью выраженности сахарного диабета.

Исследование концентрации глюкозы в крови недостаточно для эффективного мониторинга лечения сахарного диабета. Определив уровень глюкозы в крови, можно оценить текущий (сиюминутный) уровень глюкозы, который может зависеть от: 1) приема (или неприятия) пищи; 2) ее состава, 3) физических нагрузок и их интенсивности, 4) эмоционального состояния пациента, 5) времени суток. Поэтому при исследовании только текущего уровня глюкозы в крови высока вероятность того, что ее значения не будут отражать действительную степень компенсации сахарного диабета, а это может привести либо к передозировке лекарственных препаратов, либо к неоправданному уменьшению дозировки. Ценность определения HbA1c состоит в том, что он характеризует средний уровень глюкозы в крови на протяжении длительного промежутка времени, т.е. действительную степень компенсации сахарного диабета на протяжении последних 1–2 месяцев.

В целом определение HbA1c дает усредненное, интегрированное представление об уровне гликемии при всех формах сахарного диабета.

Взаимосвязь между концентрациями глюкозы в крови и уровнем HbA1c.

Уровень HbA1c	Концентрация глюкозы в крови	
	ммоль/л	мг/дл
4,0	2,6	50
5,0	4,7	80
6,0	6,3	115
7,0	8,2	150
8,0	10,0	180
9,0	11,9	215
10,0	13,7	250
11,0	15,6	280
12,0	17,4	315
13,0	19,3	350
14,0	21,1	380

Результаты исследования HbA1c оценивают следующим образом: 4–6% свидетельствует о хорошей компенсации сахарного диабета в последние 1–2 месяца, 6,2–7,5% – удовлетворительный уровень, выше 7,5% – неудовлетворительный уровень. Для оценки эффективности лечения целесообразно повторить исследование через 2–3 мес.

Уровень HbA1c не зависит от времени суток, физических нагрузок, приема пищи, назначенных лекарственных средств, эмоционального состояния пациента.

Ложные сниженные значения HbA1c имеют место при уремии, острых и хронических геморрагиях, а также при состояниях с уменьшением длительности жизни эритроцитов (например, при гемолитической анемии).

Фруктозамин.

Референтные величины содержания фруктозамина в сыворотке – 205–285 мкмоль/л.

Фруктозамин представляет собой продукт необратимого гликозилирования белков плазмы крови. Степень гликозилирования белков плазмы зависит от концентрации глюкозы в крови и длительности периода полураспада белков. Количество фруктозамина в крови служит хорошим показателем для ретроспективного контроля за содержанием глюкозы в крови у пациентов с сахарным диабетом и позволяет оценивать эффективность проводимого лечения без отягощающего больного ежедневного контроля за уровнем гликемии в крови.

В отличие от HbA1c, фруктозамин отражает средний уровень глюкозы в крови за 2-3 нед. до измерения. Это обусловлено периодом полураспада гликозилированных белков, для альбумина он составляет 20 дней, тогда как для гемоглобина он определен длительностью полураспада эритроцитов (60 дней). При оценке результатов исследования фруктозамина как критерия компенсации сахарного диабета, считают, что при содержании его в крови от 280 до 320 мкмоль/л компенсация удовлетворительная, выше 320 мкмоль/л – декомпенсация.

Альбумин в моче (микроальбуминурия).

Микроальбуминурия – это экскреция альбумина с мочой, превышающая допустимые нормальные значения, но не достигающая степени протеинурии. В норме экскретируется не более 30 мг альбумина в сутки, что эквивалентно концентрации альбумина в моче менее 20 мг/л при ее разовом анализе. При появлении протеинурии экскреция альбумина с мочой превышает 300 мг/сут. Поэтому диапазон колебаний концентрации альбумина в моче при микроальбуминурии составляет от 30 до 300 мг/сут или от 20 до 200 мкг/мин.

Исследование на микроальбуминурию используют для скрининга поражения почек и необходимости лечения диабетической нефропатии. Своевременное начало лечения нефропатии существенно снижает затраты и улучшает прогноз в отношении развития почечной недостаточности. Если в суточной моче концентрация альбумина выше 30 мг и эти значения повторяются несколько раз, необходимо проводить лечение, так как данные изменения характерны для начинающейся диабетической нефропатии.

Классификация видов альбуминурии.

Вид альбуминурии	Экскреция альбумина с мочой		Концентрация альбумина в моче мг/л
	При однократном сборе мочи (утренняя порция), мкг/мин	За сутки, мг	
Нормоальбуминурия	Менее 20	Менее 30	Менее 20
Микроальбуминурия	20-200	30-300	20-200
Макроальбуминурия	Более 200	Более 300	Более 200

В настоящее время тест на микроальбуминурию необходимо рассматривать как показатель оценки функции плазматических мембран высокодифференцированных клеток. В норме отрицательно заряженный альбумин не проходит через гломерулярный фильтр почек, прежде всего вследствие наличия высокого отрицательного заряда на поверхности эпителиальных клеток. Этот заряд обусловлен структурой фосфолипидов клеточных мембран. Снижение количества двойных связей в ацильных остатках фосфолипидов уменьшает отрицательный заряд, и альбумин начинает фильтроваться в первичную мочу в повышенном количестве. Все эти изменения возникают при развитии атеросклероза, поэтому микроальбуминурия наблюдается у пациентов с генетическими формами дислипидемии, у пациентов с ИБС, эссенциальной гипертензией, у 10% практически здоровых людей при скрининговых исследованиях и у пациентов с нарушением толерантности к глюкозе. Так как изменение структуры фосфолипидов плазматических мембран высокодифференцированных клеток развивается при атеросклерозе и немедленно сказывается на заряде мембран, микроальбуминурия представляет собой тест раннего определения заболевания.

ТЕМА:СИСТЕМА ГЕМОСТАЗА.

Основные вопросы темы.

- 1) Функции системы гемостаза в организме
- 2) Виды гемостаза
- 3) Составляющие элементы первичного гемостаза
- 4) Роль тромбоцитов в гемостазе
- 5) Характеристика коагуляционного гемостаза. Плазменные факторы коагуляции
- 6) Основные компоненты фибринолитической системы
- 7) Методы исследования сосудисто-тромбоцитарного гемостаза
- 8) Методы исследования коагуляционного гемостаза. Методы оценки коагуляционного гемостаза
- 9) Понятие о протромбиновом времени. Способы выражения ПТВ
- 10) Методы определения фибриногена

Актуальность темы.

Гемостаз – это функция организма, обеспечивающая, с одной стороны, сохранение крови в кровеносном русле в жидком агрегатном состоянии, а с другой стороны – остановку кровотечения и предотвращение кровопотери при повреждении кровеносных сосудов.

Система гемостаза включает в себя:

- 1.Сосудисто-тромбоцитарный гемостаз (первичный).
- 2.Коагуляционный гемостаз (вторичный).
- 3.Фибринолиз.

Составляющие элементы первичного гемостаза:

А. Сосуды и ткани:

- Сосуды различного калибра спазмируются в ответ на выделение сосудосуживающих субстанций, таких как серотонин, адреналин, норадреналин и др.;
- эндотелий сосудов в неповрежденном виде обладает антикоагуляционными свойствами (гепариноиды на поверхности эндотелия), а при повреждении становится мощным прокоагулянтом.

Б. Морфологические элементы крови:

- тромбоциты;
- эритроциты;
- лейкоциты.

Роль тромбоцитов в гемостазе:

- на поверхности тромбоцитов происходит большинство реакций плазменного гемостаза;
- адгезия тромбоцитов – способность активированных тромбоцитов прилипать к стенке сосуда на месте повреждения;

- агрегация тромбоцитов – способность их прилипать друг к другу с образованием агрегатов.

Роль тромбоцитов в гемостазе:

- на поверхности тромбоцитов происходит большинство реакций плазменного гемостаза;
- адгезия тромбоцитов – способность активированных тромбоцитов прилипать к стенке сосуда на месте повреждения;
- агрегация тромбоцитов – способность их прилипать друг к другу с образованием агрегатов.

Коагуляционный гемостаз.

Коагуляционный гемостаз обеспечивается протеолитической активацией плазменных факторов, в результате из растворимого белка фибриногена образуется нерастворимый фибрин. Ключевой реакцией гемостаза является генерация тромбина.

Плазменные факторы коагуляции:

Фактор I (фибриноген) – белок, который синтезируется в печени.

Концентрация фибриногена в крови составляет 2-4 г/л. Уменьшение концентрации менее 1 г/л угрожает пациенту кровотечением.

Фактор II (протромбин) – гликопротеид, синтезируется в печени. Для синтеза этого фактора необходим витамин К. В результате воздействия на него мультиферментного комплекса протромбиназы образуется ключевой фермент гемостаза – тромбин.

Фактор III (тканевой фактор) – рецепторный белок мембраны клеток, находится во всех органах и тканях организма, в том числе и эндотелии сосудов. Является рецептором для VII фактора и обеспечивает активацию гемостаза.

Фактор IV (кальций) – участвует во всех этапах плазменного гемостаза.

Фактор V (проакцелерин) – синтезируется в печени, принимает участие в активации протромбина, являясь частью мультиферментного комплекса протромбиназы. При недостатке развивается парагемофилия.

Фактор VI / VII (проконвертин/конвертин) – витамин К зависимый белок, синтезирующийся в печени. Около 1% циркулирует в крови в активной форме VIIa. VIIa на поверхности поврежденного эндотелия образует комплекс с тканевым фактором, который в свою очередь активирует фX, таким образом обеспечивая генерацию микроколичеств тромбина, что играет ключевую роль в усилении процесса свертывания крови.

Факторы VIII, IX, XI – антигемофильные факторы. Активированные факторы VIIa и IXa на фосфолипидной поверхности мембран образуют теназный комплекс, который образует главный компонент протромбиназы – фактор Xa.

Фактор X (фактор Стюарта) – является ключевым энзимом протромбиназы, которая трансформирует протромбин в тромбин.

Фактор XII (фактор Хагемана) – фактор контакта. Дефицит этого фактора обычно клинически не проявляется.

Фактор XIII (фибринстабилизирующий фактор). Образует Д-Д-связи в нестабильном полимере фибрина, что стабилизирует последний.

Основные компоненты фибринолитической системы.

1. **Плазминоген** – это профермент из которого образуется фибринолитический фермент плазмин.

2. **Активаторы плазминогена** – превращают плазминоген в плазмин:

- тканевой активатор плазминогена (ТПА) – является главным активатором в плазме;

- урокиназный активатор плазминогена (УПА) – является главным активатором в тканях.

3. Ингибиторы активаторов плазминогена (ИАП):

- ИАП1 – образуется в эндотелии сосудов;

- ИАП2 – образуется в плаценте.

4. **Ингибиторы плазмина:** α 2-антиплазмин, α 2-макроглобулин и α 1-антитрипсин.

5. **Рецепторы урокиназного активатора плазминогена** – обеспечивает протекание фибринолиза в тканях.

6. Рецептор плазминогена.

7. Тромбин-активируемый ингибитор фибринолиза (TAFI).

Методы исследования сосудисто-тромбоцитарного гемостаза.

1. Определение времени кровотечения.

Многочисленные модификации теста основаны на точном измерении длительности кровотечения из ранки на мочке уха, дистальной фаланги пальца руки или верхней трети ладонной поверхности предплечья.

Метод Дьюке.

Стерильным скарификатором или плоским ланцетом прокалывают нижний валик мочки уха (глубина прокола 3,5-4 мм) и включают секундомер. Предварительно мочку уха согревают. Выступающие капли крови каждые 30 с промокают фильтровальной бумагой, не прикасаясь к ранке. В момент, когда новые капли крови не образуются, выключают секундомер и определяют общую длительность кровотечения, а также оценивают размеры капель.

В норме время кровотечения по Дьюку не превышает **4 мин.** Его увеличение наблюдается при выраженных тромбоцитопениях или/и тяжелых нарушениях их функции (тромбоцитопатиях). Следует помнить также, что у 60% больных с этой патологией тест оказывается отрицательным.

Метод Айви.

Несколько более чувствительным является тест Айви, когда оценивают время кровотечения из надрезов на коже ладонной поверхности верхней трети предплечья на фоне искусственного повышения венозного давления с помощью манжеты для определения АД, в которой поддерживают давление 40 мм рт. ст. По ходу предплечья прикладывают соответствующий шаблон и скальпелем делают два надреза длиной 9 мм и глубиной 1 мм. Засекают время. Не касаясь надрезов, осторожно промокают кровь фильтровальной бумагой каждые 30 с до остановки кровотечения в обеих ранках. Рассчитывают среднее время по двум надрезам. В норме время кровотечения по Айви не превышает 7 минут.

2. Подсчет количества тромбоцитов.

В настоящее время используется три метода подсчета тромбоцитов в крови:

- В камере Горяева;
- в мазках крови;
- автоматический метод.

Подсчет в камере Горяева. Является самым точным, но достаточно трудоемким. Подсчет тромбоцитов в 1 л проводится по стандартной методике с учетом разведения крови и объема большого квадрата счетной сетки Горяева с применением фазово-контрастного микроскопа для лучшего контрастирования тромбоцитов.

Исследуемую кровь разводят в 200 раз раствором аммония оксалата или раствором, содержащим натрия хлорид, фурациллин и дистиллированную воду. Разведенную кровь перемешивают и оставляют на 30 минут для гемолиза эритроцитов. Затем заполняют камеру Горяева и подсчитывают тромбоциты в 25 больших квадратах.

Подсчет в мазках крови. Метод основан на подсчете числа тромбоцитов на 1000 эритроцитов с последующим пересчетом на 1 л крови. Кровь смешивают с раствором магнeзии сульфата или ЭДТА. Мазки готовят на предметных стеклах и окрашивают их по Романовскому-Гимзе. В каждом поле зрения микроскопа подсчитывают число эритроцитов и тромбоцитов, передвигая мазок до тех пор, пока не будут просчитаны 1000 эритроцитов. Зная число эритроцитов в 1 л крови, рассчитывают количество тромбоцитов в этом объеме.

Автоматический метод. Данный метод с использованием современных анализаторов значительно облегчает и ускоряет исследование, в связи с чем находит все большее распространение в клинической практике.

3. Оценка агрегации тромбоцитов.

Определение агрегационной способности тромбоцитов можно выполнить с помощью следующих методов:

Качественные методы (общее ориентировочное представление об агрегационной активности) основаны на визуальном определении тромбоци-

тарных агрегатов, образующихся при смешивании тромбоцитарной плазмы с различными, чаще естественными, стимуляторами агрегации:

- **в пробирке** – макроскопический способ;
- **на предметном стекле** – микроскопический способ.

В качестве стимуляторов агрегации используют растворы АДФ, тромбина, адреналина, коллагена, ристомидина. Регистрируют время образования крупных агрегатов тромбоцитов, которое в норме обычно не превышает **10-60 с**.

Количественная фотометрия – это регистрация процесса агрегации с помощью агрегометров (наиболее полная оценка агрегационной способности тромбоцитов). Метод заключается в графической регистрации изменения оптической плотности тромбоцитарной плазмы при перемешивании ее со стимуляторами агрегации.

Образование тромбоцитарных агрегатов ведет к увеличению светопропускающей способности тромбоцитарной плазмы.

Полученные при этом агрегатограммы анализируют по нескольким количественным параметрам:

1. Времени начала агрегации после добавления соответствующего стимулятора.
2. Амплитуде агрегатограммы на 2-й и 6-й минутах исследования.
3. Общей площади агрегатограммы.

В зависимости от используемого стимулятора и его дозы агрегатограмма может иметь различную форму:

- при использовании в качестве стимуляторов агрегации тромбоцитов коллагена, тромбина, ристомидина регистрируют одну большую волну агрегации;
- при добавлении к тромбоцитарной плазме малых доз АДФ – двухволновую агрегатограмму.

Отсутствие на агрегатограммах, полученных при использовании в качестве стимулятора малых доз АДФ, второй волны агрегации свидетельствует об уменьшении в тромбоцитах гранул, содержащих биологически активные вещества (недостаточность пула хранения), или о нарушении реакции высвобождения этих веществ из тромбоцитов.

Методы исследования коагуляционного гемостаза.

В основе большинства лабораторных тестов оценки плазменного звена гемостаза лежит **клотинговый метод**.

Принцип всех клотинговых тестов основан на определении времени образования фибринового сгустка (*clot* – сгусток) после добавления в исследуемую плазму ионов кальция и активатора того этапа коагуляционного гемостаза который нас интересует.

Методы оценки коагуляционного гемостаза АЧТВ (активированное частичное тромбопластиновое время).

АЧТВ используется как скрининговый тест для оценки внутреннего пути активации коагуляционного гемостаза, скрининговой диагностики волчаночного антикоагулянта и мониторинга за антикоагулянтным действием гепарина.

Метод основан на измерении времени свертывания бестромбоцитарной плазмы при добавлении в нее оптимального количества кальция хлорида или каолина, что обеспечивает стандартизацию контактной активизации факторов свертывания. Реагент для АЧТВ содержит контактный активатор (суспензия каолина) и фосфолипиды (кефалин). Контакт плазмы с частицами каолина стимулирует продукцию активного фактора XII (XIIa), предоставляя поверхность для функционирования высокомолекулярного кининогена, калликреина и фактора XIIa. Фосфолипиды необходимы для образования комплексов с активным фактором X (Xa) и протромбином.

После определённого времени инкубации в реакционную смесь добавляется хлорид кальция. Тем самым имитируется запуск свертывания по внутреннему пути и выявляется возможный дефицит факторов, участвующих в нем, либо наличие ингибиторов свертывания.

Укорочение АЧТВ иногда определяется у больных стромбофилией. Это может быть связано с резистентностью фактора V к активному протеину C, повышенным уровнем фактора VIII или активированных факторов свертывания. Однако чаще всего укорочение АЧТВ объясняется нарушениями работы с кровью на преаналитическом этапе.

Удлинение АЧТВ происходит при:

- врожденном или приобретенном дефиците факторов II, V, VIII, IX, X, XI, XII, прекалликреина, снижении активности ф-VIII на фоне болезни Виллебранда;
- лечении гепарином, гирудином или апротинином (ингибитор контактной фазы коагуляции);
- присутствии в крови ПДФ, волчаночного антикоагулянта;
- нарушении функции печени;
- коагулопатии потребления (ДВС-синдром);
- тяжелой дисфибриногенемии или афибриногенемии.

Протромбиновое время (ПТВ).

Протромбиновое время – широко используемый скрининговый тест для оценки внешнего пути активации коагуляционного гемостаза. ПТВ обычно используется для определения активности фактора VII и контроля за лечением непрямых антикоагулянтами.

ПТВ представляет собой коагуляционный тест, в котором определяют время свертывания плазмы пациента после добавления к ней смеси тканевого тромбопластина и ионов кальция, что приводит к запуску свертывания по внешнему пути.

ПТВ удлиняется при: дефиците факторов VII, X, V, протромбина и фибриногена, в том числе при тяжелых заболеваниях печени, наличии аутоантител против факторов свертывания.

Существует несколько способов выражения ПТВ:

• **Протромбиновый индекс (ПТИ)** = $\frac{\text{ПВ стандартной плазмы}}{\text{ПВ пациента}}$ (0,8-1,2). Увеличение свидетельствует о гиперкоагуляции, а уменьшение о гипокоагуляции.

• **Протромбиновое отношение (ПО или PR)** = $\frac{\text{ПВ пациента}}{\text{ПВ стандартной плазмы}}$ (0,94-1,1).

• **Международное нормализованное отношение (МНО или INR)**, которое рассчитывается следующим образом:

$$\text{МНО} = \text{ПО}^{\text{МИЧ}}$$

МИЧ (ISI) – международный индекс чувствительности, соотносящий активность тканевого фактора из животных источников со стандартом тканевого фактора у человека (рекомендуемое ВОЗ значение МИЧ до 1,2).

Тромбиновое время (ТВ).

Метод заключается в определении времени свертывания плазмы при добавлении в нее раствора стандартного тромбина, который обладает способностью индуцировать превращение фибриногена в фибрин без участия других факторов свертывания крови.

Определение тромбинового времени позволяет оценить конечный этап коагуляционного гемостаза (фибринообразование). ТВ зависит от концентрации фибриногена, его свойств и наличия в крови ингибиторов тромбина (гепарин, антитромбин III). Определение ТВ используют в целях выявления дисфибриногенемий и оценки антикоагулянтной активности крови.

Пролонгированное ТВ наблюдается при значительном снижении уровня фибриногена крови (менее 0,5 г/л), наличии продуктов деградации фибрина, в том числе при ДВС-синдроме, тромболитической терапии или присутствии в крови аномальных форм фибриногена (при врожденной патологии и вследствие заболеваний печени).

Присутствие антикоагулянтов прямого действия, в частности гепарина, также вызывает удлинение тромбинового времени (комплекс гепарин-антитромбин нейтрализует добавленный тромбин). Антикоагулянты непрямого действия не влияют на результаты теста. Удлинение тромбинового времени, помимо этого, может быть связано с присутствием аутоантител к тромбину или наличием в плазме парапротеинов, которые препятствуют полимеризации мономеров фибрина.

Удлинение тромбинового времени наблюдается при:

- гипофибриногенемии (менее 0,5 г/л);
- дисфибриногенемии (наследственные, приобретенные);

- повышенном содержании в крови продуктов деградации фибрина (ДВС-синдром; фибринолитическая терапия);
- присутствии в крови антикоагулянтов прямого действия (гепарина, гиродина, синтетических антитромбинов);
- парапротеинемии.

Укорочение тромбинового времени может произойти при:

- повышенном риске тромбообразования (I-я стадия ДВС-синдрома);
- значительном повышении концентрации фибриногена в крови.

Фибриноген.

Фибриноген представляет собой белок, синтезирующийся в печени и являющийся предшественником фибрина. Определение концентрации фибриногена в плазме крови является одним из рутинных тестов коагулограммы.

Методы определения.

Определение по Клауссу.

Определение фибриногена по Клауссу считается наиболее адекватным тестом, выполняется на коагулометрах. Оно основано на определении времени образования сгустка при добавлении высокой концентрации тромбина к разбавленной в 10-20 раз плазме. При этом логарифм времени образования сгустка прямо пропорционален логарифму концентрации фибриногена. Если время свертывания очень короткое (<5 с), то тест проводится с использованием разведенной плазмы. Гепарин не оказывает влияния на результаты определения.

Гравиметрический метод.

Принцип данного метода заключается в высушивании и взвешивании сгустка, который образуется при добавлении к плазме 0,2 мл стандартного раствора тромбина.

Турбидиметрический метод.

При этом определение фибриногена осуществляется по изменению мутности плазмы с использованием батрокомбина. Метод широко используется при автоматических вариантах определения фибриногена.

Иммунохимические методы.

Методы из данной группы основаны на турбидиметрическом или нефелометрическом способе регистрации, использовании поликлональных антител и адаптированы к иммунохимическим анализаторам. Как правило, для каждого иммунохимического анализатора применяется специфический тест-набор на фибриноген. Недостатком данных методов является то, что они не дифференцируют нативный фибриноген и продукты его деградации. Это особенно важно при ведении больных, которым проводится тромболитическая терапия, при обширных тромбозах и ДВС-синдроме, когда происходит значительное увеличение в плазме ПДФ.

Клиническое значение:

Фибриноген - острофазный белок. Его концентрация увеличивается при тяжелых бактериальных инфекциях, травмах и тромбозах. К значительному росту уровня фибриногена приводят заболевания почек (пиелонефрит, гломерулонефрит, гемолитикоуремический синдром), коллагенозы (ревматоидный артрит, узелковый периартериит), ночная пароксизмальная гемоглобинурия, новообразования (рак легких). При атеросклерозе наблюдается устойчивое увеличение фибриногена, труднокорректируемое лекарственными препаратами. Риск развития сердечно-сосудистых заболеваний при этом повышается пропорционально росту его уровня. Повышение концентрации фибриногена в плазме крови больных сердечно-сосудистыми заболеваниями предшествует развитию инфаркта миокарда и инсульта. Корреляция между уровнем данного белка и развитием этих осложнений особенно четко прослеживается у пациентов молодого возраста. Определение уровня фибриногена является одним из наиболее чувствительных тестов для выявления бессимптомных стадий поражения периферических сосудов.

Дисфибриногемия представляет собой относительно часто встречающееся состояние, причем оно может определяться несколькими мутациями, одни из которых не сопровождаются, а другие сопряжены с кровотечениями.

Снижение концентрации фибриногена в плазме наблюдается при:

- врожденном дефиците;
- печеночно-клеточной недостаточности;
- ДВС-синдроме;
- острых фибринолитических состояниях;
- поражениях костного мозга (лейкоз, опухолевые метастазы).

Референтные значения:

2-4 г/л.

Определение высокомолекулярных производных фибриногена.

Наиболее важными в практическом отношении высокомолекулярными производными фибриногена являются:

1) Растворимые фибрин-мономерные комплексы (РФМК).

Они представляют собой высокомолекулярные растворимые комплексы фибрин-мономера с фибриногеном и с продуктами расщепления фибриногена/фибрина. В норме РФМК не обнаруживаются. Их появление в плазме свидетельствует о нарушении процесса нормальной полимеризации фибрин-мономеров.

2) Продукты деградации фибриногена (ПДФ). Вещества, в не больших количествах образующиеся и в норме в результате расщепления фибрина.

Определение растворимых фибрин-мономерных комплексов (РФМК).

Для выявления РФМК в клинике чаще используются так называемые *паракоагуляционные тесты*. Они основаны на феномене неферментативного

свертывания РФМК при добавлении к плазме, в которой содержатся РФМК, 50% раствора этанола или 1% раствора протамина сульфата.

Проба с 50% раствором этанола является более чувствительной. В пробирку набирают 0,15 мл 50% этанола и 0,5 мл плазмы. Её встряхивают и помещают в штатив при комнатной температуре. Проба расценивается как положительная, если через 1–10 мин в пробирке образуется гель.

Проба с протамина сульфатом позволяет выявить не только полимеризацию фибрин-мономеров, высвобождающихся из РФМК, но и обнаружить осаждение ранних продуктов расщепления фибриногена/фибрина. Перед началом исследования предварительно готовят 5 разведений 1% раствора протамина сульфата (в 5, 10, 20, 40 и 80 раз). В каждое из приготовленных разведений добавляют 0,2 мл плазмы. Пробирки оставляют на 30 мин при комнатной температуре. Оценка результатов проводится так же, как и в пробе с этанолом. В норме отрицательный результат обнаруживают во всех разведениях протамина сульфата. Если хотя бы в одном из разведений образуется гель, результат оценивается как положительный.

Положительная проба с этанолом, а также положительный результат протаминсульфатной пробы в первых двух разведениях свидетельствует о наличии в плазме РФМК. Образование геля во всех разведениях протамина сульфата больше характерно для повышения уровня ранних продуктов расщепления фибриногена/фибрина.

Положительные результаты обеих проб встречаются при ДВС-синдроме, а также массивных тромбозах и тромбоэмболиях, сопровождающихся активацией системы фибринолиза.

Определение продуктов деградации фибрина (ПДФ)

D-димеры.

D-димеры – это специфические продукты деградации фибрина, образующиеся в процессе лизиса сгустка крови под влиянием пламина и некоторых неспецифических фибринолитиков. Концентрация D-димеров в сыворотке пропорциональна активности фибринолиза и количеству лизируемого фибрина. Этот тест позволяет судить об интенсивности процессов образования и разрушения фибриновых сгустков.

Определение D-димеров может проводиться иммуноферментным методом с использованием моноклональных антител, иммунодиффузии, методом турбидиметрии, а также латекс-агглютинации.

Повышение уровня D-димеров в крови наблюдается при венозных тромбозах, атеротромбозе, тромбоэмболии легочной артерии, ДВС-синдроме, при массивных оперативных вмешательствах.

На содержание D-димеров влияют такие факторы, как размер тромба, время от начала клинических проявлений до назначения антикоагулянтной терапии, длительность приема антикоагулянтов.

ТЕМА: ОБМЕН ВЕЩЕСТВ И ЭНЕРГИИ. ОБЩИЕ ПУТИ КАТАБОЛИЗМА. ГЛИКОЛИЗ.

Основные вопросы темы.

- 1) Взаимосвязь обмена веществ и энергии
- 2) Понятие о тканевом дыхании
- 3) Понятие о митохондриальной цепи переноса электронов
- 4) Сопряжение тканевого дыхания и синтеза АТФ
- 5) Дыхательный контроль
- 6) Разобщение дыхания и синтеза АТФ
- 7) Терморегуляторная функция дыхания
- 8) Ингибиторы дыхания
- 9) Катаболизм глюкозы (анаэробное и аэробное окисление глюкозы). Биологическое значение гликолиза
- 10) Связь гликолиза и ЦТК. Энергетический выход данных процессов

Актуальность темы.

Биоэнергетика — раздел биохимии, изучающий биохимические механизмы, приводящие к генерации различных форм биологической энергии, процессы превращения и запасаения энергии в живых системах. К настоящему времени сформулированы три основных закона биоэнергетики:

1. Живая клетка избегает прямого использования энергии внешних ресурсов для совершения полезной работы. Она сначала превращает их в одну из трех конвертируемых форм энергии («энергетических валют»).
2. Любая живая клетка всегда располагает как минимум **двумя** «энергетическими валютами»: одна – водорастворимая (АТФ) и вторая – связанная с мембраной (протонный или Na^+ – градиент мембранного потенциала).
3. «Энергетические валюты» клетки могут превращаться одна в другую. Поэтому получения хотя бы **одной** из них за счет внешних ресурсов достаточно для поддержания жизнедеятельности клетки.

Каждое органическое соединение обладает определённым запасом внутренней энергии (U). Часть этой внутренней энергии молекулы может быть использована для совершения полезной работы. Эту энергию называют свободной энергией (G) молекулы. Источники энергии для организма – это химические реакции, в которых молекулы, содержащие атомы углерода в восстановленном состоянии, подвергаются окислению. При этом специальные дыхательные переносчики (молекулы НАД⁺ и ФАД) присоединяют протоны и электроны (восстанавливаются) и в таком виде транспортируют атомы водорода в дыхательной цепи.

Эндергонические реакции – это химические реакции, требующие притока энергии для их осуществления. В этих реакциях изменение свободной энергии ΔG положительная величина ($\Delta G > 0$).

Экзергонические реакции – это реакции, в которых энергия выделяется, т.е. они идут с выделением энергии. В таких реакциях изменение свободной энергии ΔG – отрицательная величина ($\Delta G < 0$).

Внутриклеточные химические реакции могут быть представлены в виде:

1. катаболических (экзергонических) реакций;
2. анаболических (эндергонических) реакций.
- 3.

Эндергонические реакции ΔG положительное	Экзергонические реакции ΔG отрицательное
1. Реакция протекает только при поступлении свободной энергии.	1. Реакция протекает самопроизвольно и сопровождается уменьшением свободной энергии.
2. Если абсолютное значение ΔG велико, то система устойчива и реакция не осуществляется.	2. Если абсолютное значение ΔG велико, то реакция идёт практически до конца (необратимая).
4. Это всегда энергетически сопряжённые реакции, т.к. им необходим приток энергии от экзергонических реакций.	3. Это энергодающие реакции, они служат источниками энергии для других реакций или процессов.
4. Анаболические реакции.	4. Катаболические реакции.

Пример сопряжённых реакций: Реакция фосфорилирования глюкозы свободным фосфатом с образованием глюкозо-6-фосфата является эндергонической:

1. Глюкоза + $H_2PO_4 \rightarrow$ Глюкозо-6-фосфат + H_2O ($\Delta G = + 13,8$ кДж/моль).

Самопроизвольно такая реакция осуществиться не может. Её течение требует притока энергии. Для протекания этой реакции в сторону образования глюкозо-6-фосфата необходимо её сопряжение с другой реакцией, в которой энергия выделяется в заведомо большем количестве, чем требуется для фосфорилирования глюкозы. Такой реакцией является реакция гидролиза АТФ.

2. АТФ $\rightarrow$ АДФ + H_2PO_4 ($\Delta G = -30,5$ кДж/моль)

При сопряжении процессов (1) и (2) в реакции, катализируемой гексокиназой, фосфорилирование глюкозы легко протекает в физиологических условиях; равновесие реакции сильно смещено вправо и она практически необратима:

3. Глюкоза + АТФ $\rightarrow$ Глюкозо-6-фосфат + АДФ ($\Delta G = + 13,8 + -30,5 = -16,7$ кДж/моль)

В живых системах в отношении направления биологических процессов действует принцип: эндергонические реакции проходят за счет энергии освобождающейся в экзергонических реакциях.

Анаболические (биосинтетические) процессы, требующие притока энергии, протекают за счет энергии катаболических процессов (процессов распада молекул).

Макроэргические соединения.

Макроэргические соединения – соединения, содержащие макроэргическую связь, при гидролизе которой освобождается энергия больше чем 30 кДж/моль.

К клеточным макроэргическим соединениям относят фосфоенолпируват, 1,3-дифосфоглицерат, которые образуются в гликолизе (в процессе распада глюкозы до пирувата). К ним относят также сукцинил~СоА (образуется в цикле трикарбоновых кислот, переносит фосфатную группу на ГДФ) и креатинфосфат, являющиеся субстратами, так называемого субстратного фосфорилирования, при котором их макроэргическая связь используется для синтеза АТФ.

Макроэргическими соединениями являются также ацил~СоА и все соединения, содержащие сложную тиоэфирную группу, а также карбамоилфосфат (образуется в первой реакции цикла мочевины) и аргининфосфат, гистидинфосфат (имидазолфосфат) и все нуклеозиддифосфаты и нуклеозитрифосфаты.

Эти молекулы обладают большим потенциалом переноса фосфатной группы на АДФ с образованием АТФ, потому что энергия, выделяемая при распаде этих макроэргических молекул более высокая, чем требуется для синтеза АТФ из АДФ. По отношению к АДФ, перечисленные макроэргические молекулы доноры энергии.

В свою очередь АТФ – источник энергии для важных метаболических путей, в которых идут превращения глюкозы, фруктозы и многих других молекул. Получая фосфатную группу от АТФ, эти молекулы увеличивают уровень своей свободной энергии (*G*), что обеспечивает течение ряда ферментативных реакций и клеточных процессов.

Таким образом, АТФ среди клеточных фосфорилированных соединений (по уровню свободной энергии) занимает некоторое промежуточное положение. Это определяет особое биологическое значение АТФ как универсального донора энергии в огромном числе реакций. Поэтому АТФ называют «энергетической валютой». Вместе с тем, АДФ универсальный акцептор энергии (и фосфатной группы) от клеточных макроэргов, которые обладают болеевысоким уровнем свободной энергии. Цикл АТФ-АДФ - основной механизм обмена энергии в клетке. Расчеты показывают, что в организме в сутки образуется и распадается 40-45 кг АТФ.

В зависимости от вида использования энергии все организмы делятся на *фототрофные* (использование энергии солнечного излучения) и *хемотрофные* (использование энергии химических веществ). К фототрофным относят все растения, к хемотрофам – животных и человека.

Живые организмы находятся в постоянной и неразрывной связи с окружающей средой. Эта связь осуществляется в процессе обмена веществ,

который включает 3 этапа: поступление веществ в организм, метаболизм и выделение конечных продуктов из организма.

Поступление веществ происходит в результате дыхания и питания. В желудочно-кишечном тракте происходит переваривание (гидролиз полимеров - белков, полисахаридов, липидов и других сложных органических веществ) до мономеров.

Мономеры всасываются и включаются в промежуточный обмен, который состоит из 2 типов реакций: катаболизма и анаболизма.

Катаболизм – процесс расщепления органических молекул до конечных продуктов (CO_2 , H_2O и мочевины). Реакции сопровождаются выделением энергии.

Анаболизм объединяет биосинтетические процессы, в которых простые строительные блоки соединяются в сложные макромолекулы, необходимые для организма. В этих реакциях используется энергия, освобождающаяся при катаболизме.

Процессы катаболизма в клетках животных и человека сопровождаются потреблением кислорода, который необходим для реакций окисления. В результате этих реакций происходит освобождение энергии, которая необходима организмам в процессе жизнедеятельности для осуществления различных видов работы. Энергия необходима для поддержания температуры тела, выполнения химической работы (синтез органических соединений, усложнения химической структуры), активного транспорта веществ через мембраны, механической работы (мышечное сокращение), а так же для генерирования электрического тока и иногда света (биолюминесценция)

Носителями энергии являются электроны, формирующие связи между атомами в органических субстратах. Для использования этой энергии необходимо расщепление молекул субстрата и освобождение энергии электронов. Источником этой энергии являются процессы биологического окисления, сопряженного с окислительным фосфорилированием, происходящим в организме человека и животных.

Биологическое окисление – это окисление ионов водорода молекулярным кислородом с образованием эндогенной воды. Основным источником энергии являются соединения ионов водорода, отщепляемого от распадающегося субстрата с O_2 в дыхательной цепи.

Дыхательная цепь (цепь переноса электронов) представляет собой биохимическую систему во внутренней мембране митохондрий, состоящую из ряда переносчиков электронов и протонов, транспортирующих электроны от окисляющегося субстрата к вдыхаемому кислороду. Дыхательная цепь в процессе миграции по ней электронов обеспечивает постепенную (ступенчато) отдачу им своей избыточной энергии, которая частично (40-50%) переходит в энергию трансмембранного электрохимического потенциала, а затем аккумулирует в синтезирующиеся молекулы АТФ. Часть энергии электронов (50-60%) расходуется в виде тепла, что необходимо для поддержания температуры тела. Происходит сопряжение процессов биологического окисления и окислительного фосфорилирования.

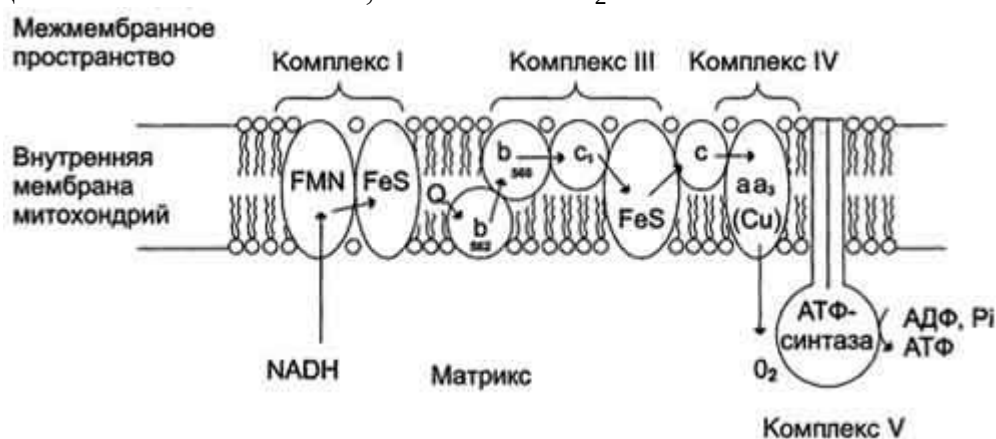
Основной путь переноса электронов и протонов (полная дыхательная цепь) включает в себя 4 ферментных комплекса:

Комплекс 1 - называется НАДН - КоQ (убихинон)- оксидоредуктаза и обеспечивает передачу электронов от НАДН H^+ к КоQ.

Комплекс 2 - сукцинат - КоQ -оксидоредуктаза - катализирует перенос электронов от сукцината (ацилов жирных кислот) на КоQ.

Ферментный комплекс 3 называется КоQ Н -цитохром с - оксидоредуктаза (комплекс вс) и передает электроны от КоQ Н на цитохром с.

Ферментный комплекс 4 - цитохромоксидаза, катализирует перенос электронов от цитохрома с на кислород. В этот комплекс входят цитохром а и а₃, содержащие два гема и два иона Cu^{2+} , которые меняя валентность с Cu^{2+} на Cu^+ и обратно, принимают и отдают электроны на цитохром а₃, электроны присоединяются к ионам Cu^{2+} , а от них на O_2 .



Локализуется во внутренней мембране митохондрий и располагается ассиметрично.

Последовательность расположения компонентов дыхательной цепи определяется большей или меньшей выраженностью у них окислительной и восстановительной способности, которая характеризуется *окислительно-восстановительным потенциалом* (редокс потенциал). Чем отрицательнее редокс - потенциал, тем сильнее восстанавливающая способность, то есть способность отдавать электроны, тем большей энергией эти электроны обладают. Наибольшей окислительной способностью (принимать электроны) обладает O_2 , и его редокс-потенциал имеет наибольшую величину.

Она достигает в ЦПЭ - 1,2 в, что соответствует освобождению 220 кДж энергии в расчете на 1 моль H^+ (52,7 ккал/моль) в стандартных условиях измерения. В физиологических же условиях в клетке эти величины составляют 380 кДж или 90 ккал/моль).

Митохондриальная дыхательная цепь *укорачивается* в том случае, если субстрат дегидрируется сразу флавиновым ферментом (с коферментом ФАД). При этом электроны и протоны с такого субстрата сразу передаются через ФАД убихинону.

Редокс-потенциал у подобных субстратов выше, чем у тех, которые окисляются НАД⁺-зависимой дегидрогеназой, запас энергии у электронов

меньше, поэтому трансмембранный потенциал возникает меньшей величины и вследствие этого синтезируется меньшее количество АТФ- (1,5 молекулы).

Окислительным фосфорилированием называется синтез АТФ путем фосфорилирования АДФ, используя энергию трансмембранного электрохимического потенциала, возникающего при освобождении энергии электронов в процессе миграции их по дыхательной цепи к вдыхаемому O_2

Коэффициент фосфорилирования (P/O) это соотношение количеств израсходованного на синтез АТФ фосфора H_3PO_4 и поглощенного O_2 . Он выражает эффективность функционирования цепи транспорта электронов: чем выше коэффициент, тем больше синтезируется АТФ в расчете на пару переносимых электронов. В полной дыхательной цепи коэффициент равен 2,5, в случае же укороченной равен 1,5.

Согласно *химиосмотической гипотезе Митчела-Скулачева* основным фактором сопряжения окисления и фосфорилирования является *протонный градиент*. Часть энергии электронов окисленного субстрата в процессе их миграции по дыхательной цепи трансформируется в энергию трансмембранного электро-химического потенциала, создаваемого путем перекачки протонов из матрикса митохондрий в межмембранное пространство. В дальнейшем протоны через канал сопрягающего устройства возвращаются в матрикс (замыкается протонный цикл), концентрация протонов выравнивается, мембрана разряжается, а энергия трансмембранного электрохимического градиента используется для синтеза АТФ.

Трансмембранный электрохимический потенциал и протонный потенциал, протон - движущая сила ($\Delta \mu H$) - это градиент концентрации ионов водорода и электрических зарядов по обе стороны внутренней мембраны митохондрий. Этот потенциал складывается из разности электрических зарядов ($\Delta \psi$) равной около 0,206 и градиента ионов водорода (ΔpH) - около 0,056. Общая величина $\Delta \mu H = 0,25$ в. Протонный потенциал возникает путем перекачки H^+ из матрикса в межмембранное пространство за счет энергии транспорта электронов. В каждой точке сопряжения и фосфорилирования в межмембранное пространство поступает не менее 2 H^+ .

Под сопряжением понимают превращение энергии транспорта электронов в промежуточную форму - в энергию трансмембранного потенциала с последующим использованием ее для фосфорилирования АДФ, то есть синтеза АТФ. Протонный градиент создается путем выталкивания ионов водорода в трех участках дыхательной цепи: при переходе электронов с ФМН H_2 через FeS-белок на КоQ, при переходе электронов с КоQH₂ через FeS-белок на цитохром c_1 и при транспорте электронов от цитохрома a_3 к O_2 . Эти участки обозначены как пункты сопряжения.

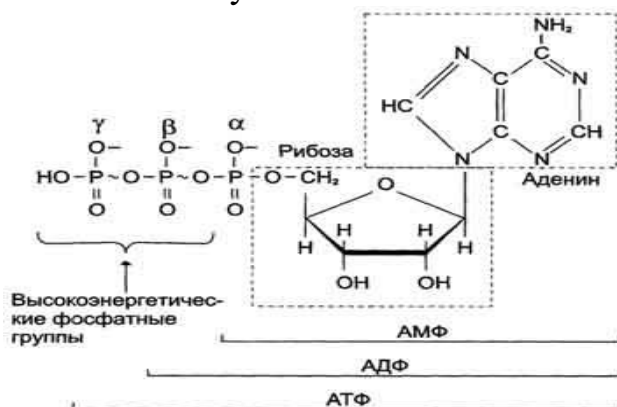
Сопрягающее устройство является биохимической системой, осуществляющей фосфорилирование АДФ (синтез АТФ) за счет энергии протонного потенциала. Локализовано оно в грибовидных выступах внутренней мембраны митохондрий. Одна часть - это белковый канал (F_0), другая - (F_1) - это фермент H^+ -АТФ-синтетаза. Поток протонов через сопрягающее устройство сопровождает разряд мембраны и выделение свободной энергии, обу-

славливает синтез АТФ из АДФ и H_3PO_4 . При этом происходит либо активирование фосфата, либо конформационные изменения белка.

Эти процессы являются общими для всех органических субстратов, именно они наработывают энергию для процессов жизнедеятельности, нарушение которых приводит к развитию патологических процессов. Поэтому очень важно для студентов знать основы биоэнергетики, процесс биологического окисления и окислительного фосфорилирования.

Роль АТФ в метаболизме и функции клетки.

Все живые клетки используют в качестве «горючего» небольшую молекулу под названием аденозинтрифосфат (АТФ). Этот универсальный источник энергии питает биологические реакции, обеспечивающие функционирование клеток и процветание всего живого организма. АТФ — незаменимый «игрок» на биологическом поле. Молекула АТФ, известная прежде всего как универсальный источник энергии для всех живых клеток, выполняет также коммуникативные функции, влияющие на поведение клеток. АТФ — поистине вездесущая молекула, но ее влияние на разные ткани и органы варьирует, что позволяет по-новому взглянуть на происхождение многих заболеваний и наметить пути к их лечению.



Обнаружилось, однако, что эта самая востребованная человеческим организмом молекула выполняет еще одну, совсем другую, но не менее значимую функцию. Результаты многолетних исследований показывают, что АТФ, вне всякого сомнения, еще и важная сигнальная молекула, обеспечивающая связь между клетками и тканями по всему организму. Оказывается, АТФ — не только универсальный источник энергии, но и универсальный «связной».

Предположение о двойной роли АТФ было впервые высказано в начале 1950-х гг. и воспринято без всякого энтузиазма. Однако за последние 15 лет появилось множество данных, проливающих свет на то, как именно молекулы АТФ воздействуют на клетку, находясь не внутри нее, а снаружи, и как они участвуют в выполнении органами и тканями их повседневных функций. Поскольку влияние данной молекулы на физиологию организма и состояние его здоровья уникально по своей широте, сегодня лаборатории в самых разных странах упорно работают над тем, чтобы извлечь из этого свойства максимальную пользу для медицины.

До 1929 г., когда была обнаружена АТФ, по всему миру шли интенсивные поиски неуловимого внутриклеточного источника энергии. Почти одновременно Карл Ломан (Karl Lohmann) и лауреат Нобелевской премии 1922 г. Отто Мейергоф (Otto Meyerhof) из Института медицинских исследований Кайзера Вильгельма в Хайдельберге, с одной стороны, и Сайрус Фиск (Cyrus H. Fiske) вместе со своим аспирантом Иеллапрагадой Субба Роу (Yellapragada Subba Row) из Гарвардской медицинской школы — с другой, показали, что на внутриклеточные процессы, которые обеспечивают сокращение мышечных клеток, влияет молекула, состоящая из аденозина (соединения азотистого основания аденина с сахарным остатком) и трех фосфатных групп. В 1935 г. Катаси Макино (Katashi Makino) из Даляньской больницы в Маньчжурии предложил структуру молекулы, правильность которой подтвердили десять лет спустя Бэзил Литго (Basil Lythgoe) и Александер Тодд (Alexander Todd) из химической лаборатории Кембриджского университета.

За весь этот период не появилось ни одного свидетельства участия АТФ в процессах, протекающих вне клеток. Ситуация изменилась лишь в 1962 г. Молодой нейрофизиолог из Мельбурнского университета в Австралии, Бернсток, исследуя процессы передачи информации вегетативной нервной системой (в числе прочего она контролирует сокращение стенок мочевого пузыря и кишечника), обнаружил коммуникативную связь, в которой не принимают участия такие общеизвестные нейромедиаторы, как ацетилхолин или норадреналин. Незадолго до этого (1959 г.) Памела Холтон (Pamela Holton) из Кейбриджской физиологической лаборатории предположила, что сенсорные нервные клетки секретируют молекулы АТФ, и Бернсток решил проверить, могут ли они отвечать за коммуникацию между двигательными нейронами и мышцами. Необходимо было блокировать передачу информации гладким мышцам с помощью традиционных нейромедиаторов. На эксперименты ушло более десятилетия, и только в 1972 г. Бернсток счел возможным обнародовать свое предположение о существовании «пуринэргических нервных клеток», которые используют АТФ в качестве нейромедиатора.

Электрические импульсы, генерируемые нервными клетками, распространяются по всей длине нейрона, но электрический заряд не может преодолеть крошечный зазор — синаптическую щель — между двумя нейронами или перескочить с нервного окончания на мышечную клетку. Послания передаются от клеток к клеткам с помощью таких нейромедиаторов, как ацетилхолин, глутамат, дофамин. Они высвобождаются в синаптическую щель нейроном, генерирующим импульсы, и связываются с рецепторами следующего нейрона. В нем происходит ряд изменений, приводящих в конце концов к генерации импульсов, которые инициируют сокращение или расслабление мышц. Таким образом, информация передается от нейрона к нейрону в виде чередующихся электрических и химических разрядов.

Долгое время считалось, что каждый нейрон высвобождает нейромедиаторы только одного типа. Соответственно, клетки, секретирующие ацетилхолин, называли холинэргическими, дофамин — дофаминэргическими и т.д. Концепция Бернстока о наличии пуринаэргических нейронов основыва-

лась не только на его собственных наблюдениях, но и на результатах работ нейрофизиологов из Мельбурнского и Лондонского университетов, в числе которых Макс Беннет (Max Bennett), Грейм Кэмпбелл (Graeme Campbell), Молли Хоулман (Mollie Holman) и Майк Ранд (Mike Rand).

Долгое время считалось, что каждый нейрон высвобождает нейромедиаторы только одного типа. Соответственно, клетки, секретирующие ацетилхолин, называли холинэргическими, дофамин — дофаминэргическими и т.д. Концепция Бернстока о наличии пуринэргических нейронов основывалась не только на его собственных наблюдениях, но и на результатах работ нейрофизиологов из Мельбурнского и Лондонского университетов, в числе которых Макс Беннет (Max Bennett), Грейм Кэмпбелл (Graeme Campbell), Молли Хоулман (Mollie Holman) и Майк Ранд (Mike Rand).

Несмотря на множество данных в пользу того, что АТФ высвобождается нейронами мышц кишечника и мочевого пузыря, многие нейрофизиологи сомневались в существовании нервных клеток, которые используют АТФ в качестве нейромедиатора. Сомнения были связаны в первую очередь с тем, что, по мнению ученых, такая вездесущая молекула вряд ли способна осуществлять специфические функции. Далее, необходимым условием выполнения ею роли нейромедиатора было существование подходящего рецептора на поверхности клетки-мишени, но такового не обнаруживалось. И тогда начался его поиск.

В то же время не прекращались попытки выяснить, каким именно образом молекулы АТФ, секретируемые нейронами, передают информацию мышечным и другим клеткам. Основываясь на результатах исследований, Бернсток в 1978 г. предположил, что у АТФ и конечного продукта его расщепления аденозина существуют отдельные семейства рецепторов — он назвал их P2 и P1 соответственно. Дальнейшие эксперименты показали, что активация P2-рецептора под действием АТФ приводит к разным последствиям, а это значит, что, по-видимому, есть два подтипа данных рецепторов. Бернсток и его сотрудники называли их P2X и P2Y.

И все же сама идея, что нервные клетки используют АТФ в качестве нейромедиатора, вызывала сомнения. Только в 1990-х гг. появились молекулярные методы, с помощью которых сразу в нескольких лабораториях были идентифицированы рецепторы АТФ, что сразу позволило исследовать все многообразие действий, оказываемых этой молекулой на нервные и другие клетки.

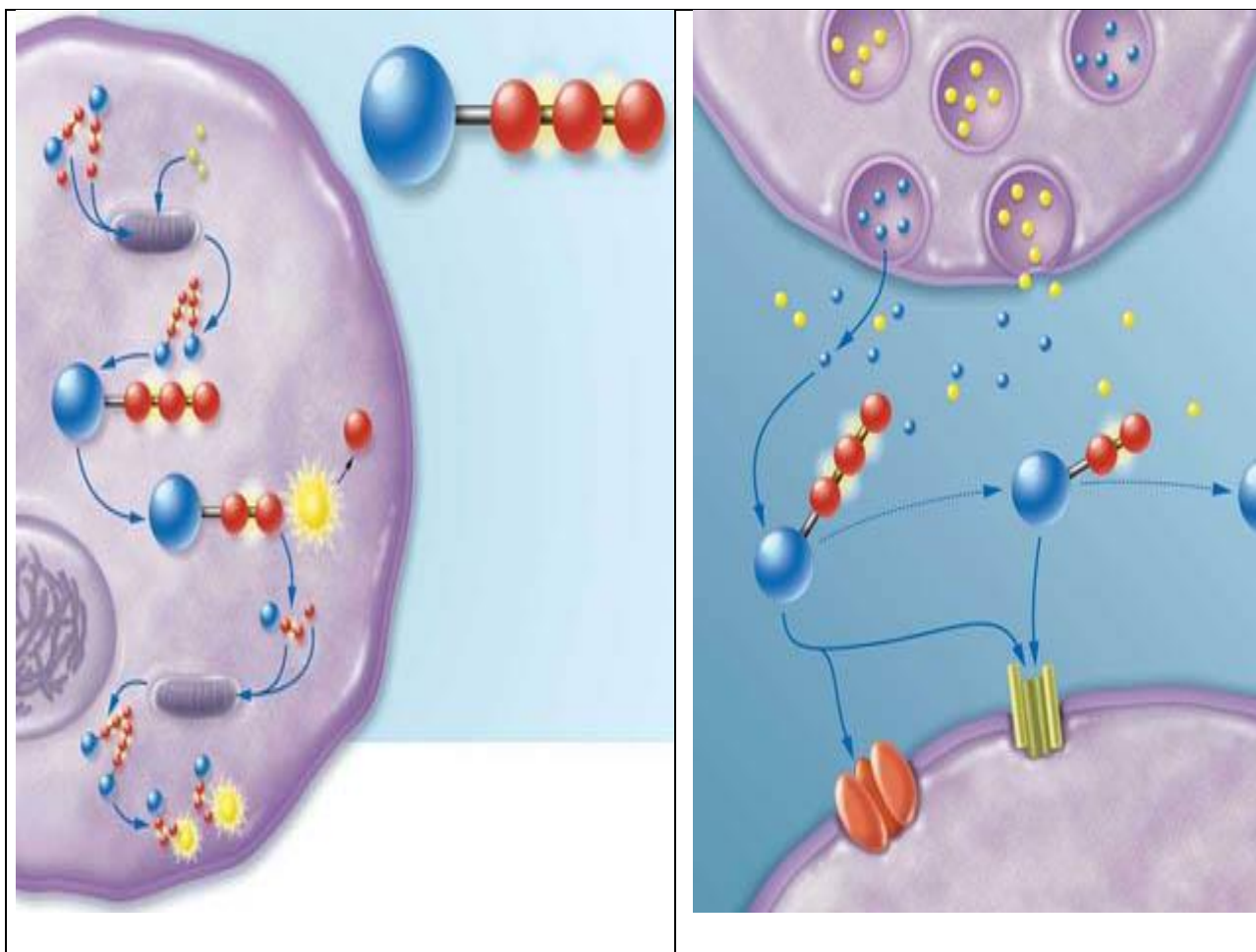
Запомните!

- Хранилищами энергии в молекуле АТФ служат химические связи между тремя фосфатными группами. К ним присоединена молекула аденозина, одного из двух пуриновых азотистых оснований, входящих в состав ДНК
- АТФ синтезируется в особых клеточных структурах — митохондриях.

Одним из главных участников процесса служат протоны (H^+), высвобождаемые из молекул глюкозы при их расщеплении. В митохондриях (1) протоны участвуют в присоединении фосфатной группы к аденозиндифос-

фату (АДФ), в результате чего образуется АТФ, который выходит в цитоплазму (2). При отщеплении от АТФ концевой фосфатной группы (3) выделяется энергия, которая используется в частности для синтеза белков. АДФ и свободный фосфат воссоединяются с образованием АТФ (4).

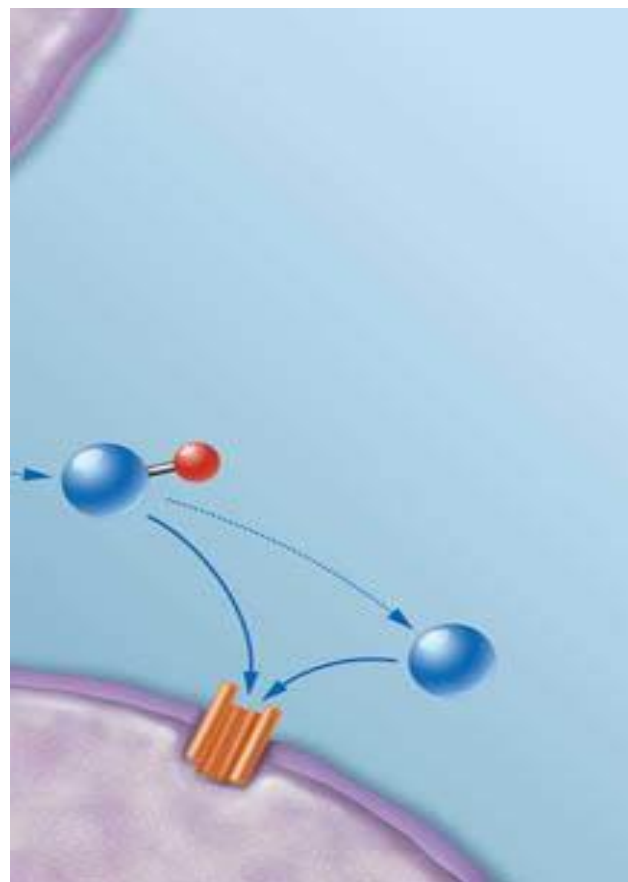
В 1990-х гг. начались работы над проектом «Геном человека», и вскоре были идентифицированы гены, кодирующие жизненно важные белки человека, в том числе гены, которые детерминируют синтез белков некоторых АТФ-рецепторов. Затем удалось локализовать и сами рецепторы на различных клетках. Изучение сигнальной системы с участием АТФ стало началом новой эры в области межклеточных коммуникаций. Детальное исследование молекулярной структуры пуриновых рецепторов привело к открытию крупного их семейства и обнаружению на клеточной поверхности целого ряда каналов и ферментов, принимающих участие в передаче АТФ-сигналов. Как и ожидалось, было выявлено два обширных класса рецепторов, но каждый из них был представлен гораздо большим числом подтипов, чем предполагалось. Такое разнообразие подразумевало, что каждый из подтипов может стать мишенью для «своего» вещества, способного влиять на АТФ-сигналы только в специфических тканях и клетках. И уже сегодня получены этому подтверждения.



Как показали дальнейшие исследования, механизм действия двух типов рецепторов существенно различается. P2X-рецепторы относятся к суперсемейству ионных каналов, открываемых нейтромедиаторами. Один из нас (Как) совместно с другими исследователями обнаружил, что, связываясь с АТФ, P2X-рецепторы «открываются» в буквальном смысле этого слова и образуют трансмембранный канал, по которому в клетку устремляются натриевые и кальциевые ионы. В отличие от этого рецепторы P2Y при связывании с АТФ запускают в клетке каскад межмолекулярных взаимодействий, в результате которых в цитоплазму высвобождаются внутриклеточные запасы кальция. И в том, и в другом случае кальций может повлиять на другие события на молекулярном уровне и изменить поведение клетки.

Молекула АТФ находится в синаптической щели совсем не долго, но ее влияние на активацию рецептора в одних случаях оказывается кратковременным, порядка миллисекунд, а в других длится годами. Например, резкий приток в клетку ионов кальция через P2X-каналы может привести к секреции последней других нейромедиаторов (что наблюдалось в тканях мозга), а высвобождение этих же ионов из внутриклеточных депо в результате активации P2Y может повлиять на активность генов, опосредующих пролиферацию клеток, и привести к изменениям в тканях, имеющим долговременные последствия.

Одновременно с нейромедиаторами из нервной клетки, генерирующей импульсы, высвобождаются молекулы АТФ (1), которые тоже переносят информацию. К секреции сигнальных АТФ способны и другие клетки. Оказавшись во внеклеточном пространстве, АТФ подвергаются ферментативному расщеплению (2) с образованием сначала АДФ, затем АМФ и наконец аденозина. Сама молекула АТФ и все продукты ее расщепления переносят информацию от клетки к клетке, связываясь со специфическими рецепторами на их поверхности (3). Известны два типа АТФ-рецепторов: P2X и P2Y. Последний распознают также молекулы АДФ. АМФ и аденозин связываются с P1-рецепторами. Продукты расщепления АТФ могут ослаблять или усиливать его действие; например, аденозин, связываясь с P1-рецептором клетки-источника АТФ,



способен подавлять его высвобождение

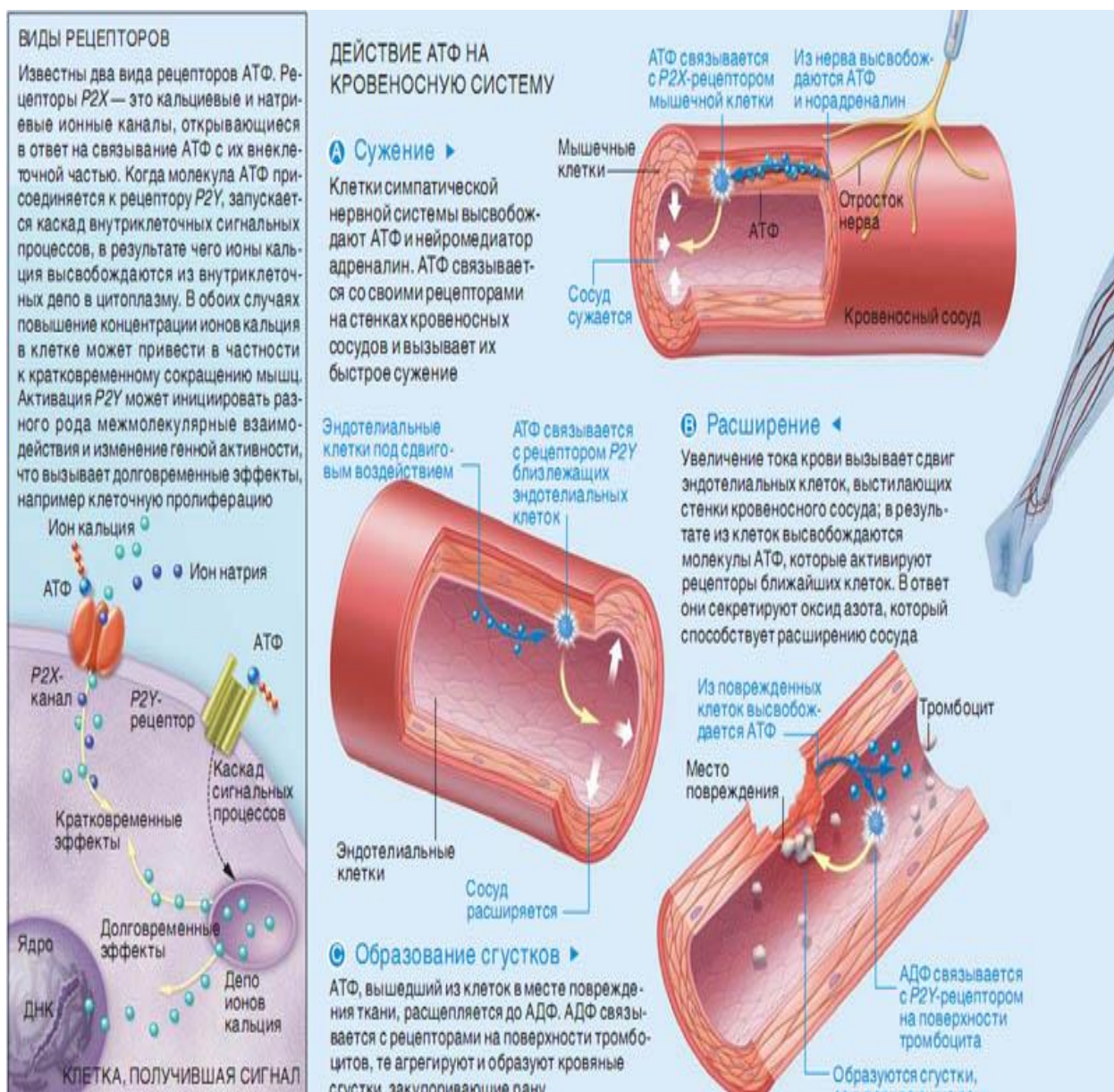
Механизм действия АТФ как сигнальной молекулы представляется еще более сложным, когда в дело вступают другие внеклеточные системы сигнализации. Известно, например, что обширное семейство ферментов под названием экто-АТФазы, находящихся на поверхности большинства клеток, быстро отщепляют от молекулы АТФ фосфатные группы, превращая АТФ сначала в аденозиндифосфат (АДФ), затем в аденозинмонофосфат (АМФ), и наконец в аденозин. Каждый из продуктов расщепления АТФ может действовать на клетку по-своему.

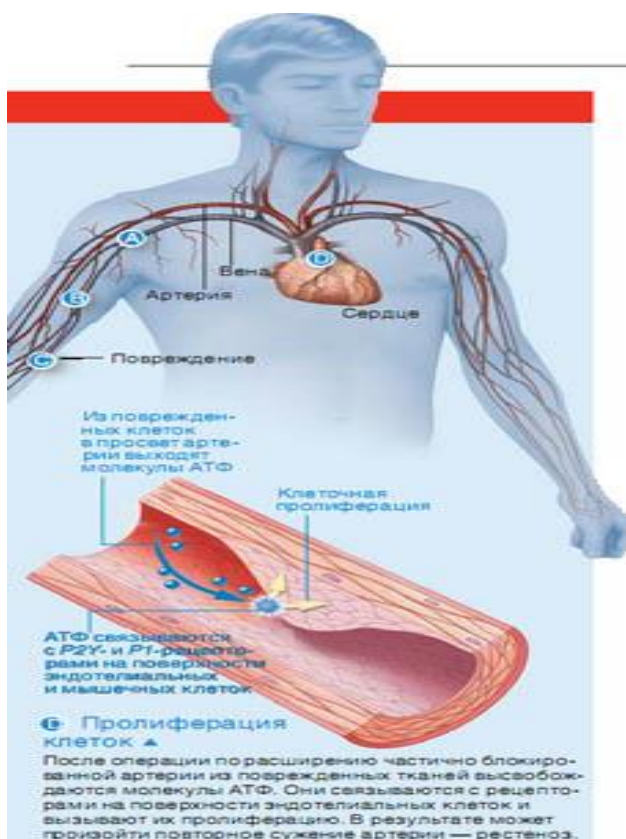
Фусао Като (Fusao Kato) из Медицинской школы Университета Дзикеи в Токио показал, например, что АТФ совместно с аденозином участвует в работе нейронных сетей ствола головного мозга, опосредуя такие важные физиологические функции, как дыхание, сокращение сердечной мышцы и работу желудочно-кишечного тракта. Известны и прямо противоположные ситуации, когда АТФ и аденозин выступают как антагонисты при передаче сигналов: сигнал один – переносчиков много.

Впервые способность АТФ к переносу информации была продемонстрирована для нервных клеток и мышц. Но теперь мы знаем, что АТФ играет аналогичную роль в самых разных тканях. На примере сердечно-сосудистой системы мы покажем, насколько разнообразны по своей природе и длительности механизмы действия АТФ от одного нейрона другому аденозин может подавлять высвобождение АТФ в синаптическую щель одним из нейронов. Таким образом, взаимное влияние эффектов АТФ, его составляющих и внеклеточных экто-АТФаз можно рассматривать как основу саморегулирующейся сигнальной сети.

Совместное влияние на клетку оказывают не только АТФ и продукты его расщепления; в нервной системе у АТФ есть и другие партнеры, в отношении которых он действует как конейромедиатор. Такое явление, обнаруженное Бернстоком еще в 1976 г., помогло опровергнуть устоявшееся мнение, что любой нейрон синтезирует, запасает и выделяет один вид рецепторов. Известны два вида рецепторов АТФ. Ре-цепторы P2X — это кальциевые и натриевые ионные каналы, открывающиеся в ответ на связывание АТФ с их внеклеточной частью. Когда молекула АТФ присоединяется к рецептору P2Y, запускается каскад внутриклеточных сигнальных процессов, в результате чего ионы кальция высвобождаются из внутриклеточных депо в цитоплазму. В обоих случаях повышение концентрации ионов кальция в клетке может привести в частности к кратковременному сокращению мышц. Активация P2Y может инициировать разного рода межмолекулярные взаимодействия и изменение генной активности, что вызывает долговременные эффекты, например клеточную пролиферацию освобождает всего один тип нейромедиаторов. Накоплено множество свидетельств в пользу того, что АТФ обычно высвобождается совместно с такими нейромедиаторами, как всем известные норадреналин и ацетилхолин. Впервые концепция конейромедиато-

ра была выдвинута относительно АТФ. Сегодня известны и другие примеры подобного партнерства: ГАМК и глицин, дофамин и серотонин, ацетилхолин и глутамат. Мы имеем здесь еще один пример того, как исследование сигнальных функций АТФ по могло выявить более универсальные физиологические закономерности и наметить новые направления развития других областей. Увеличение тока крови вызывает сдвиг эндотелиальных клеток, выстилающих стенки кровеносного сосуда; в результате из клеток высвобождаются молекулы АТФ, которые активируют рецепторы ближайших клеток. В ответ они секретируют оксид азота, который способствует расширению сосуда.





Роль АТФ в поддержании нормы и борьбе с патологиями.

АТФ принимает участие в функционировании всех пяти органов чувств. Так, показано, что рецепторы АТФ на поверхности нервных клеток в сетчатке глаза реагируют на информацию, поступающую от палочек и колбочек (клеток, воспринимающих световые сигналы). В свою очередь, нервные клетки сетчатки используют АТФ и ацетилхолин в качестве конейромедиаторов для передачи информации в центры головного мозга, отвечающие за ее обработку. Помимо повседневной работы АТФ, по данным нескольких групп ученых, участвует как сигнальная молекула в очень важном акте в процессе развития эмбриона — формировании зрительной системы.

Николас Дейл (Nicholas Dale) из Уорикского университета в Англии вместе со своими коллегами показал, что высвобождение АТФ в строго определенный момент развития эмбриона действительно служит сигналом к началу формирования глаза. Такую же роль он играет в развитии улитки внутреннего уха — структуры, ответственной за восприятие звука. АТФ участвует в работе слухового аппарата и у взрослого человека. Полость улитки выстилают до 50 тыс. волосковых сенсорных клеток, и примерно половина из них имеют АТФ-рецепторы, которые, как было показано, в ряде случаев опосредуют импульсацию нейронов. Далее, вкусовые сосочки на кончике языка несут $P2X$ -рецепторы, опосредующие вкусовые ощущения. Сюэ Киннамон (Sue C. Kinnamon) и ее коллеги из Университета штата Колорадо в ходе хорошо продуманных и организованных экспериментов продемонстрировали, что АТФ представляет собой жизненно важный нейромедиатор, передающий сигналы от вкусовых сосочков соответствующим нервным клеткам, и что мышцы, лишённые $P2X_2$ - и $P2X^3$ -рецепторов, не способны к восприятию вкуса.

Интересно, что такие же рецепторы опосредуют некоторые болевые ощущения. Многие знают не понаслышке, что подкожные инъекции АТФ весьма болезненны. Недавно группа физиологов из Школы медицины, стоматологии и биомедицинских наук при Королевском колледже в Лондоне пока-

зала, что боль возникает в результате активации P2X-рецепторов в нервных окончаниях в коже, опосредующих тактильные и болевые ощущения. Связь АТФ с другим видом боли, а именно возникающей при повреждении нервов, имеет иной характер. Эксперименты, проведенные Кадзухиде Иноуэ (Kazuhide Inoue) из Университета Кюсю в Японии и Майклом Салтером (Michael Salter) из Университета Торонто свидетельствуют, что в этом случае происходит активация АТФ-рецепторов на поверхности клеток микроглии в спинном мозге. Микроглия в свою очередь секретирует молекулы, которые раздражают нервные волокна, что и вызывает хроническую боль (см.: Филдс Д. Новые подозреваемые по делу о хронической боли //ВМН, № 1, 2010).

Уже сейчас некоторые фармацевтические компании намереваются использовать P2X-рецепторы в качестве мишеней для новых лекарственных средств при неврологических болях и болях, сопровождающих воспаление. И это только одна из возможных областей применения АТФ или их рецепторов в медицинских целях. В том же ряду находятся сердечно-сосудистые заболевания. Чтобы понять причину, нужно проследить, что происходит при таких патологиях. Клетки, получившие физические повреждения или неправильно функционирующие, могут высвобождать АТФ в межклеточную среду. Часто это служит сигналом для организма к включению механизмов репарации, в частности к выработке в повышенных количествах тромбоцитов и образованию сгустков крови, останавливающих кровотечение. У тромбоцитов имеются рецепторы подтипа P2Y₁₂; их активация внеклеточными молекулами АТФ и вызывает такие изменения в клетках, которые ускоряют образование сгустков. Эти же события лежат в основе возникновения тромбов в кровеносных сосудах, что может привести к инфаркту или инсульту. Уже создано лекарство-«блокбастер» под названием клопидогрел, которое блокирует рецепторы P2Y₁₂.

АНАТОМИЯ АТФ

В качестве нейромедиатора АТФ непосредственно участвуют в функционировании головного мозга и сенсорных рецепторов, а также в регуляции работы мышц и других органов и тканей. Высвобождаясь из клеток, не относящихся к нервной системе, АТФ часто служит «спусковым крючком» для защитных реакций. Ниже приведены некоторые примеры действия АТФ на различные органы и ткани. В одних случаях эти функции уже установлены, в других изучаются.

МОЗГ. АТФ опосредует связь между нейронами, а также между нейронами и клетками глии. Информация, переносимая этими молекулами и продуктом их расщепления аденозином, влияет на сон, память, обучаемость, двигательную активность. А если сигнал слишком сильный, может развиться эпилепсия или другие психические расстройства. АТФ способствует заживлению ран, но в то же время может запускать процесс апоптоза при нейродегенеративных заболеваниях.

СЕНСОРНЫЕ ОРГАНЫ И БОЛЕВЫЕ ОЩУЩЕНИЯ. АТФ регулирует, а в некоторых случаях переносит информацию от сенсорных нервов глаз,

ушей, носа и языка в головной мозг. Участвует в передаче в головной мозг болевых стимулов.

СЕРДЦЕ. Молекулы АТФ, высвобождаемые вместе с норадреналином нервными клетками вегетативной нервной системы, стимулируют сокращения сердечной мышцы. Нарушения в работе этой сигнальной системы вызывают аритмию и изменение артериального давления.

ДРУГИЕ ОРГАНЫ. АТФ, высвобождаемый нервными клетками кишечника, способствует сокращению его стенок и секреции пищеварительных ферментов. АТФ участвует также в регуляции эрекции, сокращений стенок мочевого пузыря.

КОСТНАЯ ТКАНЬ. Активация АТФ-рецепторов стимулирует процессы восстановления костной ткани и подавляет процессы ее разрушения.

КОЖА. Активация АТФ-рецепторов способствует заживлению ран, а также, возможно, участвует в нормализации процессов клеточной пролиферации при таких заболеваниях, как псориаз и склеродермия.

ИММУННАЯ СИСТЕМА. Молекулы АТФ, выходящие из клеток при повреждениях тканей, стимулируют клетки иммунной системы к запуску воспаления — защитной реакции организма. Однако слишком сильное и длительное воспаление может привести к нежелательным последствиям, например ревматоидному артриту. АТФ в качестве переносчика информации помогает клеткам иммунной системы уничтожать клетки, инфицированные патогенными бактериями, предотвращает стимулирующее действие АТФ, а несколько сходных препаратов проходят последние стадии клинических испытаний. Еще одно поле деятельности для терапии, нацеленной на АТФ, — пищеварительная система. Джеймс Галлиган (James J. Galligan) и другие сотрудники Университета штата Мичиган показали, что АТФ, высвобождаемый из нервных клеток кишечника, связывается с P2X- и P2Y-рецепторами стенок и участвует в регуляции их ритмичных сокращений, проталкивающих пищу по кишечному тракту. Одновременно молекулы АТФ, связывающиеся с P2Y-рецепторами на поверхности клеток, которые выстилают полость кишечника, усиливают секрецию пищеварительных ферментов. Вещества, действующие на эти рецепторы и влияющие на указанные процессы, представляют большой интерес для фармацевтических компаний как возможные кандидаты на роль лекарственных средств, направленных на устранение синдрома раздраженной толстой кишки и еще более серьезной патологии — болезни Крона.

Тот факт, что АТФ участвует в поддержании нормальной работы множества органов и тканей, предполагает возможность его применения для лечения целого ряда расстройств: болезней почек, костей, мочевого пузыря, кожи, неврологических и психических патологий. И что еще более важно — АТФ, возможно, является одним из естественных защитников организма от онкологических заболеваний. Еще в 1983 г. Элиезер Рапопорт (Eliezer Rappoport), работавший тогда в Медицинской школе Бостонского университета, сообщил о способности АТФ уничтожать раковые клетки. Новость была воспринята с большим скептицизмом, но с тех пор сразу несколько лабора-

торий независимо друг от друга показали, что АТФ действительно подавляет рост опухолей, в частности предстательной железы, молочных желез, прямой кишки, яичников, пищевода, а также останавливает развитие меланомы. Сигнальная система с участием АТФ, с одной стороны, вызывает апоптоз раковых клеток, а с другой — способствует дифференциации клеток, и все вместе это замедляет рост опухоли.

Для того чтобы новые сведения о функциях АТФ нашли практическое применение — имеется в виду создание лекарственных препаратов, готовых к употреблению, — придется проделать огромную работу. Но уже сейчас многие научно-исследовательские лаборатории и фармацевтические компании активно занимаются поисками веществ, которые избирательно влияли бы на определенные подтипы рецепторов АТФ или блокировали расщепление АТФ после его высвобождения из клеток.

АТФ – вездесущь

Участие АТФ в работе самых разных сигнальных систем ставит перед исследователями по крайней мере одну серьезную проблему: создание лекарственных средств, нацеленных на единственный орган или ткань. Возможно, решить ее поможет разнообразие субъединичных конфигураций АТФ-рецепторов у разных видов клеток и тканей. Балджит Как пытается сейчас сконструировать искусственные АТФ-рецепторы, которые можно было бы встроить в клеточные мембраны *in vitro* или даже в клетки лабораторных животных. Это позволит выявить последствия минимальных изменений функций рецепторов. Есть и другие подходы к направленному изменению функционирования АТФ как сигнальной молекулы и изучению его последствий на уровне организма.

Одно из недавних достижений последних 20 лет в той области исследований, о которой идет речь, — определение Эриком Гуоксом (Eric Gouaux) из Орегонского университета кристаллической структуры P2X-канала у рыбки данио рерио. Теперь мы можем проследить за работой данного рецептора на атомном уровне и понять, как осуществляется АТФ-сигнализация от момента связывания молекулы с рецептором до момента получения сигнала целой физиологической системой. Это поможет также в поиске новых лекарственных средств целевого действия.

Недавно АТФ-рецепторы были обнаружены у растений и таких простейших организмов, как сине-зеленые водоросли, амёбы и шистосомы, что открывает новые возможности в борьбе с заболеваниями растений и даже найдет применение в сельском хозяйстве. Наличие систем АТФ-сигнализации у разных форм жизни, далеко отстоящих друг от друга по уровню сложности, наводит на мысль, что коммуникативная функция появилась у АТФ так же давно, как и способность запасать энергию.

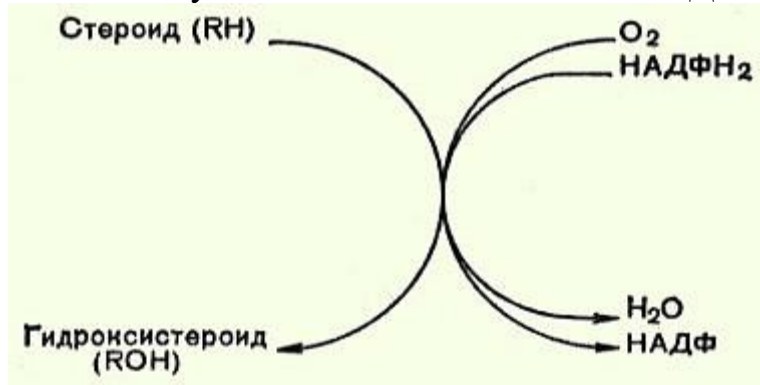
Мы с удовлетворением наблюдаем за тем, как изменяется отношение к сигнальной роли АТФ. 50 лет назад сама эта идея считалась несерьезной, а сегодня к АТФ проявляет интерес все биологическое сообщество. Мы уверены, что когда-нибудь возможности АТФ раскроются в полной мере и послужат улучшению качества жизни людей.

Микросомальное окисление и биологические функции кислорода в этом процессе.

Микросомы - морфологически замкнутые везикулы, в которые превращается эндоплазматический ретикулум при гомогенизации тканей. Следовательно, микросомную фракцию, выделяемую при дифференциальном центрифугировании гомогенатов, образуют преимущественно мембраны эндоплазматического ретикулума и некоторые другие субклеточные структуры (например, рибосомы).

Микросомальное окисление осуществляется ферментными системами, локализованными преимущественно в микросомной фракции таких органов, как печень и надпочечники, в мембранах гладкого эндоплазматического ретикулума (ЭПР). Ферменты, катализирующие восстановление одного атома молекулы O_2 с образованием воды и включение другого атома кислорода в окисляемое вещество, получили название микросомальных оксидаз со смешанной функцией или микросомальных монооксигеназ. Окисление с участием монооксигеназ обычно изучают, используя препараты микросом. В отличие от митохондриального окисления, где ведущую роль, как было показано выше, играют реакции дегидрирования, а кислород является конечным акцептором электронов и используется лишь для образования воды, в процессах микросомального окисления активированный кислород непосредственно внедряется в окисляемое вещество. При этом функциональная роль митохондриального и микросомального окисления в клетке различна. Митохондриальное окисление - механизм использования кислорода в биоэнергетических процессах. Микросомальное окисление - механизм использования кислорода с "пластическими" целями.

Ферментные системы, локализованные в микросомной фракции и способные использовать молекулярный кислород для окисления специфических органических соединений, делятся на оксигеназы, присоединяющие оба атома кислорода ($A + O_2 \rightarrow AO_2$), и гидроксилазы, присоединяющие к субстрату только один из двух атомов O_2 ($A + O_2 \rightarrow AOH + [O]$). Второй атом кислорода используется обычно на окисление НАДФН₂. Например:



Микросомальная цепь ферментов, осуществляющая гидроксилирование, в значительной мере изучена. Она содержит цитохром Р-450, восстановленный СО-комплекс которого имеет максимум поглощения при длине волны 450 нм, специфический флавопротеид, включающий ФАД, и Fe-белок, содержащий негеминовое железо. Следует заметить, что флавопротеиды и

цитохромы, которые функционируют в микросомальной цепи окисления, резко отличаются от ферментов митохондриальной дыхательной цепи.



Рис. 78. Схема механизма реакции гидроксилирования в микросомах. Fe^{2+} - восстановленная форма цитохрома P-450; RH - субстрат; ФП - флавопротеид; Fe-белок - белок, содержащий негеминное железо

На рис. 78 в общей форме представлена цепь переноса электронов в микросомах, при участии которой осуществляется гидроксилирование. Как видно из этого рисунка, имеются две точки цепи, где участвует НАДФН₂: первый раз он поставляет атом водорода и протон для образования воды, второй - отдает электрон для восстановления цитохрома P-450 (в переносе электрона на цитохром участвуют флавопротеид и белок, содержащий негеминное железо). Считается, что цитохром P-450 выполняет двойную функцию. Во-первых, он связывает субстрат гидроксилирования, во-вторых, на нем происходит активация молекулярного кислорода.

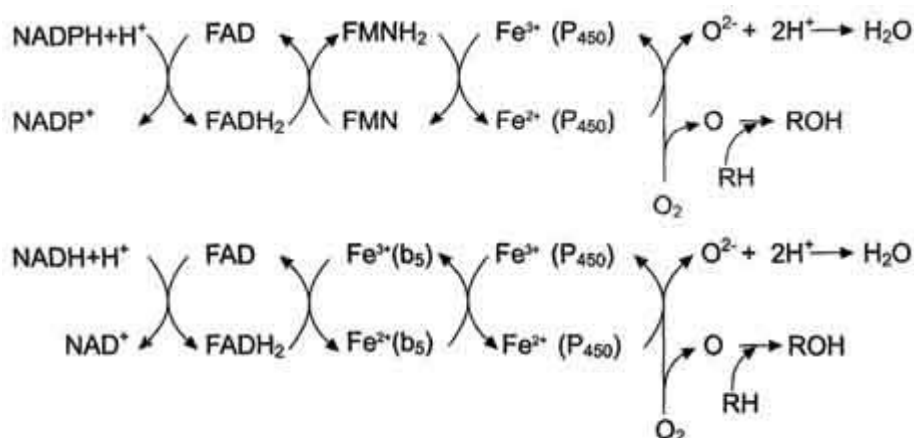
К числу эндогенных субстратов микросомального окисления следует отнести стероидные гормоны и холестерин, а также, по-видимому, ненасыщенные жирные кислоты. В последнее время появились указания на возможную роль реакций микросомального окисления в биосинтезе простагландинов. Велико значение микросомального окисления в метаболизме лекарственных средств и ряда токсических соединений.

1. Основные ферменты микросомальных электронтранспортных цепей

Микросомальная система не содержит растворимых в цитозоле белковых компонентов, все ферменты - мембранные белки, активные центры которых локализованы на цитоплазматической поверхности ЭР. Система включает несколько белков, составляющих электронтранспортные цепи (ЦПЭ). ВЭР существуют две такие цепи, первая состоит из двух ферментов - NADPH-P₄₅₀ редуктазы и цитохрома P₄₅₀, вторая включает фермент NADH-цитохром-b₅ редуктазу, цитохром b₅ и ещё один фермент - стеароил-КоА-десатуразу.

Электронтранспортная цепь - NADPH-P₄₅₀ редуктаза - цитохром P₄₅₀. В большинстве случаев донором электронов (e) для этой цепи служит NADPH, окисляемый NADPH-P₄₅₀ редуктазой. Фермент в качестве простетической группы содержит 2 кофермента - флавинаденинди-нуклеотид (FAD) и флавиномононуклеотид (FMN). Протоны и электроны с NADPH переходят последовательно на коферменты NADPH-P₄₅₀ редуктазы. Восстановленный FMN (FMNH₂) окисляется цитохромом P₄₅₀ (см. схему ниже).

Цитохром P₄₅₀ - гемопrotein, содержит простетическую группу гем и имеет участки связывания для кислорода и субстрата (ксенобиотика). Название цитохром P₄₅₀ указывает на то, что максимум поглощения комплекса цитохрома P₄₅₀ лежит в области 450 нм.



Окисляемый субстрат (донор электронов) для NADH-цитохром b₅ - редуктазы - NADH (см. схему выше). Протоны и электроны с NADH переходят на кофермент редуктазы FAD, следующим акцептором электронов служит Fe³⁺ цитохрома b₅. Цитохром b₅ в некоторых случаях может быть донором электронов (e) для цитохрома P₄₅₀ или для стеароил-КоА-десатуразы, которая катализирует образование двойных связей в жирных кислотах, перенося электроны на кислород с образованием воды (рис. 12-2).

NADH-цитохром b₅ редуктаза - двухдоменный белок. Глобулярный цитозольный домен связывает простетическую группу - кофермент FAD, а единственный гидрофобный "хвост" закрепляет белок в мембране.

Цитохром b₅ - гемсодержащий белок, который имеет домен, локализованный на поверхности мембраны ЭР, и короткий "заякоренный" в липидном бислое спирализованный домен.

NADH-цитохром b₅ -редуктаза и цитохром b₅, являясь "заякоренными" белками, не фиксированы строго на определённых участках мембраны ЭР и поэтому могут менять свою локализацию.

2. Функционирование цитохрома P₄₅₀

Известно, что молекулярный кислород в триплетном состоянии инертен и не способен взаимодействовать с органическими соединениями. Чтобы сделать кислород реакционно-способным, необходимо его превратить в синглетный, используя ферментные системы его восстановления. К числу таких принадлежит монооксигеназная система, содержащая цитохром P₄₅₀. Связывание в активном центре цитохрома P₄₅₀ липофильного вещества RH и молекулы кислорода повышает окислительную активность фермента.

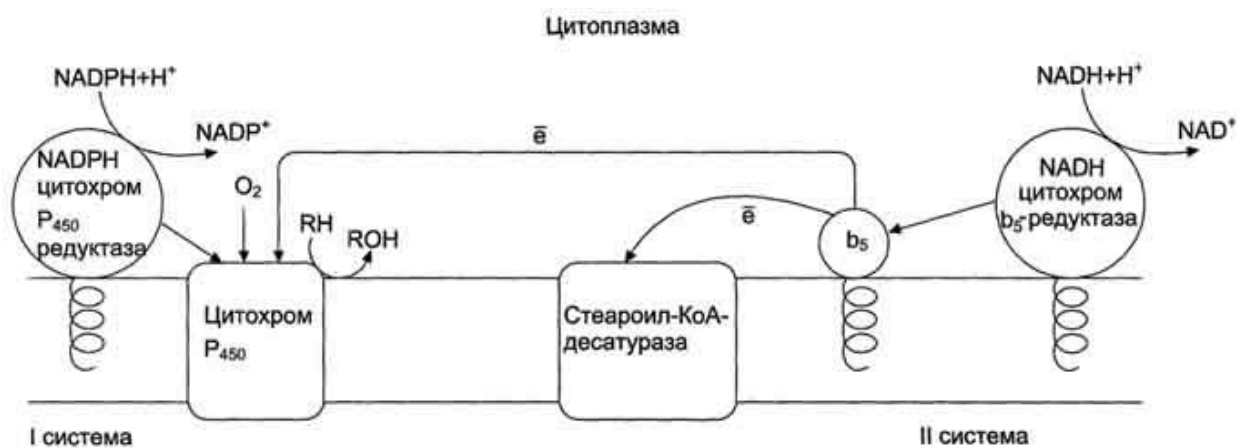
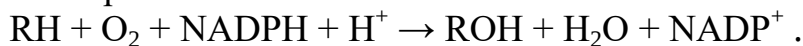


Рис. 1. Электронтранспортные цепи ЭР. RH - субстрат цитохрома P₄₅₀; стрелками показаны реакции переноса электронов. В одной системе NADPH окисляется NADPH цитохром P₄₅₀-редуктазой, которая затем передаёт электроны на целое семейство цитохромов P₄₅₀. Вторая система включает в себя окисление NADH цитохром b₅-редуктазой, электроны переходят на цитохром b₅; восстановленную форму цитохрома b₅ окисляет стеароил-КоА-десатураза, которая переносит электроны на O₂.

Один атом кислорода принимает 2 e и переходит в форму O²⁻. Донором электронов служит NADPH, который окисляется NADPH-цитохром P₄₅₀ редуктазой. O²⁻ взаимодействует с протонами: $O^{2-} + 2H^+ \rightarrow H_2O$, и образуется вода. Второй атом молекулы кислорода включается в субстрат RH, образуя гидроксильную группу вещества R-OH (рис. 2).

Суммарное уравнение реакции гидроксилирования вещества RH ферментами микросомального окисления:



Субстратами P₄₅₀ могут быть многие гидрофобные вещества как экзогенного (лекарственные препараты, ксенобиотики), так и эндогенного (стероиды, жирные кислоты и др.) происхождения.

Таким образом, в результате первой фазы обезвреживания с участием цитохрома P₄₅₀ происходит модификация веществ с образованием функциональных групп, повышающих растворимость гидрофобного соединения. В результате модификации возможна потеря молекулой её биологической активности или даже формирование более активного соединения, чем вещество, из которого оно образовалось.

3. Свойства системы микросомального окисления

Важнейшие свойства ферментов микросомального окисления: широкая субстратная специфичность, которая позволяет обезвреживать самые разнообразные по строению вещества, и регуляция активности по механизму индукции.

Широкая субстратная специфичность. Изоформы P₄₅₀

К настоящему времени описано около 150 генов цитохрома P₄₅₀, кодирующих различные изоформы фермента. Каждая из изоформ P₄₅₀ имеет много субстратов. Этими субстратами могут быть как эндогенные липофильные вещества, модификация которых входит в путь нормального метаболизма

этих соединений, так и гидрофобные ксенобиотики, в том числе лекарства. Определённые изоформы цитохрома

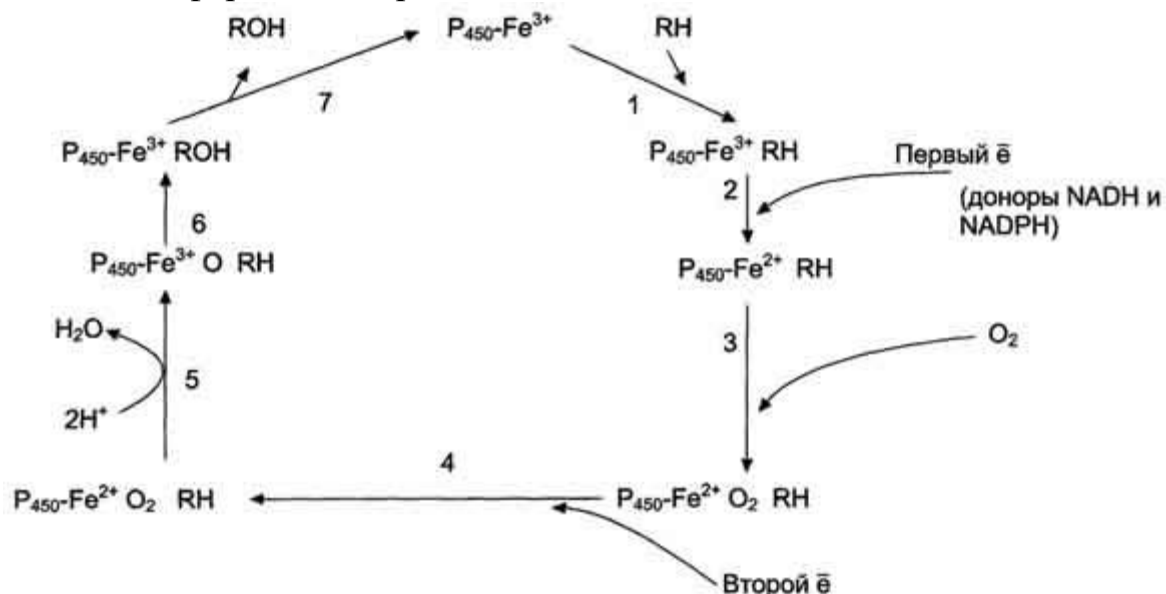


Рис. 2. Транспорт электронов при монооксигеназном окислении с участием P_{450} . Связывание (1) в активном центре цитохрома P_{450} вещества RH активирует восстановление железа в теме - присоединяется первый электрон (2). Изменение валентности железа увеличивает сродство комплекса $P_{450}-Fe^{2+} \cdot RH$ к молекуле кислорода (3). Появление в центре связывания цитохрома P_{450} молекулы O_2 ускоряет присоединение второго электрона и образование комплекса $P_{450}-Fe^{2+}O_2^- \cdot RH$ (4). На следующем этапе (5) Fe^{2+} окисляется, второй электрон присоединяется к молекуле кислорода $P_{450}-Fe^{3+}O_2^{2-}$. Восстановленный атом кислорода (O^{2-}) связывает 2 протона, и образуется 1 молекула воды. Второй атом кислорода идёт на построение OH -группы (6). Модифицированное вещество $R-OH$ отделяется от фермента (7).

P_{450} участвуют в метаболизме низкомолекулярных соединений, таких как этанол и ацетон.

Регуляция активности микросомальной системы окисления

Регуляция активности микросомальной системы осуществляется на уровне транскрипции или посттранскрипционных изменений. Индукция синтеза позволяет увеличить количество ферментов в ответ на поступление или образование в организме веществ, выведение которых невозможно без участия системы микросомального окисления.

В настоящее время описано более 250 химических соединений, вызывающих индукцию микросомальных ферментов. К числу этих индукторов относят барбитураты, полициклические ароматические углеводороды, спирты, кетоны и некоторые стероиды. Несмотря на разнообразие химического строения, все индукторы имеют ряд общих признаков; их относят к числу липофильных соединений, и они служат субстратами для цитохрома P_{450} .

Общие пути катаболизма.

Общие пути катаболизма начинаются с пирувата, который превращается в молекулу ацетил-СоА под действием сложного мультиферментного пируватдегидрогеназного комплекса в митохондриях. Затем молекула аце-

тил-СоА подвергается полному окислению в цикле трикарбоновых кислот, где из двууглеродного фрагмента уксусной кислоты извлекаются 8 электронов. Эти электроны в составе молекул НАДН и ФАДН₂ вовлекаются в процесс окислительного фосфорилирования, где синтезируется АТФ и образуется Н₂О. К **общим путям катаболизма** относят: окислительное декарбоксилирование пировиноградной кислоты, цикл трикарбоновых кислот, окислительное фосфорилирование.

Окислительное декарбоксилирование пировиноградной кислоты
Транспорт пирувата. Поступление пирувата в митохондрии (транспорт пирувата) обеспечивает специальная белковая транспортная система, локализованная во внутренней митохондриальной мембране. Пируват поступает в митохондрии из цитозоля совместно с протонами по механизму сопряженного транспорта. Движущей силой при этом является энергия протонного градиента.

Строение пируватдегидрогеназного комплекса. Пируватдегидрогеназный комплекс состоит из 512 субъединиц объединенных в сложный мультиферментный комплекс. В его состав (рис. 3) входят 3 фермента: пируватдегидрогеназа (Е1), дигидролипоаминацилтрансфераза (Е2) и дигидролипоамиддегидрогеназа (Е3), а также 5 коферментов: тиаминдифосфат (ТДФ), липоевая кислота (связанная через свою карбоксильную группу с ε-аминогруппой лизина, входящего в состав фермента – дигидролипоаминацилтрансферазы, и далее называемая **липоамид**), ФАД, НАД⁺ и СоА. Три кофермента (ТДФ, липоамид и ФАД) ковалентно связаны в активных центрах ферментов Е1, Е2 и Е3 соответственно, а НАД⁺ и СоА выполняют роль вторых субстратов в химических реакциях (мигрирующие коферменты).

Особенностью ферментов и белков комплекса является то, что все ферменты и белковые компоненты мультиферментного комплекса кодируются в ядерной ДНК и синтезируются в цитозоле. После их поступления в митохондриальный матрикс (при этом затрачивается энергия АТФ и протонного градиента) они подвергаются финальному фолдингу с помощью митохондриальных шаперонов, приобретают функциональную активность и объединяются в мультиферментный комплекс.

Последовательность реакций в пируватдегидрогеназном комплексе. В этом комплексе происходит преобразование пирувата в ацетил-СоА, содержащий макроэргическую тиоэфирную связь и удаление из пирувата 2-х электронов в составе молекулы НАДН.

Значение декарбоксилирования пирувата для извлечения энергии из молекулы исключительно велико. Три углеродных атома пирувата имеют разную степень окисления. Углерод метильной группы (**-СН₃**) имеет степень окисления -3 и, следовательно, в дальнейшем при его окислении до СО₂ (С⁺⁴) можно получить 7 электронов. Углерод кето-группы (**>С=О**) окислен значительно (степень окисления +2) при его окислении до СО₂ можно извлечь 2 электрона. А углерод карбоксильной группы окислен почти полностью (+3). Поэтому карбоксильная группа это до некоторой степени балластная часть молекулы с позиции извлечения энергии, окисление этого углерода может-

дать лишь 1 электрон. Удаление карбоксильной группы (т.е. реакцию декарбоксилирования) катализирует фермент пируватдегидрогеназа в активном центре которого локализован тиаминдифосфат – кофермент декарбоксилирования.

1. В активном центре фермента происходит прямое взаимодействие двух атомов углерода с образованием между ними ковалентной связи. Это взаимодействие обусловлено разноименностью зарядов, которыми обладают углерод кето-группы пирувата с одной стороны и атом углерода тиазольного кольца тиаминпирофосфата с другой.

2. На этой стадии E1 (пируватдегидрогеназа) переносит атом водорода и двухуглеродный ацетильный фрагмент ($\text{CH}_3\text{-CO-}$) на молекулу липоевой кислоты, локализованную в активном центре фермента E2 (дигидролипоеацетилтрансферазы). При этом в активном центре фермента образуется ацетилтиоэфир липоамида, а восстановление при этом липоамида способствует извлечению еще 1 электрона (от 2-го углеродного атома пирувата).

3. В этой реакции CoA-SH атакует тиоэфирную связь в активном центре фермента E2, разрывает её и присоединяет к себе двухуглеродный ацетильный фрагмент ($\text{CH}_3\text{-CO-}$). Происходит образование ацетил~CoA, который покидает активный центр фермента E2 (дигидролипоеацетилтрансферазы). При этом оба атома серы липоевой кислоты полностью восстановлены.

4. В этой реакции фермент E3 (дигидролипоеамиддегидрогеназа) катализирует перенос двух атомов водорода с восстановленного липоамида, находящегося в активном центре фермента E2 на кофермент ФАД, локализованный в своём активном центре. При этом в активном центре фермента E3 образуется ФАДН₂.

5. В активный центр дегидрогеназы (E3) пируватдегидрогеназного комплекса входит НАД⁺ и присоединяет к себе 2 электрона и протон от кофермента ФАДН₂ и в форме НАДН переносит их в процесс окислительного фосфорилирования.

Связь окислительного декарбоксилирования пирувата с процессом окислительного фосфорилирования.

При превращении пирувата в ацетил-CoA происходит образование НАДН, транспортирующего электроны в дыхательную цепь. Пара электронов в процессе окислительного фосфорилирования может участвовать в синтезе АТФ с образованием до 2,5 моль АТФ на 2 моль электронов. Усиление распада АТФ в клетке ведет к повышению концентрации АДФ и ускорению окисления НАДН в дыхательной цепи. Повышение концентрации НАД⁺, в свою очередь, стимулирует окислительное декарбоксилирование пирувата. Напротив, повышение концентрации АТФ и НАДН снижает скорость этого процесса.

Таким образом, изменения отношений АДФ/АТФ и НАДН/НАД⁺ - важнейшие внутриклеточные регуляторные сигналы, отражающие энергетические потребности клетки и регулирующие скорость окислительного декарбоксилирования пирувата. Каталитическая активность пируватдегидроге

назного комплекса снижается, когда в клетках имеется достаточно – топлива в виде жирных кислот и ацетил~СоА.

Регуляция пируватдегидрогеназного комплекса (ПДК).

Регуляция пируватдегидрогеназного комплекса (ПДК) имеет важное значение для обеспечения цикла трикарбоновых кислот - топливными молекулами ацетил-СоА. Точная регуляция этого комплекса имеет важное значение в связи с невозможностью обратного преобразования ацетил-СоА в пируват, т.к. ферменты, необходимые для этого в организме человека отсутствуют.

Активность ПДК регулируется различными способами: доступностью субстратов, ингибированием продуктами реакции, аллостерическим путём, путём ковалентной модификации.

Активность пируватдегидрогеназного комплекса увеличивается при повышении концентрации АДФ, внутриклеточного кальция, под влиянием гормонов: инсулина и адреналина.

При повышении концентрации АДФ ПДК находится в нефосфорилированной активной форме. Этот эффект усиливается при повышении концентрации внутриклеточного кальция, который активирует фосфатазу ПДК. Такой механизм активации ПДК особенно важен в мышцах и жировой ткани. Активация ПДК происходит также под влиянием инсулина. Один из эффектов инсулина – повышение концентрации внутримитохондриального кальция, это приводит к активированию ПДК. В клетках миокарда ПДК активируется адреналином.

Регуляция активности пируватдегидрогеназного комплекса.

Ковалентная модификация:	Осуществляется фосфорилированием и дефосфорилированием. В состав ПДК входят 2 регуляторных субъединицы: киназа ПДК - фосфорилирует ферменты комплекса и инактивирует ПДК; а фосфатаза - дефосфорилирует ферменты, превращая ферментативный комплекс в активную форму.
Ингибирование продуктами реакции:	Продукты пируватдегидрогеназной реакции аллостерически активируют киназу ПДК. Активированная киназа фосфорилирует и инактивирует ферменты комплекса. Таким образом, при накоплении НАДН и ацетил-СоА тормозится превращение пирувата в ацетил-СоА. Так, например, в печени при голодании: - из жирового депо в печень поступают жирные кислоты, из которых образуется ацетил-СоА; - в присутствии высокомолекулярных жирных кислот ингибирование ПДК усиливается. Пируват при этом не окисляется и может быть использован для синтеза глюкозы (в процессе глюконеогенеза).
Аллостерический	Пируват аллостерически активирует нефосфорилиро-

путь:	ванную форму ПДК, действуя согласно с другими субстратами НАД ⁺ и СоА.
-------	---

Гликолиз.

Гликолиз (от греч. *glycys* – сладкий и *lysis* – распад) – процесс окисления глюкозы, в результате которого происходит расщепление глюкозы с образованием 2 молекул пирувата (аэробный гликолиз) или 2 молекул лактата (анаэробный гликолиз). При аэробных условиях пируват проникает в митохондрии, где полностью окисляется до CO_2 и H_2O . Если содержание кислорода недостаточно, как это может иметь место в активно сокращающейся мышце, пируват превращается в лактат. Гликолиз – один из центральных путей катаболизма глюкозы не только в животных и растительных клетках, но также у многих микроорганизмов. Биологическое значение гликолиза состоит в том, что это основной путь расщепления глюкозы до конечных продуктов CO_2 и H_2O . Именно этот путь предоставляет клетке преобладающую долю АТФ – до 60–70 % при обычном пищевом рационе человека. Все десять реакций гликолиза протекают в цитозоле клетки и характерны для всех органов и тканей.

При аэробных условиях пируват проникает в митохондрии, где полностью окисляется до CO_2 и H_2O . Если содержание кислорода недостаточно, как это может иметь место в активно сокращающейся мышце, пируват превращается в лактат.

Подводя итог рассмотрению химизма процесса гликолиза, остановимся еще раз на его основных особенностях.

1. В гликолизе независимо от того, протекает он по анаэробному или аэробному пути, можно выделить два основных этапа. Реакции 1–5 составляют первый этап гликолиза, суть которого – превращение стабильной молекулы глюкозы в две молекулы более реакционноспособного фосфоглицеральдегида. На этом этапе гликолиза расходуются две молекулы АТФ.

Второй этап гликолиза включает реакции, приводящие к превращению фосфоглицеральдегида в пируват или лактат (соответственно реакции 6–10 или 6–11).

Эти реакции связаны с синтезом АТФ.

2. Большинство гликолитических реакций обратимо, за исключением трех (реакции 1, 3 и 10);

3. Все промежуточные соединения находятся в фосфорилированной форме. Источником фосфатной группы в реакциях фосфорилирования являются АТФ (реакции 1, 3) или H_3PO_4 (реакция 6);

4. Регенерация НАД⁺, необходимого для окисления новых молекул фосфоглицеральдегида, происходит при аэробном гликолизе посредством дыхательной цепи.

При этом водород транспортируется из цитозоля в митохондрии с помощью челночного механизма. При анаэробном гликолизе НАД⁺ регенериру-

ется в реакции восстановления пирувата в лактат, сопряженного с окислением НАДН₂.

5. Образование АТФ при гликолизе может идти двумя путями: либо субстратным фосфорилированием, когда для образования АТФ из АДФ и Н₃РО₄ используется энергия макроэргической связи субстрата (реакции 7, 9), либо путем окислительного фосфорилирования за счет энергии переноса электронов и протонов в дыхательной цепи.

ТЕМА: ЦИТОКИНЫ, ИШЕМИЯ И РЕПЕРФУЗИЯ: КЛИНИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ.

Основные вопросы темы.

- 1) Нейтрофильные гранулоциты, моноциты и макрофаги
- 2) Группы хемотаксических веществ (факторы хемотаксиса для нейтрофилов, моноцитов/макрофагов)
- 3) Основные молекулы клеточных мембран, удерживающие клетки воспаления
- 4) Признаки активации нейтрофилов
- 5) Антимикробные белки и ферменты нейтрофилов, моноцитов и макрофагов
- 6) Роль эндотелиальных клеток в развитии воспалительной реакции
- 7) Фактор фон Виллебранта (фФВ)
- 8) Цитокины. Метаболиты арахидоновой кислоты
- 9) Синдром септического шока
- 10) Ишемия и реперфузия. Гипотезы развития (свободнорадикальная гипотеза; гипотеза повреждения, связанная с перегрузкой Ca^{2+} ; гипотеза) повреждения в связи с потерей фосфолипидов из сарколеммы

Актуальность темы.

Цитокины (ЦК) – это продуцируемые клетками белково-пептидные факторы, осуществляющие коротко-дистантную регуляцию межклеточных и межсистемных взаимодействий. Цитокины определяют выживаемость клеток, стимуляцию или ингибирование их роста, дифференцировку, функциональную активацию и апоптоз клеток. Способность регулировать перечисленные функции обусловлена тем, что после взаимодействия цитокинов с комплементарными рецепторами на поверхности клеток, сигнал через элементы внутриклеточной трансдукции передается в ядро, где активируются соответствующие гены.

Белки, продукты активированных цитокинами генов, синтезируются клетками и регулируют перечисленные выше процессы.

Цитокины (ЦК) – гормоноподобные молекулы, действие которых на клетку-мишень опосредуется высокоспецифичными высокоаффинными мембранными рецепторами.

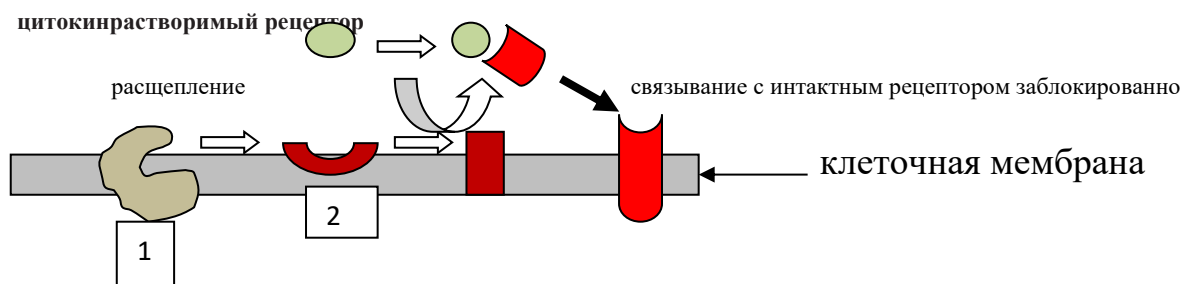


Рис. Растворимые рецепторы для цитокинов.

1 – фермент клеточной поверхности; 2 – цитокиновый рецептор

Все рецепторы ЦК представляют собой трансмембранные гликопротеины, у которых внеклеточная часть отвечает за связывание ЦК. Как правило, эти рецепторы состоят более чем из одной субъединицы, причем высокоаффинное связывание является следствием взаимодействия с разными субъединицами, каждая из которых сама способна связывать соответствующий ЦК, но с более низкой аффинностью. Одни субъединицы рецепторов реагируют только с определенным ЦК, в то время как другие способны формировать общие рецепторы для разных ЦК. Наличие общих структур в рецепторах может обуславливать функциональное сходство ряда ЦК. Кроме того, существуют общие групповые рецепторы, способствующие устранению избытка ЦК в очаге поражения. Синтез рецепторов протекает более интенсивно и длительно, чем синтез соответствующих ЦК, что обуславливает их более полную и быструю элиминацию из сосудистого русла и реализацию биологического эффекта в очаге поражения. Растворимый рецептор, связывающийся с ЦК, – это отщепленный ферментом внеклеточный домен мембранного рецептора. Растворимые рецепторы сохраняют высокую аффинность в отношении своих лигандов и благодаря этому способны нейтрализовать ЦК, препятствуя их доступу к интактным мембранным рецепторам; их можно обнаружить в сыворотке и моче. Растворимые рецепторы могут выполнять функции конкурирующих антагонистов, а также участвовать в транспорте, доставке ЦК в очаг поражения и выведении их из организма. В результате взаимодействия ЦК с рецептором инициируется сигнал, передача которого в клетку обычно происходит либо по пути с участием янус-киназы (JAK)-STAT, либо по пути с участием киназы Ras-MAP.

В отличие от классических гормонов большинство ЦК является молекулами локального (паракринного) действия. Они продуцируются и утилизируются клетками, находящимися в тесной близости. Возможно и аутокринное действие ЦК, т.е. действие на ту же клетку, которая секретировала данный ЦК. После выделения клетками-продуцентами ЦК имеют короткий период полувыведения из кровотока. Выведение катаболизированных ЦК из организма осуществляется печенью и почками. Несмотря на короткий период жизни ЦК, в сыворотках даже здоровых доноров иногда определяются их низкие уровни. Секреция ЦК – краткосрочный процесс. Кодированная ЦК мРНК нестабильна, что в сочетании с краткосрочностью транскрипции генов ЦК приводит к непродолжительности их биосинтеза.

К системе ЦК в настоящее время относят около 300 индивидуальных полипептидных веществ. Среди всех известных к настоящему времени секретруемых клетками регуляторных факторов две группы ЦК являются наиболее хорошо изученными и, в связи с этим, наиболее часто используемыми в диагностических целях. Это факторы роста и ЦК иммунной системы (ИС). ЦК ИС характеризуются следующими общими свойствами:

- синтезируются в процессе реализации механизмов естественного или специфического иммунитета;
- проявляют свою активность при очень низких концентрациях (порядка 10^{-11} М/л);
- служат медиаторами иммунной и воспалительной реакций и обладают аутокринной, паракринной и эндокринной активностью;
- обладают плеiotропной (полифункциональной) активностью, т.е. один ЦК оказывает влияние на различные процессы;
- характеризуются последовательностью осуществления эффектов: один ЦК способен индуцировать продукцию другого ЦК или экспрессию его рецепторов; наблюдается также синергизм и антагонизм действия различных ЦК.

Классификация ЦК может проводиться по их биохимическим и биологическим свойствам, а также по типам рецепторов. В зависимости от того, какие клетки ИС преимущественно синтезируют тот или иной ЦК, различают интерлейкины (IL), монокины или лимфокины. В настоящее время 37 интерлейкинов имеют цифровые обозначения (IL-1-37), остальные ЦК буквенные: CSF (колониестимулирующие факторы), OSM (онкостатин М), LIF (фактор, ингибирующий лейкозные клетки), TGF (трансформирующие факторы роста), CNTF (цилиарный нейротрофический фактор), TNF (фактор некроза опухолей), интерфероны (IFN) и т.д. По механизму действия ЦК ИС можно условно подразделить на следующие группы:

1. провоспалительные ЦК (IL-1, IL-6, IL-12, $\text{TNF}\alpha$, $\text{IFN}\alpha$, $\text{IFN}\beta$, $\text{IFN}\gamma$, хемокины – IL-8, MCP-1, RANTES и др.) продуцируются и действуют на иммуокомпетентные клетки, инициируя воспалительный ответ. Многие авторы отмечают, что высокий уровень этих ЦК является отражением активности и тяжести патологического процесса.
2. Противовоспалительные ЦК (IL-4, IL-10, $\text{TGF}\beta$ и др.), регулирующие специфические иммунные реакции ограничивающие развитие воспаления.
3. Регуляторы клеточного и гуморального иммунитета (естественного или специфического), обладающие собственными эффекторными функциями (противовирусными, цитотоксическими).

Спектры биологических активностей ЦК ИС в значительной степени перекрываются: один и тот же процесс может стимулироваться в клетке более чем одним ЦК. Во многих случаях в действиях ЦК наблюдается синергизм. Антигенная (АГ) стимуляция приводит к секреции ЦК «первого поколения» – IL-1 и -6, $\text{TNF}\alpha$, которые индуцируют биосинтез центрального регуляторного ЦК: IL-2, а также IL-3-5, $\text{INF}\gamma$ и др. В свою очередь, ЦК «второго поколения» влияют на биосинтез ранних. Такой принцип действия позволяет не только регулировать иммунный ответ, но и амплифицировать его, вовлекая в реакцию все возрастающее число клеток. IL-2 появляется в цитоплазме Т-клеток через 2 ч после стимуляции; IL-4 через 4 ч, IL-10 через 6 ч, IL-9 через 24 ч. Пик выработки различных лимфокинов варьирует: 12 ч для IL-2, 48 ч для IL-4 и IL-5, 72 ч для IL-9 и $\text{INF}\gamma$.

Действие ЦК тесно связано с физиологическими и патофизиологическими реакциями организма. При этом происходит модуляция как локальных, так и системных механизмов защиты. Одной из важнейших функций системы ЦК является обеспечение согласованного действия иммунной, эндокринной и нервной системы в ответ на стресс. Усиление продукции определенных ЦК воспаления или факторов, стимулирующих рост лимфоцитов, может лежать в основе некоторых заболеваний. В то же время снижение уровня ряда ЦК также способно провоцировать заболевание. Так, CSF играет ведущую роль в нормальном гемопоэзе, и уменьшение его продукции нарушает механизмы защиты против инфекций.

Поскольку ЦК являются локальными медиаторами, более целесообразно измерять их уровни в соответствующих тканях после экстракции тканевых протеинов или в естественных жидкостях, например, в слезе, слюне, моче, спинномозговой жидкости и т.д. Уровни ЦК в сыворотке или других биологических жидкостях отражают текущее состояние работы иммунной системы, т.е. их синтез клетками *in vivo*. В норме в крови ЦК ИС не определяются. Выявление ЦК обычно отражает наличие воспаления. Определение уровней продукции ЦК мононуклеарами периферической крови (МПК) *in vitro* показывает функциональное состояние этих клеток. Спонтанная продукция ЦК МПК в культуре свидетельствует, что они уже активированы *in vivo*. Индуцированный (различными стимуляторами, митогенами) синтез ЦК отражает потенциальную, резервную способность клеток отвечать на АГ-стимул (в частности, на действие лекарственных препаратов). Сниженная индуцированная продукция ЦК *in vitro* может служить одним из признаков иммунодефицитного состояния.

При оценке уровней ЦК необходимо помнить, что они являются АГ-неспецифическими факторами. Поэтому специфическая диагностика инфекционных, аутоиммунных и аллергических заболеваний с помощью определения уровня тех или иных ЦК невозможна. Тем не менее, изучение уровней ЦК позволяет получить информацию о функциональной активности различных типов иммунокомпетентных клеток; о тяжести воспалительного процесса, его переходе на системный уровень и прогнозе; о соотношении процессов активации Тх1 и 2, что очень важно при дифференциальной диагностике ряда инфекционных и иммунопатологических процессов; о стадии развития ряда аллергических и аутоиммунных заболеваний. Кроме того, определение уровней ЦК используется при применении новых иммуномодулирующих препаратов на основе рекомбинантных ЦК и их антагонистов для изучения фармакокинетики этих препаратов, а также их способности индуцировать синтез других ЦК.

Однако необходимо учитывать то обстоятельство, что биологические эффекты многих ЦК, в частности IL, имеют высокую степень идентичности, которая создает достаточно широкие возможности для компенсации недостаточности или дефицита одних медиаторов другими, а также то, что многие ЦК способны взаимодействовать со структурами одних и тех же рецепторных комплексов. Именно это обстоятельство объясняет нередко от-

сутствие корреляции между содержанием тех или иных ЦК и клиническими особенностями течения патологического процесса. В равной степени это относится и к возможному отсутствию корреляции между уровнями ЦК и эффективностью терапии. Становится все более очевидным, что ориентация только на уже хорошо известные ЦК может не отражать истинного состояния цитокиновой регуляции, особенно если учесть, что в подавляющем большинстве случаев определение ЦК ограничено лишь несколькими из них.

Цитокины субпопуляций CD4+ Т-клеток

Популяцию Т-хелперов (Тх) можно разделить на различные субпопуляции в зависимости от секретируемых ими ЦК. Тх0 секретируют IL-2-5, INF-γ, CSF-GM и способны дифференцироваться в Тх1 или Тх2. Тх1 участвуют в процессах клеточного иммунитета, активируют макрофаги, продуцируют IL-2 и -3, INF-γ и CSF-GM. Тх2 способствуют синтезу антител (АТ) В-клетками, секретируют IL-4-6, IL-10, IL-13. ЦК, продуцируемые Тх1 и Тх2.

В зависимости от того, с какими клетками взаимодействует АГ на ранней стадии иммунного ответа – с макрофагами, продуцирующими IL-12, или с Т-клетками, секретирующими IL-4, – определяется характер ответа: Тх1 или Тх2. Нарушение баланса ЦК-продуцирующей активности Тх1 и Тх2 играет значительную роль в развитии аутоиммунных состояний, хронизации и прогрессировании воспалительных заболеваний. Например, если при инфекциях, вызванных внутриклеточными микроорганизмами и вирусами, произойдет переключение клеточного иммунитета на гуморальный, то будет наблюдаться осложнение течения.

Цитокины и иммунный ответ при инфекционных заболеваниях

При попадании микроорганизмов активируется альтернативный путь активации системы комплемента. Нейтрофилы и макрофаги, удаляют патогены с помощью фагоцитоза. В месте инфекции секретируются медиаторы воспаления, которые локально активируют экспрессию молекул адгезии (ICAM-1, VCAM-1, Е-селектина и L-селектина) кровеносных сосудов и обеспечивают адгезию и плотное связывание нейтрофилов и активированного эндотелия. В ответ на действие таких хемоаттрактантов, как IL-8 и MIP-1α, нейтрофилы проникают в пространство между эндотелиальными клетками сосудов (диapedез). Хемоаттрактанты формируют в ткани градиент концентрации. Активированные нейтрофилы мигрируют вдоль этого градиента до места инфекции, где они разрушают патоген.

Некоторые макрофаги, называемые резидентными или фиксированными, постоянно находятся в тканях, другие мигрируют из кровотока. Активация различными медиаторами способствует уничтожению патогенов макрофагами. INF-γ, продуцируемый NK-клетками, повышает экспрессию молекул II класса главного комплекса гистосовместимости (ГКГС) на поверхности клеток, усиливает фагоцитоз и механизмы уничтожения. Молекулы патогенов, такие как липопо- лисахариды (ЛПС), в больших количествах присутствующие на поверхности грамотрицательных

бактерий, вызывают гиперактивацию макрофагов, приводящую к секреции провоспалительных ЦК – IL-1, IL-6 и TNF- α , и усилению фагоцитоза.

При репликации вируса в клетке, двуспиральная вирусная РНК индуцирует продукцию IFN- α и - β . Эти ЦК оказывают различные эффекты на продукцию IFN- γ и вызывают прекращение синтеза белка в инфицированной клетке, тем самым не допуская продукцию вирусных белков. IFN- α и - β способствуют активации NK-клеток, разрушающих инфицированные клетки с помощью специальных белков, таких как перфорин и протеазы гранзимы. При секреции в непосредственной близости от инфицированной клетки, перфорин образует поры в ее мембране, сквозь которые гранзимы попадают в клетку и индуцируют апоптоз. Это происходит путем расщепления каспаз, в особенности каспазы-3, которая, в свою очередь, активирует ДН-Казу. Этот фермент вызывает деградацию ДНК, индуцирующую апоптотические каскады. Гранзим В также расщепляет внутриклеточный белок Bid, под действием которого белки Bax и Bak повышают проницаемость митохондриальной мембраны. Это приводит к выходу цитохрома С и образованию каспазы-9.

Цитокины и приобретенный иммунитет

Если активности врожденного иммунитета не достаточно для элиминирования патогена, АГ-презентирующие клетки (АПК), особенно дендритные, захватывают патоген и мигрируют к периферическим лимфоидным тканям, где активируют лимфоциты и иницируют адаптивный иммунный ответ. Важным этапом активации Т-клеток является индукция экспрессии белков клеточной поверхности, известных как костимуляторные лиганды и молекулы. К таковым относятся B7.1/CD80 и B7.2/CD86. Некоторые внутриклеточные патогены могут индуцировать секрецию IL-12 дендритными клетками и макрофагами. IL-12 способствует активации Th1, которые, в свою очередь, продуцируют IL-2, IFN- γ и TNF- β , активируют цитотоксические Т-клетки и макрофаги, играя важную роль в иммунном ответе на вирусную и другую внутриклеточную инфекцию. Th1 также секретируют IL-3 и GM-CSF, стимулируя костный мозг к продукции большого количества лейкоцитов.

С другой стороны, активированные IL-4 Th2, секретируют IL-4-6, IL-10 и IL-13, которые стимулируют продукцию АТ В-клетками. АТ и активированные лимфоциты мигрируют к месту инфекции для элиминации патогена. Они нейтрализуют токсины и опсонизируют АГ для облегчения фагоцитоза. Th активируют макрофаги, повышая эффективность разрушения фагоцитированных патогенов, особенно тех, которые устойчивы к деградации в фаголизосомах.

Цитокины и воспаление

Механизм процесса воспаления состоит из нескольких этапов. На третьем, заключительном этапе на поверхности эндотелиальных клеток, на внутренней стенке капилляров, активируются молекулы адгезии (Е-и L-селектины, ICAM-1, VCAM-1). Через соответствующие молекулы лейкоциты прикрепляются к эндотелию и проскальзывают между клетками. Этот процесс называется диапедез. Эти события запускаются и усиливаются большим

количеством медиаторов воспаления. Активированные макрофаги и лейкоциты секретируют провоспалительные ЦК, такие как TNF- α , IL-6, IL-1, хемокины (IL-8). Эти ЦК циркулируют в кровотоке и стимулируют секрецию белков острой фазы, например, С-реактивного белка (СРБ, CRP). В норме воспаление очень тонко регулируется ЦК, проявляющими как провоспалительные свойства (IFN- γ , IL-12), так и действующими как отрицательные регуляторы, ингибируя воспаление (IL-10). Эта точная регуляция очень важна для предотвращения обширного разрушения ткани. Если агент, вызвавший воспаление, не удаляется, то воспалительный процесс продолжается, становится хроническим, приводя к значительному разрушению ткани. К воспалительным заболеваниям относятся ревматоидный артрит (РА), рассеянный склероз, воспалительные заболевания кишечника, псориаз, астма и др. Тяжелые системные инфекции могут приводить к развитию синдрома острой дыхательной недостаточности (ARDS), шоку, полиорганной недостаточности. Такой избыточный воспалительный ответ является синдромом системной воспалительной реакции (ССВР).

Цитокины и сердечно-сосудистые заболевания

IL-6, так же как IL-1, инициирует синтез белков острой фазы. Повышение уровней IL-1 и -6 ассоциируется с повторными коронарными событиями у больных ИБС. В ряде многочисленных исследований показано, что повышенный уровень IL-6 имеет более важное прогностическое значение по сравнению с hsCRP для развития сердечно-сосудистой смерти и других кардиоваскулярных осложнений. У больных ОКС отмечалось достоверное повышение уровней IL-1, -4 и -10 по сравнению со здоровыми лицами. Обнаружено существенное повышение уровней IL-2, -4, -6, -12 и -18 у больных ИБС по сравнению со здоровыми лицами, причем уровень IL-6 был еще выше у пациентов с ИМ. TNF α обладает в основном иммуномодулирующим и провоспалительным действием. Концентрация циркулирующего TNF α обычно очень низка, однако резко возрастает (максимум за 1,5 часа) при возникновении острой ситуации. Определение уровней TNF α и IL-6 играет немаловажную роль в диагностике застойной сердечной недостаточности.

Цитокины и аутоиммунные заболевания (АИЗ)

Главным в возникновении и развитии АИЗ является распознавание собственных структур организма иммунокомпетентными клетками и их последующая активация, пролиферация и индукция воспаления. Большая часть лимфоцитов, направленных к собственным АГ, удаляются в тимусе в результате апоптоза, но некоторые избегают этого процесса и находятся в периферической лимфатической ткани. В большинстве случаев они остаются наивными, неактивированными. Однако если подходящий собственный АГ будет представлен специфической АПК, может начаться аутоагрессивная реакция. При презентации АГ, в том числе и собственного в качестве вторичного сигнала принимают участие так называемые костимуляторные молекулы – CD27, 28 и 30. Участие костимуляторных молекул подтверждается обнаружением повышенного уровня растворимого CD28 (sCD28) в крови

пациентов с болезнью Бехчета. При болезни Грейвса появление аутоАТ ассоциировано с повышенной продукцией растворимого CD30.

Существуют данные, что развитию АИЗ, таких как рассеянный склероз, сахарный диабет I типа и др., способствуют T_H1, и что в некоторых случаях снижение их ответа или переключение ответа на T_H2 может ослабить заболевание. Однако известно множество исключений: данные о противоречивых эффектах IFN- γ (цитокина T_H1) или о АИЗ, индуцированных T_H2. Результаты измерений уровней хемокинов еще более усложняют картину, т.к. при многих АИЗ одновременно увеличены и T_H1 (MIG/CXCL9), и T_H2 (TARC/CCL17 и MDC/CCL22) хемотаксические факторы.

Принято считать, что ЦК, особенно TNF- α и IFN- α/β , являются необходимыми элементами развития АИЗ. Определение TNF- α в патогенезе РА и терапия антагонистами этого ЦК с успехом используется в иммунотерапии. IFN- α/β играют основную роль при системной красной волчанке (СКВ). Многие белки семейств TNF и его рецептора проявляют провоспалительные свойства в процессе активации иммунитета и участвуют в патогенных эффектах, наблюдаемых при АИЗ.

Белки семейства TNF-R, такие, как TNF-RI и II, CD134 (OX40) и CD137 (4-1BB) или их лиганды могут быть мишенями различных агентов, которые были специально разработаны для снижения клинических проявлений АИЗ. Данные доклинических исследований, особенно с использованием TNF-блокады, способствовали проведению клинических испытаний у пациентов с рассеянным склерозом и РА.

Ишемия и реперфузия. Гипотезы развития (свободнорадикальная гипотеза; гипотеза повреждения, связанная с перегрузкой Ca²⁺; гипотеза) повреждения в связи с потерей фосфолипидов из сарколеммы

Неполное понимание тонких механизмов ишемического повреждения, отсутствия надёжных клинических критериев оценки особенностей ишемии и реперфузии и отсутствие эффективного лечения являются одними из основных вызовов для клиницистов и исследователей при изучении постишемического реперфузионного повреждения головного мозга. Тем не менее, несколько десятилетий постоянно продолжающихся исследований увенчались определённым успехом, что позволило предложить конкретные направления лечения. В то же время, поиск более эффективных методов оценки и более глубокого понимания молекулярных и клеточных ответов на реперфузию по-прежнему остаётся важным. В этом смысле, ГЛТ только приотворяет дверь для изучения пока ещё неизвестных механизмов повреждения головного мозга при ИИ и при реперфузии. Дальнейшее изучение многообразных каскадных механизмов ишемического реперфузионного повреждения будет способствовать значительному улучшению лечения инсульта.

Церебральный инсульт (ЦИ) является второй по частоте причиной смерти в мире. Предполагается, что в ближайшие 20 лет вследствие старения населения частота ЦИ увеличится. Церебральный инсульт может быть гемор-

рагическим или ишемическим, при этом большинство инсультов происходит вследствие нарушения поступления крови в определённый участок головного мозга. Тромболитическая терапия (ТЛТ) тканевым активатором плазминогена (tPA) и возможно механическое удаление тромба для восстановления кровотока являются эффективными направлениями лечения ишемического инсульта (ИИ), уменьшающими размеры инфаркта и улучшающими клинический исход. Однако, реканализация не является абсолютно безопасной, и после реперфузионное кровоизлияние является доказанным фактором риска ТЛТ или тромбоэкстракции, и его развитие более чем нивелирует положительный эффект тромболизиса. Механизм трансформации ишемического очага в геморрагический очаг может быть связан с повреждением нескольких структурных элементов ГЭБа. В дополнение к кровоизлиянию у части пациентов, несмотря на восстановление церебрального кровотока после успешной медикаментозной или механической реканализации, не наблюдается клинического улучшения. Отсутствие улучшения или даже ухудшение и составляет парадоксальный отрицательный эффект реперфузии, который может быть обозначен как реперфузионное повреждение. Реперфузионное повреждение рассматривается как биохимический каскад, приводящий к дальнейшему повреждению ишемизированной области головного мозга, протекающий одновременно с реканализацией и нивелирующий её положительные эффекты. Геморрагическая трансформация также может рассматриваться как вариант реперфузионного повреждения, но механизмы развития этих двух синдромов могут различаться, и ещё полностью не ясны.

Реканализация и реперфузия

Реканализация определяется как восстановление проходимости и кровотока в окклюзированной артерии, в то время как реперфузия определяется как восстановление кровотока в микроциркуляторном русле артерии, в которой восстановлены проходимость и кровоток. Полная реканализация не всегда сопровождается реперфузией, состояние, которое называется как «явление не восстановленного кровотока». Проиллюстрировать различия между реканализацией и реперфузией можно на примерах клинических наблюдений с разным исходом после ТЛТ tPA. У части больных (24,8-27,0%) через 24 часа после ТЛТ tPA было отмечено улучшение состояния по шкале инсульта Национального института здоровья (NIHSS) более чем на 10 баллов. В противоположность, Christou и соавт. отметили, что у 32% больных, которые получили в/в ТЛТ tPA, и у которых реканализация была подтверждена транскраниальной доплерографией (ТКД), не было улучшения неврологической симптоматики, а у 15% больных с восстановленной проходимостью артерии отмечалось ухудшение по шкале NIHSS на 4 балла и более. В этих наблюдениях несоответствие между реканализацией и клиническим исходом может быть обусловлено неполной реперфузией, то есть не восстановлением микроциркуляции, несмотря на реканализацию. Прямое свидетельство о нарушении реперфузии было получено в клинических исследованиях с использованием КТ или МРТ, в которых оценивалась состояние сосуда и реперфузии. В исследовании, в котором при помощи МРТ с эхопланарным режимом, изучались особенности реканализации церебральных артерий после ТЛТ, при выполнении ангиографии и МРТ перфузии в динамике, у 13 из 18 больных была отмечена реканализация после в/в ТЛТ tPA, при этом в 4 из 13 случаев реперфузия не наблюдалась. В экспериментальных

исследованиях с использованием углеродных и флуоресцент-ных внутрисосудистых меток было показано, что, несмотря на реканализацию средней мозговой артерии, реперфузия не восстанавливалась. Возможные механизмы ухудшения реперфузии могут включать сужение капиллярного русла, сдавление извне просвета сосуда набухшими отростками астроцитов, внутрисосудистые скопления эритроцитов, лейкоцитов и тромбоцитов. Кроме этого, значение имеет повышение проницаемости ГЭБа, что приводит к активации тканевого фактора с отложением фибрина и окклюзией микроциркуляторного русла и продолжающееся сокращение перicytов, несмотря на восстановление проходимости и кровотока в артерии. На рис. 1 приведены возможные ключевые механизмы, приводящие к нарушению реперфузии.

Основные события при ишемии головного мозга и реперфузии

Несмотря на то, что до сих пор основные пути и механизмы, приводящие к развитию ишемического каскада и инфаркта головного мозга, не вполне ясны, можно отметить, что многие звенья ишемического каскада вносят вклад в нарушение реперфузии. Несколько ключевых наблюдений, сделанных во время ишемии и реперфузии, позволили пролить свет на сложные патофизиохимические процессы, включающие параллельно протекающие множественные, не зависящие друг от друга реакции с прямой и обратной связью и взаимным влиянием. Ишемия, развиваясь по времени первой, приводит к быстрой утрате высокоэнергетических веществ, в первую очередь аденозинтрифосфата (АТФ), что сопровождается деполяризацией мембран клеток, внутриклеточным накоплением кальция и липолизом. Во время ишемии большое количество липолитических продуктов превращения находится в неактивном состоянии. Однако, при реперфузии из них образуется субстрат для реакций с кислородом, что приводит к избыточному образованию активных форм кислорода – АФК. Также на очень ранних этапах ишемии и реперфузии приводят к появлению морфологических изменений нейронов с образованием микровакуолей в цитозоле. Микровакуоли возникают уже через 15 минут после реперфузии в особо уязвимых нейронах (пирамидные клетки области СА₁ гиппокампа, пирамидные клетки 3 и 5 слоев коры и клетки Пуркинье). Позднее, во время постишемической реперфузии в поврежденных нейронах значительно снижается синтез белков. В последующем, на протяжении часов и дней, нарушение ГЭБа, цитотоксичность и воспалительная реакция суммируясь могут приводить к геморрагической трансформации в зоне ишемического повреждения.

На ранних этапах ишемического процесса также наблюдается избыточное высвобождение возбуждающих нейротрансмиттеров. Деполяризация и вход ионов Са²⁺ в клетку, вызванные ишемическим процессом, приводят к высвобождению больших количеств эксайтотоксического нейротрансмиттера – глутамата. В дополнение, арахидоновая кислота и продукты перекисного окисления липидов препятствуют обратному захвату глутамата. В связи с тем, что сразу после развития ишемии происходит значительное увеличение содержания эксайтотоксичных нейротрансмиттеров, связанное, в основном, с нарушением их энергозависимого обратного захвата, было предположено, что антагонисты глутаматных рецепторов могут оказывать защитное действие при ишемическом инсульте. В доклинических условиях было показано, что антагонисты AMPA и NMDA уменьшали повреждение нервных клеток после ише-

мического процесса, однако в клинических исследованиях их защитное действие не было подтверждено. Важным является то, что во время реперфузии не было показано стойкого повышения уровня внеклеточного глутамата. Более чем 10-ти летний опыт экспериментальных и клинических исследований антагонистов глутамата позволяет отметить, что:

(1) эффективное применение антагонистов глутамата, при котором они смогут влиять на клинический исход, является делом будущего, и

(2) реперфузия, вероятно, уменьшает избыточное содержание эксайтотоксинов, тем самым делая применение антагонистов глутамата после реперфузии спорным. В то же время, имеется достаточно доказательств, что избыток эксайтотоксических продуктов непосредственно и сильно влияет на избыточное образование АФК во время реперфузии.

Окислительный стресс

Митохондрии являются важными органеллами клетки, регулирующими энергетический метаболизм для поддержания очень высоких энергетических потребностей клеток головного мозга. При обычных физиологических условиях митохондрии постоянно вырабатывают АФК, включая супероксидные анионы и перекись водорода (H_2O_2), которые затем нейтрализуются супероксиддисмутазой (СОД), глутатион пероксидазой (ГП), каталазой и другими антиоксидантами, имеющими молекулу малых размеров, включая глутатион (ГЛ), аскорбиновую кислоту и альфа-токоферол. Во время реперфузии после ишемии в митохондриях образуется избыточное количество АФК, что приводит к быстрому истощению эндогенных антиоксидантных резервов. Избыток АФК непосредственно приводит к окислительному повреждению таких внутриклеточных макромолекул, как белки, нуклеиновые кислоты и липиды с последующим набуханием митохондрий, повреждением клетки и её гибелью. Косвенно, АФК приводят к истощению СОД, одной из функций которой является блокирование на молекулярном уровне апоптотического пути гибели клетки при церебральной ишемии и реперфузии. При включении гена человеческой CuZn-СОД в нейроны трансгенных мышей, последние вследствие избыточного синтеза CuZn-СОД становились защищёнными от ишемического и реперфузионного повреждения, однако оставались уязвимыми к воздействию постоянной фокальной ишемии. Нейропротективный эффект на ранних этапах каскада достигался за счёт блокирования CuZn супероксиддисмутазой высвобождения из митохондрий цитохрома c, являющегося важной сигнальной молекулой при апоптозе. Noshita и соавт. установили, что низкая активность марганцевой СОД (Mn-СОД) у генетически модифицированных мышей по гену СОД2^{-/-} по сравнению с мышами дикого типа сопровождалось значительным повышением уровня цитохрома c и каспазы 9. Более того, большие количества АФК инактивируют оксид азота, синтезируемый эндотелиальной синтазой, и приводят к дисфункции артерий и артериол головного мозга. Baumbach и соавт. показали, что у мышей с CuZnСОД^{-/-} артериолы в головном мозге более гипертрофированы, чем у мышей без гена эндотелиальной синтазы оксида азота. Этот факт может свидетельствовать о том, что АФК кроме взаимодействия с NO непосредственно влияют на рост сосудов посредством CuZnСОД.

Дисфункция митохондрий проявляется различными процессами на субклеточном уровне, и избыточная выработка АФК - только лишь одна из начальных причин, приводящая к набуханию митохондрий, повреждению

клетки и её смерти. В дополнение, нарушение способности митохондрий регулировать гомеостаз Ca^{2+} приводит к его избыточному накоплению, что, в свою очередь, сопровождается повышением проницаемости мембраны вследствие образования белком МРТР (*mitochondrial permeability transition pore protein*) пор на внутренней поверхности мембран. В результате этого, трансмембранный потенциал исчезает, что приводит к поступлению жидкости и набуханию митохондрий.

Процесс деления и роста митохондрий (биогенез митохондрий) является чрезвычайно регулируемым этапом ответа клетки на стрессовые влияния окружающей среды, связанной с ограничением доступа источников энергии и с окислительным стрессом. В экспериментальных исследованиях, моделирующих ишемическое-реперфузионное повреждение головного мозга у крыс, показано, что реперфузия активирует биогенез митохондрий, о чём свидетельствуют увеличение содержания митохондриальной ДНК в коре головного мозга и активация трёх генов транскрипции, участвующих в биогенезе. Эти три гена включают ген коактиватора транскрипции (PGC-1), который является главным регулятором и стимулятором биогенеза митохондрий, ген дыхательного фактора 1 и 2 типа в ядре клетки (NRF), который координирует экспрессию генов между митохондриями и ядром клетки, и митохондриальный транскрипционный фактор А (TFAM), стимулирующий транскрипцию митохондриальной ДНК. Предполагается, что в противоположность митохондриальной дисфункции биогенез митохондрий представляет эндогенную защитную реакцию в ответ на церебральную ишемию. В качестве примера можно привести исследование, в котором показано, что физические упражнения после ишемии стимулируют биогенез митохондрий с уменьшением размеров ишемического повреждения головного мозга и улучшением неврологических функций. Более того, стимулирование биогенеза митохондрий сублетальными дозами липополисахарида (LPS) способствует ней-ропротекции ишемизированной области.

Подавление белкового синтеза

После 30 мин. ишемии и последующей 4х часовой реперфузии содержание аминокислот, меченных ^{14}C , в головного мозга уменьшалось на 30%, что свидетельствовало о подавлении белкового синтеза вследствие блокирования начального этапа трансляции синтеза белка в раннем периоде реперфузии. Иными словами, на раннем этапе постишемической реперфузии несколько стрессовых факторов, действующих в эндоплазматическом ретикулуле - ЭР (истощение запасов АТФ, уменьшение катаболизма белков, блокирование гликозилирования белков, истощение запасов Ca^{2+} и преобладание восстановительных реакций), приводят к накоплению в нём неправильно упакованных белков. Эти неправильно упакованные белки в течение минут после начала реперфузии активируют три трансмембранных эффекторных белковых молекулы PERK (*protein kinase R [PKR]-like endoplasmic reticulum kinase*), IRE1 (*endoribonuclease inositol-requiring enzyme 1*) и ATF6 (*activating transcription factor 6*). Активация PERK у эукариотов приводит к фосфорилированию иницирующего фактора 2 (EIF2 – *eukaryotic initiation factor 2*), что снижает скорость синтеза белков. Молекула IRE1 активирует киназу JNK и каспазу 12, а также деградацию рибосомальной РНК 28s, каждая из которых может инициировать апоптоз. Протеолиз ATF6 сопровождается высвобождением

её цитоплазматического участка, который затем перемещается в ядро и инициирует начало транскрипции генов ответа на стресс в ЭР.

Апоптоз

Во время реперфузии после ишемии значительное число нейронов, особенно в области пенумбры, подвергается апоптозу. Несмотря на то, что механизмы развития и протекания апоптоза в головном мозге еще до конца не изучены, имеется предположение, что в этом участвуют оба его пути – внешний и внутренний (митохондриальный), и что каждый путь включает каспазу зависимый и независимый компоненты. В соответствии с ранее опубликованными работами о проапоптотических и противоапоптотических молекулах, образующихся после фокальной ишемии головного мозга, в недавно выполненном исследовании с использованием ПЦР и антител для изучения апоптоза был представлен широкий спектр про- и противоапоптотических молекул и временной профили их экспрессии при транскрипции и трансляции. Авторами были выявлены повышенные уровни экспрессии мРНК и белковых проапоптотических молекул Bax, Bad, Bid, каспазы-3 и цитохрома c в первые 24 часа после реперфузии. Также было показано, что повышенные уровни противоапоптотических молекул, включая Akt, ERK1/2, фосфо-ERK, Bcl2, XIAP, Naip2, HSP27 (БТШ27), HSP60, HSP70, а также белка, блокирующего апоптоз, сохраняются на протяжении до 7 дней после реперфузии. На этом основании было предложено не адресное влияние на определённую молекулу, а комбинированная противоапоптотическая стратегия, предусматривающая уменьшение количества проапоптотических молекул и увеличение количества противоапоптотических молекул с учётом времени и частоты введения препаратов.

Активация тромбоцитов

Во время церебральной ишемии происходит повреждение сосудистого эндотелия, что при реперфузии приводит к контакту обнажённого субэндотелиального внеклеточного матрикса с форменными элементами крови. Контакт с субэндотелиальным внеклеточным матриксом приводит к адгезии и избыточной активации тромбоцитов в микроциркуляторном русле головного мозга. На протяжении многих лет активация и агрегация тромбоцитов рассматривались как ключевые факторы в патогенезе не восстановления перфузии после реканализации сосуда. Несмотря на то, что в нескольких предварительных исследованиях были получены обнадеживающие результаты, в последующих исследованиях значение блокаторов GPIIb/IIIa рецепторов тромбоцитов в предотвращении прогрессирования инфаркта не было подтверждено, что послужило обоснованием для суждения о незначительной роли агрегации тромбоцитов в механизмах повреждения вещества головного мозга при инсульте. В противоположность, блокада рецепторов GPIIb, которые участвуют в прикреплении тромбоцитов к сосудистой стенке в месте её повреждения, сопровождалась существенным защитным эффектом с уменьшением нарастания сосудистых нарушений при инсульте. После взаимодействия рецептора GPIIb с фактором Вилибранта фосфолипаза D1 (PLD1) передаёт сигналы активации дальше по каскаду, кроме этого она играет большую роль в GPIIb – зависимой активации интегрина α IIb β 3 и адгезии тромбоцитов. У мышей с геном фосфолипазы *D1*^{-/-} отмечалось достоверно меньшее нарастание ишемических изменений после преходящей окклюзии средней мозговой артерии (СМА) без увеличения риска

кровотечения. В соответствии с положением о ключевой роли взаимодействия GPIb с фактором Вилибранта при образовании тромба и прогрессировании ишемических изменений, у мышей с $vWF^{-/-}$ через 24 часа после проходящей окклюзии СМА отмечалось меньшее ишемическое повреждение головного мозга и менее выраженные неврологические симптомы, а также не увеличивался риск внутричерепного кровоизлияния. В то же время, клиническая интерпретация этих недавно выполненных экспериментальных исследований пока не ясна, особенно с учётом предшествующих исследований, не подтвердивших эффективности антитромбоцитарных препаратов.

Активация комплемента

Возрастающий объём информации изменил представление о том, что ЦНС является иммунологически привилегированной. К настоящему времени хорошо установлено, что в ЦНС происходит активный синтез компонентов комплемента. На модели проходящей окклюзии СМА у крыс было показано наличие комплемента фактора C_3 в ядре ишемического очага на 1-ый и на 3-ий дни после реперфузии. Например, при проходящей окклюзии СМА у мышей было установлено, что активация рецептора фактора C_3 имеет определённые пространственно-временные характеристики. Также, присутствие $C1q$ после ишемически-реперфузионного повреждения было показано на модели проходящей окклюзии СМА у мышей. В противоположность, блокирование комплемента оказывает защитное действие против прогрессирования ишемического повреждения. Эти исследования поддерживают предположения о том, что система комплемента принимает активное участие в регулировании ишемически-реперфузионного повреждения.

Лейкоцитарная инфильтрация

Во время реперфузии активированные лейкоциты взаимодействуют с эндотелиальными клетками, вызывая скопления лейкоцитов, эритроцитов и тромбоцитов в микроциркуляторном русле. Это сопровождается выраженным нарушением кровотока в системе микроциркуляции и может быть причиной не восстановления локальной перфузии и прогрессирования вторичного ишемического повреждения головного мозга. В противоположность, при экспериментальной ишемии/реперфузии удаление нейтрофилов из кровотока при помощи антинейтрофильных антител приводит к лучшему восстановлению регионального мозгового кровотока и меньшим размерам инфаркта по сравнению с группой с наличием нейтрофилов. После проходящей окклюзии СМА и 22х часовой реперфузии у мужских особей мышей с синдромом выраженного комбинированного иммунодефицита с отсутствием Т и В клеток отмечалось уменьшение объёма инфаркта на 40%. В другом исследовании у мышей с отсутствием Т и В клеток вследствие выключения гена, активирующего рекомбиназу ($Rag1^{-/-}$), после ишемии/реперфузии отмечалось уменьшение размеров инфарктов головного мозга на 60-70% и лучшая сохранность неврологических функций (85,86). В то же время, у мышей с недостатком только В клеток не отмечалось уменьшения размеров инфаркта головного мозга. Пересадка В клеток мышам с геном $Rag1^{-/-}$ не увеличивала размер инфаркта головного мозга, в то время как трансплантация $CD3^{+}$ Т клеток от мышей дикого типа мышам с геном $Rag1^{-/-}$ приводила к тому, что последние становились полностью восприимчивы к ишемически-реперфузионному повреждению. На основании этих исследований мож-

но предположить, что Т клетки, а не В клетки играют важную роль в повреждении головного мозга при ишемии/ реперфузии. В соответствии с этим предположением, блокирование Т клеток антителами к анти- α 4 интегрину, молекула адгезии к сосудистой стенке (VCAM1) - малыми интерферирующими РНК (siRNA) также приводило к уменьшению размеров области инфаркта головного мозга.

Недавно, Kleinschnitz и соавт. показали, что Т регуляторные клетки, экспрессирующие белок FoxP3, играют важную роль во время ишемически-реперфузионного повреждения (90). Избирательное удаление Т рег. клеток при моделировании преходящей окклюзии СМА сопровождалось значительным уменьшением размеров области инфаркта и улучшением неврологических функций. Включение Т рег. клеток в лимфоциты мышей с геном Rag1^{-/-} приводило к существенному увеличению размеров инфаркта головного мозга. В этом исследовании также было показано, что в области ишемического повреждения в головном мозге Т рег. клетки взаимодействуют с эндотелиальными клетками посредством комплекса LFA-1/ICAM-1 (LFA-1 – *lymphocyte function-associated antigen-1*, ICAM-1 – *intercellular adhesion molecule 1*), приводя тем самым к микрососудистой дисфункции. Блокирование комплекса LFA-1/ICAM-1 приводило к уменьшению внутрисосудистого тромбообразования и улучшало реперфузию. Удаление тромбоцитов также нивелировало отрицательный эффект Т рег. клеток на течение инсульта. Роль Т рег. клеток в ишемически-реперфузионном повреждении по-видимому является более значимой, чем роль лейкоцитов, т.к. удаление только лейкоцитов при наличии Т рег. клеток не улучшало исход инсульта у мышей.

Нарушение функции ГЭБа

Повреждение микроциркуляторного русла при церебральной ишемии приводит к повышению проницаемости ГЭБа. Во время постишемической реперфузии у крыс с фокальной преходящей окклюзией СМА нарушения ГЭБа обычно бывают более значительными, чем при моделировании постоянной окклюзии СМА. Более того, увеличение объема церебрального кровотока во время реперфузии коррелирует со степенью нарушения ГЭБа. У крыс с преходящей ишемией проницаемость ГЭБа начинает увеличиваться через 1 час после начала реперфузии, в то время как при постоянной окклюзии – через 3 часа. В дополнение, надо отметить, что при преходящей окклюзии СМА увеличение проницаемости ГЭБа носит двухфазный характер с максимумами через 3 и 48 часов после реперфузии. В то же время, сохраняющееся незначительное повышение проницаемости может наблюдаться до 4-5 недель. Постишемическая реперфузия приводит к избыточному образованию свободных радикалов и высвобождению протеаз из эндотелиальных клеток, астроцитов, микроглии и нейронов. Матриксные металлопротеиназы (ММП) играют существенную роль в повреждении базальной мембраны капилляров головного мозга. Первоначальное повышение проницаемости ГЭБа, наблюдаемое через 3 часа после ишемии, может быть связано с увеличенной экспрессией ММП-2 и 9, которые приводят к разрушению белков, участвующих в образовании плотных межклеточных контактов в ГЭБе - клаудина-5 и окклюдина, в то время как ингибиторы ММП предотвращают повышение проницаемости ГЭБа и связанное с этим развитие отека головного мозга. Одновременно, важно отметить, что повышение проницаемости ГЭБа – это, по всей вероят-

ности, многофакторный процесс, т.к. блокада ММП не предупреждала отсроченное (через 48 часов) повышение проницаемости ГЭБа. Одним из объяснений может быть то, что ингибитор ММП не блокировал повреждающего действия на ГЭБ свободных радикалов и таких протеаз, как эластаза, высвобождающихся из лейкоцитов в зоне ишемии. Gidday и соавт. в эксперименте на мышцах с ММП- 9^{-/-} и на мышцах с химерным костным мозгом установили, что ММП-9 из костного мозга, нежели из головного мозга существенно влияла на повышение проницаемости ГЭБа.

Нарушение ГЭБа включает сложные ультраструктурные изменения, в том числе повреждение эндотелиальных клеток капиллярного русла, дегенерацию астроцитов и перицитов, а также периваскулярный отёк. Эти нарушения коррелируют с повреждением тесно связанной с ГЭБом нейрососудистой единицы.

Нарушение функции нейрососудистой единицы

Термин нейрососудистая единица (НСЕ) был предложен для описания сложных взаимодействий между всеми типами клеток головного мозга, связанных с капиллярным руслом. Нейрососудистая единица включает эндотелиальные клетки, перициты, гладкомышечные клетки сосудов, астроциты, микроглию и нейроны. Нейрососудистая единица является функциональной единицей, которая тесно связывает сосудистую и нервную системы головного мозга. Постишемическая реперфузия приводит к повреждению различных компонентов НСЕ (рис.1).

Эндотелиальные клетки

При проведении электронной микроскопии (ЭМ) было показано, что через 7 дней после преходящей окклюзии СМА в эндотелиальных клетках сосудов головного мозга крыс происходит избыточное накопление аутофагосом. Основной фоновой функцией аутофагосомно-лизосомального метаболического пути является удаление из клетки её повреждённых компонентов и продуктов метаболизма, однако избыточная аутофагическая активность может нарушать функционирование сохранных компонентов клетки и приводить к её гибели. Как свидетельствуют данные ЭМ, во время постишемической реперфузии избыточная аутофагия может вызвать гибель клеток, в частности эндотелиальных клеток микроциркуляторного русла головного мозга.

Перициты

Перициты контактируют с эндотелиальными клетками на уровне капиллярного русла там, где уходят гладкомышечные элементы. Перициты опоясывают стенки капилляров удлинёнными, пальцеобразными отростками. Перициты содержат особые, способные к сокращению белки, которые позволяют этим клеткам функционировать как гладкомышечным клеткам, сокращаясь и регулируя локальный мозговой кровоток. Yemisci и соавт. установили, что у крыс, несмотря на реканализацию СМА после её окклюзии, отмечается продолжительное по времени сокращение перицитов. Ими также было показано, что радикалы кислорода и азота, высвобождаемые из микроциркуляторного русла при ишемии и реперфузии, вызывают сокращение перицитов, которое прекращается при применении ингибиторов синтазы оксида азота.

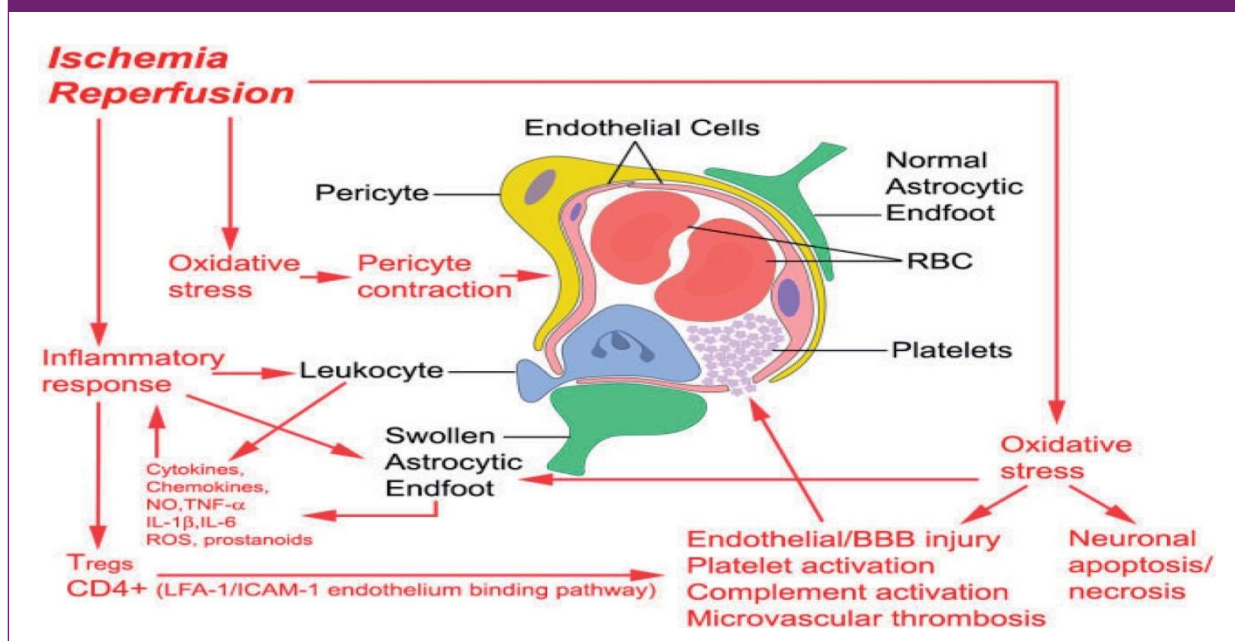
Астроциты

Иммуногистохимический анализ, выполненный после преходящей окклюзии СМА, показал усиление астроглиоза вокруг капиллярного русла и в веществе

головного мозга. Данные ЭМ выявили сдавление просвета капилляров разбухшими концевыми отростками астроцитов.

Рис.1. Схематическое изображение нейрососудистого механизма постишемического реперфузионного повреждения. После ишемии во время реперфузии избыточная выработка АФК приводит к развитию окислительного стресса. Окислительный стресс в свою очередь приводит к повреждению эндотелиальных клеток, сужению субэндотелиального внеклеточного матрикса и его контактом с кровотоком. Этот контакт сопровождается адгезией и активацией тромбоцитов в микроциркуляторном русле с образованием тромбозов. Повреждённые эндотелиальные клетки высвобождают металлопротеиназы, которые взаимодействуют с базальной мембраной и приводят к повышению проницаемости ГЭБа. Кроме этого, повреждённые эндотелиальные клетки, взаимодействуя с регуляторными Т-клетками и активированными лейкоцитами, приводят

к усилению тромбообразования. В дополнение значительное количество воспалительных факторов, включая цитокины, хемокины, NO, TNF- α , ИЛ-1 β , ИЛ-6, АФК и простаноиды, высвобождаются из активированных астроцитов микроглии. Следующий за этим активный воспалительный ответ сопровождается повышением цитотоксичности, что увеличивает вероятность гибели нейронов в пенумбре. Более того, окислительный стресс приводит к продолжительному по времени сокращению перicyтов и связанному с этим сужению просвета микрососудов. Также усиливаются сужение просвета сосудов разбухшие отростки астроцитов.



важной составной частью нейрососудистой единицы, участвующей в обмене информацией между ишемизированным головным мозгом и системными ответами в крови, активируются и пролиферируют, и их действие варьирует от цитотоксического до цитопротективного. В острую стадию астроциты секретируют воспалительные факторы, включая цитокины, хемокины и оксид азота, которые участвуют в процессах клеточной адгезии и увеличивают вероятность гибели нейронов в пенеумбре. В восстановительный период реактивные астроциты секретируют амфизин (HMGB-1 - high mobility group box 1) - молекулу, относящуюся к группе молекул, обозначаемых «молекулярный фрагмент, ассоциированный с опасностью», которая в небольших концентрациях усиливает пролиферацию эндотелиальных прогениторных клеток (ЭПК) и способствуют нейрососудистому ремоделированию. Положительное значение стимуляции клеточной пролиферации было недавно продемонстрировано на культуре клеток, в которой моделировались кислородное голодание, недостаточность глюкозы и реперфузия.

Микроглия

Во время постишемической реперфузии микроглиальные клетки, являющиеся оседлыми макрофагами ЦНС, активируются и могут превращаться в фагоциты, которые секретируют нейротрофический фактор головного мозга (BDNF), инсулиноподобный ростовой фактор 1 (IGF-1) и трансформирующий фактор роста α (TGF- α) (112,113). Эти нейротрофические молекулы обладают нейропротективным действием по отношению к нейрососудистой единице. С другой стороны, активированные клетки микроглии секретируют провоспалительные молекулы такие, как интерлейкин-1 (ИЛ-1), фактор некроза опухоли (ФНО), ИЛ-6, NO, АФК и простагоиды, которые способствуют развитию выраженной цитотоксичности. В частности, ИЛ-1 непосредственно участвует в ишемически-реперфузионном повреждении, и у мышей, лишённых гена ИЛ-1, объём инфаркта уменьшался на 70%. Таким образом, реакция микроглии на повреждение может, как способствовать восстановлению, так и усиливать повреждение, и причины, регулирующие равновесие между восстановлением и повреждением, еще неясны.

Нейроны

Ramirez и соавт. на модели преходящей окклюзии СМА у крыс показали развитие выраженной аутофагии нейронов в области пенеумбры во время реперфузии, проводимой через 6-48 часов после ишемии, что свидетельствует о многоплановой роли аутофагии в регуляции санации и удаления повреждённых структур клетки или в её гибели. В дополнение, данные ультраструктурного анализа ЭМ и лазерной сканирующей конфокальной микроскопии (ЛСКМ) указывают на наличие скоплений повреждённых белков в телах нейронов, в дендритах и в аксонах. При этом, в устойчивых к повреждению нейронах наблюдается лизис этих скоплений, в то время как в нейронах области СА₁ гиппокампа агрегаты нелизуются, что способствует гибели клетки.

Chen и соавт. показали, что нарушение целостности ГЭБа при ишемии-реперфузии приводит к контакту тромбина с клетками головного мозга, который для них является токсичным. Это дополнительно увеличивает вероятность гибели нейронов посредством активации комплекса протеаза-активируемый рецептор 1 (PAR-1) в мембранах нейронов. Выключение комплекса PAR-1 короткими, шпилько-

образными РНК (shRNA) сопровождалось повышением нейропротективных свойств, и у мышей с выключенным PAR-1 размеры инфаркта головного мозга после преходящей окклюзии СМА были меньше. Это позволило предположить, что блокирование белка PAR 1 может быть использовано в качестве активной стратегии нейропротекции.

Магнитно-резонансная томография при реперфузионном повреждении

Магнитно-резонансная томография и её различные последовательности могут предоставить очень значимую обширную информацию для неинвазивного мониторинга и изучения особенностей постишемического реперфузионного повреждения. Несмотря на то, что МРТ анализ реперфузионного повреждения находится ещё только на начальном этапе развития, МРТ в целом имеет большой потенциал для изучения механизмов реперфузионного повреждения и его предотвращения и для подбора терапии.

Диффузионно-взвешенное МРТ (ДВ МРТ) и вторичная ишемия

Neumann-Haefelin и соавт. при анализе на 2,0 Т МР томографе изменений, происходящих после преходящей окклюзии СМА, установили, что после ишемии в 30 - 60 минут во время реперфузии отмечалась преходящая нормализация ДВ изменений, но через 1 день после реперфузии ухудшение на ДВ МРТ возобновлялось. В соответствии с изложенным выше, Olah и соавт., анализируя ДВ изменения на томографе 4,7Т при преходящей окклюзии СМА у крыс, показали, что после 60 минутной ишемии с последующей 2х часовой реперфузией наблюдается преходящее улучшение показателей коэффициента наблюдаемой диффузии (ADC), которое в последующем сменяется нарастающим его ухудшением к концу 10 часа после реперфузии. Результаты, полученные в этих исследованиях, свидетельствуют о развитии вторичной ишемии, вызванной реперфузией.

Перфузионно-взвешенные изображения и постишемическая гиперперфузия

Постиемическая гиперперфузия определяется как увеличение церебральной перфузии после инсульта, возникающее вследствие нарушения ауторегуляции мозгового кровотока. Следующие за этим постишемический отёк головного мозга или кровоизлияние могут быть дополнительными механизмами реперфузионного повреждения. Более того, вторичная гипоперфузия, следующая за постишемической гиперперфузией, может усилить реперфузионное повреждение. При помощи ДВ и ПВ МРТ Kidwell и соавт. продемонстрировали наличие постишемической гиперперфузии у 40% пациентов через несколько часов и у 50% больных через 7 дней после внутриапериартериальной тромболитической терапии. Ими также было показано, что в областях с гиперперфузией в конечном итоге развивался инфаркт.

МРТ контрастным усилением нарушение проницаемости ГЭБа

На основании наблюдательного исследования, показавшего, что отсроченное поступление контраста в ликворопроводящие пространства по данным FLAIR изображений коррелирует со степенью нарушения функции ГЭБа, Warrach и Latour на основании результатов МР томографии пришли к заключению, что в течение недели после в/в или в/а ТЛТ у больных с реперфузией чаще (45% наблюдений) развивалось нарушение проницаемости ГЭБа, чем у больных без реперфузии (18%). Отсроченное поступление контраста в ликворопроводящие пространства ими было обозначено как «гиперинтенсивный маркер ранней реперфузии» (HARM – *hyper acute reperfusion marker*), иони

предположили учитывать наличие этого маркера для предупреждения осложнений, связанных с ТЛТ t-РА.

Возможности терапии

Несмотря на то, что наше понимание механизмов постишемического реперфузионного повреждения все ещё очень ограничено, в последние годы накапливаются новые представления о механизмах и о возможных направлениях лечения. Ниже мы остановимся на некоторых экспериментальных исследованиях и клинических работах, в которых были показаны возможности улучшения после ишемии/реперфузии.

Ишемическая предпосылка

Ишемическая предпосылка, называемая также ишемическая толерантность, заключается в том, что после кратковременной ишемии (ниже повреждающего порога), применённой за один или несколько дней до тяжёлой ишемии, выраженность ишемического повреждения уменьшается. Было установлено, что подпороговый уровень ишемии стимулирует эндогенные защитные механизмы, которые позволяют ограничить воздействие последующих более тяжёлых ишемических повреждений. Например, ретроспективные и проспективные исследования показали, что преходящие нарушения мозгового кровообращения (ПНМК), предшествовавшие ишемическому инсульту (ИИ), приводили к формированию инфаркта меньших размеров и лучшему клиническому восстановлению при сравнении с больными без ПНМК (130-132). Предположительные механизмы, влияющие на развитие устойчивости к ишемии, могут включать блокирование активности АФК, избыточную экспрессию белков теплового шока, особенности экспрессии генов немедленного и раннего ответа, усиленный синтез новых белков, блокирование воспалительных реакций, увеличение содержания противоапоптотических белков и активацию Akt-связанных биохимических каскадов (133-141). Несмотря на то, что клиническое применение ишемической предпосылки очень ограничено вследствие непредсказуемости развития инсультов, тем не менее, в настоящее время развиваются несколько направлений. Так, для улучшения адаптации к гипоксии в качестве возможных кандидатов на роль ишемической предпосылки для уменьшения повреждающего действия ишемии-реперфузии были предложены хелатор ионов железа дезферроксамин, эритропоэтин и ингаляционные анестетики.

Ишемическая постпосылка

Ишемическая постпосылка представляет вариант нейропротективной стратегии, которая начинается после возникновения церебральной ишемии. Применение повторного кратковременного прекращения доступа крови в область ишемического повреждения в начальной стадии реперфузии сопровождалось значительным уменьшением размеров инфаркта головного мозга. Выполнение на моделях постоянной окклюзии СМА протокола исследования, включавшего на начальном этапе постишемической реперфузии три цикла реперфузии окклюзии (по 10 сек) обеих общих сонных артерий, приводило к уменьшению размеров инфаркта (17 – 80%) (145). Liang и соавт. на модели преходящей окклюзии СМА с использованием протокола с тремя циклами реперфузии (30 сек) и окклюзии (30 сек) одоимённой общей сонной артерии наблюдали уменьшение размеров инфаркта на 15%. В этих исследованиях было показано, что нейропротективный механизм постпосылки связан с влиянием на образование свободных радикалов на раннем этапе

постишемической реперфузии и блокированием апоптоза посредством уменьшения активации ядерного фактора. Принимая во внимание существенное положительное значение постпосылки в уменьшении реперфузионного повреждения, она может быть применима в тех клинических ситуациях, когда легко осуществимы повторные окклюзия сосуда и реперфузия, например при в/а ТЛТ или при механическом удалении тромба.

Фармакологические препараты

В связи с тем, что инфильтрация лейкоцитами области ишемии рассматривается как важный механизм реперфузионного повреждения, на моделях ишемии было показано, что применение антинейтрофильных и анти-ICAM-1 антител для предотвращения лейкоцитарной инфильтрации улучшает восстановление регионального мозгового кровотока и уменьшает размеры инфаркта во время реперфузии. Клинические исследования по ограничению лейкоцитарной инфильтрации в области ишемического повреждения пока не привели к успеху, однако корректная интерпретация этих результатов была затруднена в связи с многоплановым иммунологическим ответом у людей на белки грызунов. Хотя в экспериментальных исследованиях СОД и НАДФ оксидаза уменьшают размеры очага ишемии и повреждающее действие реперфузии, в клинических условиях применение антиоксидантов не сопровождалось отчётливым клиническим улучшением. Kahles и Brandes предположили, что возможными причинами отсутствия клинического эффекта антиоксидантов могут быть недостаточная доза, назначение только одного антиоксиданта, слабое связывание с АФК, не правильно выбранная мишень и побочные эффекты этих препаратов. В недавно выполненном исследовании на модели с грызунами было показано, что финголимодагонист рецепторов к сфингозину-1 фосфату, посредством противовоспалительного и сосудопротективного эффекта уменьшает размеры инфаркта и улучшает поведенческие реакции через 15 дней после преходящей окклюзии СМА. Финголимода обладает положительным терапевтическим эффектом у больных рассеянным склерозом и эффективен при уменьшении реперфузионного повреждения в сердце, печени и почках.

Гипотермия

Гипотермия является одним из наиболее надёжных известных на сегодняшний день направлений нейропротекции для уменьшения ишемического повреждения головного мозга. Гипотермия оказывает общий защитный эффект при ишемии головного мозга, и её роль в уменьшении реперфузионного повреждения особенно важна. Гипотермия снижает церебральный метаболизм, уменьшает повреждение ГЭБа и его проницаемость, а также нейтрофильную инфильтрацию. Более того, основываясь на неопубликованных данных, в экспериментальных условиях на клеточных культурах с моделированием ишемии/реперфузии было показано, что гипотермия защищает важнейшие компоненты нейрососудистой единицы, включая нейроны, астроциты и эндотелиальные клетки. Выполняющиеся в настоящее время клинические исследования по изучению возможностей гипотермии при инсульте, позволят получить новые данные о её терапевтическом потенциале в уменьшении реперфузионного повреждения.