Федеральное государственное бюджетное учреждение высшего образования «Северо-Осетинская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Кафедра биологической химии

Учебно-методическое пособие

Биохимия обмена веществ

Владикавказ 2017

В учебно-методическом пособии представлены современные данные биологической химии. Каждый раздел содержит теоретические вопросы, справочный материал, написаны методики, согласно которым проводятся лабораторные исследования. В разделах имеются перечень вопросов и тестовых заданий для самостоятельной работы.

Структура составлена таким образом, что помогает получить современные знания по биологической химии.

Предназначено для аспирантов по направлению подготовки Биологические науки, направленность «Биохимия» предназначено для аспирантов

Тема: Современные представления о строении белков. Шапероны – новый класс белков, классификация, биологическая роль. Прионовые болезни.

I Научно-методическое обоснование темы:

Однажды в 1962 г. во время проведения опытов на плодовых мушках (дрозофилах) температура в инкубаторе с насекомыми поднялась выше положенного. Когда Ферручио Ритосса (Ferrucio Ritossa), молодой ученый из Института генетики в г. Павия (Италия), поместил под микроскоп клетки мушек, получивших «тепловой удар», он увидел на хромосомах «пуфы» — утолщения, свидетельствовавшие об активности находящихся в этих местах генов. Области утолщений получили название сайтов теплового шока. Вначале считалось, что данный феномен характерен только для дрозофилы. И лишь через 15 лет белки, кодируемые генами в сайтах теплового шока (HSP, heat shock protein), были обнаружены в клетках млекопитающих и других организмов. Но что самое удивительное — оказалось, что они играют ключевую роль в функционировании биологических систем всех уровней — от отдельных клеток до организмов и даже целых популяций.

Термин «молекулярный шаперон» впервые был использован в 1978 году в работе Рона Ласкей, профессора эмбриологии из Кембриджского Университета при описании ядерного белка нуклеоплазмина, способного предотвращать агрегирование белков-гистонов с ДНК при образовании нуклеосом.

Шаперо́ны (англ. *chaperones*) — класс белков, главная функция которых состоит в восстановлении правильной третичной структуры повреждённых белков, а также образование и диссоциация белковых комплексов.

- Молекулярные шапероны – группа вспомогательных специализированных белков, предохраняющих растущую цепь от ошибочных внутренних и внешних контактов.
- В настоящее время к шаперонам относят, главным образом, белки, способствующиефолдингу вновь синтезирующихся или рефолдингу денатурированных вследствие стресса полипептидных цепей, а также их последующей сборке в биологически активные олигомерные структуры.

Эти вездесущие белки являются самыми древними и консервативными среди всех белков. Образуясь в условиях стресса, HSP помогают клеткам поддерживать в рабочем состоянии все механизмы и избегать гибели. Десять лет назад биологи обнаружили, что у высших организмов, в том числе у человека, HSP выполняют и другие важные функции. Они участвуют в работе иммунной системы, защищая организм от патогенов, и в то же время предотвращают апоптоз раковых клеток.

У многих внутриклеточных белков имеется всего один или совсем небольшое число «партнеров», с которыми они взаимодействуют. В качестве примера можно привести рецептор и его лиганд, подходящие друг к другу, как замок и ключ. На другие типы рецепторов данный лиганд не действует, и каждый рецептор, как правило, активируется своим структурно близким лигандом или веществом. В отличие от этого, шапероны взаимодействуют с широким кругом белков, что позволяет им выполнять различную работу. Например, они помогают новосинтезированным аминокислотным цепочкам принимать правильную пространственную конфигурацию, при которой те могут выполнять свои функции; демонтируют поврежденные белковые молекулы; сопровождают белки к месту назначения, охраняя их от разного рода опасностей, и т.д.

Антигенпрезентирующие клетки присутствуют практически во всех тканях человеческого тела. Они «представляют» свои находки Т-клеткам, те разыскивают антигенсодержащие клетки (раковые, инфицированные) и уничтожают их. Как оказалось, антигенпредставляющие клетки несут на своей поверхности рецепторы, с которыми могут связываться шапероны, нагруженные пептидами. Первый такой рецептор, CD91, был идентифицирован Робертом Байндером (Robert J. Binder)

Шапероны – белки, способные связываться с белками, находящихся в неустойчивом, склонном к агрегации состоянии. Шапероны стабилизируют их конформацию, обеспечивая фолдинг белков (правильная пространственная структура полипептидной цепи).

Классификация шаперонов по молекулярной массе:

1. Высокомолекулярные (от 100 до 110 кДа);
2. Ш-90 (83-90 кДа);
3. Ш-70 (66-70 кДа);
4. Ш-60;
5. Ш-40;
6. низкомолекулярные шапероны (15-30 кДа)

Среди шаперонов различают:

1. конституитивные белки (высокий базальный синтез которых не зависит от стрессовых воздействий на клетки организма);
2. индуцибельные (синтез, которых в нормальных условиях идет слабо, но при стерссовых воздействиях на клетку резко увеличивается).

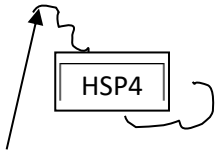
При синтезе N-концевая область полипептида синтезируется раньше, чем С - концевая область. В период синтеза на рибосоме защиту реакционно-способных радикалов осуществляет Ш-70.

Ш-70 – высококонсервативный класс белков, который присудствует во всех отделах клетки. С С-конца расположен участок называется бороздкой. Он может взаимодействовать с участками белковых молекул и развернутых полипептидных цепей длиной в 7-9 амк, обогащенными гидрофобными радикалами.

Шапероны участвуют в:

1. ФОРМИРОВАНИИ ТРЕТИЧНОЙ СТУКТУРЫ;
2. РЕНАТИВАЦИИ ЧАСТИЧНО ДЕНАТУРИРОВАННЫХ БЕЛКОВ;
3. СБОРКЕ ОЛИГОМЕРНЫХ БЕЛКОВ;
4. КОНТРОЛЕ ЗА ИЗМЕНЕНИЕМ МЕЖДУ АКТИВНОСТЬЮ И НЕАКТИВНОСТЬЮ КОНФОРМАЦИИ БЕЛКОВ;
5. ТРАНСПОРТЕ БЕЛКОВ ЧЕРЕЗ МЕМБРАНУ;
6. УЗНАВАНИИ ДЕНАТУРИРОВАННЫХ БЕЛКОВ И ТРАНСПОРТЕ В ЛИЗОСОМЫ.

Белки теплового шока, «конвоируют « к месту назначения, способствуют правильной пространственной упаковке белковых молекул, разрушают аномальные комплексы между белками.



Полипептидная цепь белока

HSP40 доставляет новоситезированный полипептид или денатурированную белковую молекулу другому шаперону, HSP70, который берет белок в «клещи», придает ему нужную форму и высвобождает биологически активную молекулу.

HSP60 стягивает в гидрофобную полость новосинтезированную или утратившую правильную конфигурацию аминокислотную цепочку и придает ей пространственную форму, при которой молекула может выполнять свои функции.

HSP90 получает белковые глобулы от других шаперонов (HSP70) и образует из них комплекс (рецептор).В данном процессе участвует так же кошаперон.

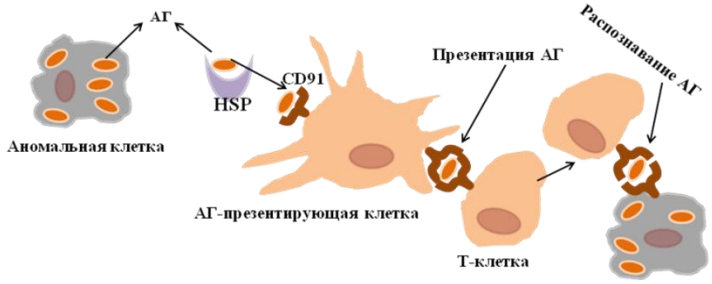
Активация иммунной системы

Когда клетка превращается в раковую, или в нее проникает какой-нибудь патоген, в ней начинается синтез необычных белков. Фрагменты белков — антигены — провоцируют иммунный ответ. Но для этого иммунные клетки должны быть поставлены в известность о возникшей аномалии. Белки теплового шока, прежде всего члены семейств HSP90 и HSP70, берут на себя функции глашатаев. Они включаются в систему оповещения и идентификации возмутителей спокойствия.

HSP доставляет антигены от пораженных клеток, к так называемым антигенпрезентирующим клеткам (АПК), использую для этого рецептор CD91.

Проглотив АГ АПК, посылает сигналы к началу воспалительной реакции, привлекающие к ней другие клетки иммунной системы, и предъявляет АГ Т-клетке. Распознав АГ, Т-клетки пролиферируют и совместно разрушают дефектную клетку (рис. Процесс распознавания АГ).

Процесс распознавания АГ



Основные положения

- Белки-телохранители (шапероны), присутствующие в клетках всех без исключения организмов, сглаживают последствия стрессовых воздействий на клетки.
- Шапероны охотно вступают во взаимодействие с самыми разными пептидами и несут на себе «антигенный отпечаток» каждой клетки. Благодаря этому они принимают непосредственное участие в активации иммунной системы.
- Применение шаперонов в медицине предполагает подавление их активности в одних ситуациях и стимулирование — в других.
- Белки теплового шока (шапероны) способствуют правильной пространственной укладке белковых молекул, доставляют их к месту назначения, предотвращают нежелательные контакты с другими клеточными компонентами

Прионовые заболевания

Прионовые заболевания – класс нейродегенеративные заболеваний человека и животных, возбудителем которых является прион. Прионы – мембранные белки, которые в основном экспрессируются в клетках ЦНС и лимфоретикулярной ткани. Они не содержат нуклеиновых кислот, входят в состав наружных клеточных мембран, связанных с внешней поверхностью клеток якорем гликолипида и участвуют в эндоцитозе и катаболизме клеток. Прионы могут синтезировать не только нейроны, но и другие клетки организма. Прион протеин необходимый для нормальной синаптической функции. Предполагается, что прионы участвуют в межклеточном узнавании и клеточной активации, а также участвуют в подавлении возрастных процессов.

На основании первичной структуры был идентифицирован кодирующий ген протеин-приона, который находится на 20 хромосоме у всех млекопитающих. Он состоит у человека приблизительно из 254 аминокислот. Молекулярная масса равна 33000-35000 дальтон, или 33-35 кД.

Прионы представляют собой белки, обладающие уникальной способностью к самовоспроизведению, устойчивы к воздействию высоких температур, пищеварительных соков и, следовательно, могут передаваться животным, поедающих мясо зараженных животных. Патогенные прионы попав в организм, транспортируются в богатые нормальными прионами ткани иммунной системы (селезенка). Под действием патогенных прионов происходит превращение нормальных прионов организма в патогенные формы, которые далее мигрируют в ткани нервной системы, способствуя патогенной трансформации прионов в нервных клетках ЦНС.

Спонгиозные изменения и вакуолизация цитоплазмы нейронов отмечаются по ходу зубчатой фасции, в области подкорковых ядер, таламусе и коре мозжечка.

В эксперименте с использованием трансгенных мышей, гомозиготных по делеции гена Prnp, что организмы лишенные приона, устойчивы к его инфекции

Последовательность аминокислот в белке PrP определяет набор конформаций, которые он может приобрести. Если наборы допустимых конформаций приона у двух различных видов организмов пересекаются, то может происходить преодоление межвидового барьера.

Протеин-прион существует в двух формах:

1. в виде клеточной нормальной, неинфекционной формы, которая встречается в головном мозге, как в норме, так и у инфицированных больных – клеточный протеин-прион PrPc;
2. изоформа, патологическая, инфекционная форма, при которой происходит накопление этого белка в глоловном мозге только у больных людей и животных, страдающих спонгиформой трансмессивной энцефалопатией – PrPsc («scrabie» -болезнь овец)

М.Гриффит предположил, что инфекционный агент - измененная форма одного из клеточных белков.

Патологическая форма неотличима от нормальной формы, но имеет другую конформацию. Пространственная структура рекомбинантной нормальной формы впервые была определена методом ядерного магнитного резонанса. Было обнаружено, что нормальная форма содержит 42% α-спиралей и β-структур, тогда как патологическая форма содержит 30% α-спиралей и 43% β-структур. Вследствие этого предложили, что приобретение инфекционных свойств белком прионом связано с конформационным переходом, при котором происходит образование β-складчатого слоя.

Одним из свойств прионов является штамовое разнообразие – способность прионового белка приобретать и наводить различные прионовые конформации. Последовательность аминокислот в белке приона определяет набор конформаций, которые он может приобрести. Если наборы допустимых конформаций приона у двух различных видов организмов пересекаются, то может происходить преодоление межвидового барьера.

Модели перехода нормальной формы в измененную:

- гетеродимерная модель (прионное состояние присущее мономеру белка приона, и физическое взаимодействие патологической формы с нормальной катализирует превращение нормальной формы в патологическую; но данный переход является медленным энергозависимым и маловероятным, при этом образуются гомодимеры PrPsc/ PrPsc, которые могут диссоциировать запуская новые раунды конформационного превращения);
- Полимеризациннная модель (прионовое превращение неотделимо от агрегации т.к. прионную конформацию может поддерживать только олигомер или мультимер протеина-приона; при образовании «ядра» олигомера патологической формы (PrPsc) протеина (медиатора превращения), происходит увелиение скорости перехода нормальной формы в патологическую).

Нормальная форма необходима для транспорта инфекционного агента периферическими нервами к ЦНС.

С. Прузинер сформулировал прионную концепцию (1982 г.):

- ✓ Инфекционным агентом является белок PrPsc;
- ✓ Он может реплицироваться в себя в отсутствие нуклеиновой кислоты;
- ✓ Превращение нормальной формы в патологическую происходит путем конформационного перехода.

Организмы, лишенные нормальной формы приона устойчивы к прионной инфекции (межвидовой барьер).

В настоящее время у человека известны следующие прионные заболевания:

- ✓ Бычья губчатая энцефалопатия или коровье бешенство;
- ✓ Скрейпи овец;
- ✓ Некоторые нейродегенеративные заболевания человека – болезни Крейцфельда-Якоба и Герстмана-Штрайсслера-Шейнкера, семейная фатальная бессонница и куру.

Группа прионовых подострых трансмиссивных спонгиформных энцефалопатий человека включает:

- болезнь Крейтцфельда-Якоба (БКЯ);
- синдром Герстмана-Страусслера-Шейнкера, (ГСШ);
- синдром "фатальной семейной бессонницы" (ФСБ);
- болезнь Куру;
- хроническую прогрессирующую энцефалопатию детского возраста или болезнь Альперса

Болезнь Крейтцфельда-Якоба представлена тремя классическими формами:

- спорадическая форма (85-90% всех случаев);
- семейная форма (10-15%);
- ятрогенная форма (% еще окончательно не установлен).

Болезнь Крейтцфельдта-Якоба(БКЯ):

- Патогенез: деменция, зрительные и мозжечковые нарушения.
- Пути инфицирования:1) при употреблении термически не обработанных продуктов животного происхождения; 2) при трансплантации тканей (например, роговицы глаза);
- 3) при использовании недостаточно простерилизованных хирургических инструментов
- Инкубационный период-до20 лет.

Куру:

- Патогенез: поражение ЦНС, нарушение координации. эйфория.
- Пути инфицирования: в результате ритуального каннибализма (Новая Гвинея)
- Инкубационный период-1 год.

Синдром Герстманна-Штраусслера-Шейнкера:

- Патогенез: деменция, гипотония, нарушение глотания, дизартрия.
- Наследственное заболевание.
- Инкубационный период - от 5-30 лет

Фатальная семейная бессонница:

- Аутосомно-доминантное заболевание.
- Патогенез: гипертензия, тахикардия, нарушение сердечных ритмов и

Скрепи-прионная болезнь овец и коз:

- Патогенез: сильный кожный зуд, поражение ЦНС, нарушение координации.

Перспективы лечения прионных заболеваний:

- Размножение может быть остановлено с помощью пептидов, обогащенных пролином;
- Дрожжи представляют собой удобную модель для поиска и изучения факторов, способных излечивать клетки от прионов

II Цель деятельности обучающихся на занятии

Обучающийся должен знать:

1. Что такое шапероны?
2. В каких процессах они участвуют?
3. Функции шаперонов?
4. Классификацию шаперонов по молекулярной массе. Виды шаперонов.
5. Особенности синтеза шаперонов.
6. Механизм действия шаперонов HSP40, HSP60, HSP70, HSP90.
7. Как осуществляется активация иммунной системы. Процесс распознования АГ.
8. Что такое прионы?
9. Какие заболевания называются прионовыми?
10. Существуют ли в норме прионы? Для чего они необходимы?
11. Какие существуют формы приона
12. Отличие нормальной формы приона от инферкционной изоформы.
13. Свойства прионов.
14. Модели перехода нормальной формы в измененную. Их особенности.
15. Основные пункты прионовой концепции С. Прузинера, сформулированной в 1982 г.
16. Какие известны прионные заболевания?
17. Особенности течения болезни Крейтцфельда-Якоба?
18. Особенности течения болезни Куру?
19. Особенности течения фатальной семейной бессонницы.

Обучающийся должен уметь:

1. Объяснить процесс распознавания АГ.
2. Рассказать о биологической роли шаперонов.
3. Распознать прионные заболевания, по клиническим проявлениям.

IIIСодержание обучения:

Основные вопросы:

1. Шапероны, определение, функции.
2. Классификация шаперонов по молекулярной массе. Виды шаперонов.
3. Особенности синтеза шаперонов.
4. Механизм действия шаперонов HSP40, HSP60, HSP70, HSP90.
5. Активация иммунной системы. Процесс распознования АГ.
6. Прионы, определение, свойства. Процессы, в которых участвуют прионы.
7. Отличие нормальной формы приона от инферкционной изоформы.
8. Модели перехода нормальной формы в измененную. Их особенности.
9. Прионные заболевания. Примеры, особенности течения.
10. Основные пункты прионовой концепции С. Прузинера, сформулированной в 1982 г.
11. Особенности течения болезни Крейтцфельда-Якоба?
12. Особенности течения болезни Куру?
13. Особенности течения фатальной семейной бессонницы.

IV Перечень наглядных пособий и средств ТСО.

Рис. 1. Процесс распознавания АГ, рис. 2. Модели перехода конформации приона, рис.3. Схема процесса накопления молекул инфекционного прионового белка, таблица 1. Основные симптомы, наблюдаемые при прионных заболеваниях, таблица 2. Синтез белка на рибосомах.

V Перечень вопросов для проверки исходного уровня знаний:

1. Белки, определение, функции.
2. Аминокислотный состав белков организма человека. Понятие заменимые и незаменимые аминокислоты (амк), их представители.
3. Структурная организация белковой молекулы. Формирование первичной, вторичной, третичной, четвертичной структур.
4. Образование пептидной связи.

VI Перечень вопросов для проверки конечного уровня знаний:

1. Шапероны, определение, функции.
2. Классификация шаперонов по молекулярной массе. Виды шаперонов.
3. Особенности синтеза шаперонов.
4. Механизм действия шаперонов HSP40, HSP60, HSP70, HSP90.
5. Активация иммунной системы. Процесс распознования АГ.
6. Прионы, определение, свойства. Процессы, в которых участвуют прионы.
7. Отличие нормальной формы приона от инферкционной изоформы.
8. Модели перехода нормальной формы в измененную. Их особенности.
9. Прионные заболевания. Примеры, особенности течения.
10. Основные пункты прионовой концепции С. Прузинера, сформулированной в 1982 г.

11. Особенности течения болезни Крейтцфельда-Якоба?
12. Особенности течения болезни Куру?
13. Особенности течения фатальной семейной бессонницы.

IX Самостоятельная работа обучающихся:

Составить ментальную карту по теме: «Современные представления о строении белков. Шапероны – новый класс белков, классификация, биологическая роль. Прионовые болезни».

Вопросы для самостоятельного обучения:

1. Особенности течения других прионных заболеваний.

X Список используемой литературы:

Обязательная:

1. Е.С. Северин «Биохимия», Москва 2004;
2. Е.С. Северин «Биохимия с упражнениями и задачами», Москва 2008;

Дополнительная:

1. Интернет ресурсы
2. Материал конспектов занятия

Раздаточный материал

Рис. 1. Процесс распознавания АГ

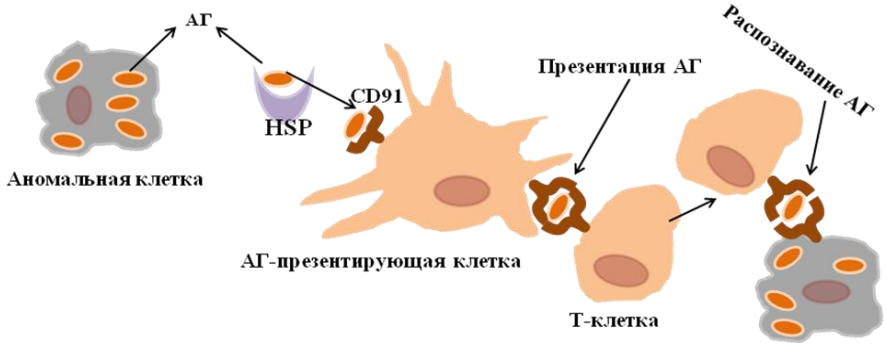
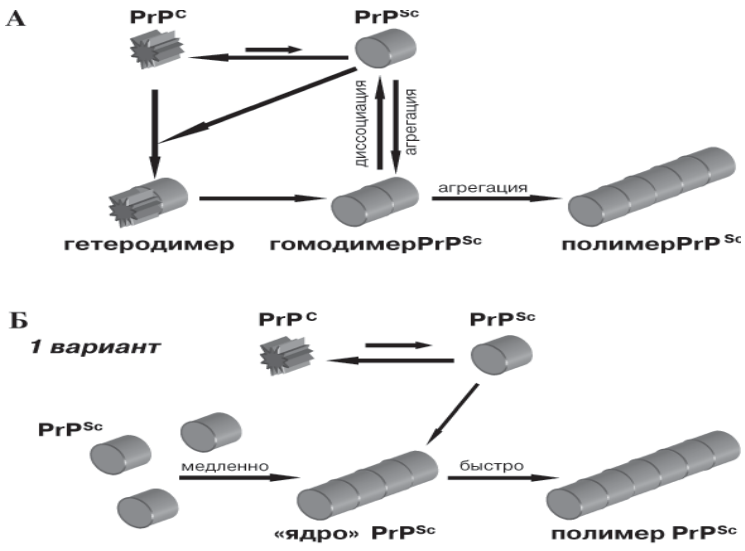
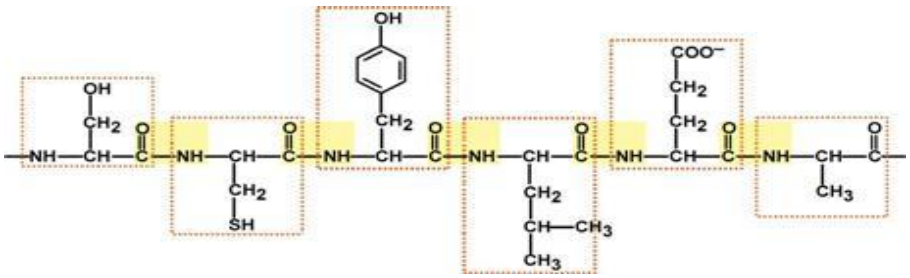


Рис. 2. Модели перехода конформации приона





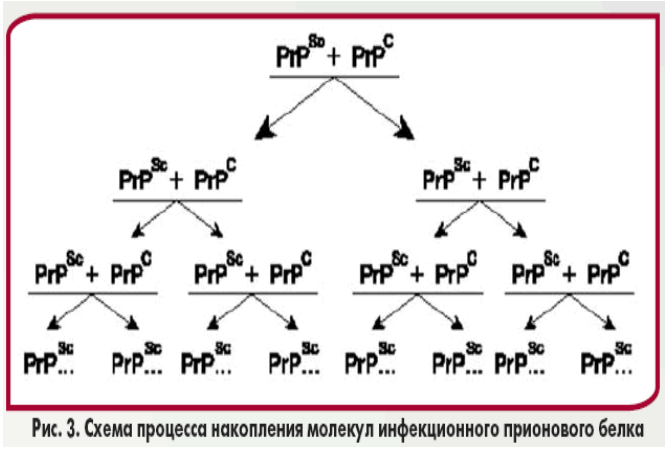
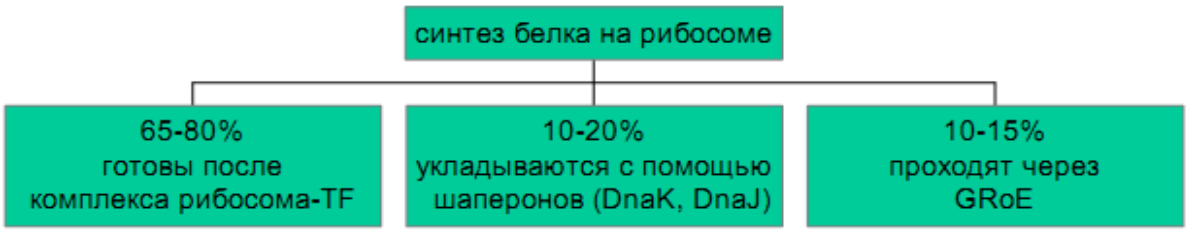


Рис. 3. Схема процесса накопления молекул инфекционного прионового белка

Таблица 1. Основные симптомы наблюдаемые при прионных заболеваниях

Симптомы	Частота (%)
Умственные нарушения (деменция, психические или поведенческие нарушения)	100
Миоклонус	>80
Пирамидные знаки	>50
Мозжечковые симптомы	>50
Экстрапирамидные симптомы	>50
Корковые зрительные нарушения	>20
Глазодвигательные нарушения	>20
Поражения нижнего мотонейрона	<20
Вестибулярные нарушения	<20
Припадки	<20
Чувствительные нарушения	<20
Вегетативные нарушения	<20

Таблица 2. Синтез белка на рибосомах.



Тема: Энзимодиагностика заболеваний сердца, печени и поджелудочной железы.

Одним из основных объектов определения ферментативной активности при заболевании служит кровь: сыворотка или плазма. Чаще с диагностическими целями анализируют сыворотку.
В сыворотке крови присутствуют ферменты, имеющие различное происхождение:

- клеточные ферменты – попадают в кровь из тканей в результате физиологического старения и гибели клеток, повышения проницаемости мембран. Уровень этих ферментов в крови зависит от их концентрации в тканях, молекулярной массы и локализации в клетке. Неспецифические клеточные ферменты обнаруживаются в большинстве органов. Органоспецифические ферменты (или маркерные) обнаруживаются в определенных тканях (аргиназа – в паренхиме печени, креатинкиназа – в мышечной ткани).
- Секреторные ферменты выполняют в крови свою специфическую функцию (ферменты свертывающей системы крови и системы фибринолиза постоянно вырабатываются в печени и секретируются в кровь, где и участвуют в процессах гемостаза; аналогично – церулоплазмин из печени поступает в кровь, где осуществляет транспорт меди). Секреторные ферменты специфичны для плазмы.
- Экскреторные ферменты синтезируются пищеварительными железами (поджелудочная железа, слизистая кишечника, эндотелий желчевыводящих путей). Появление этих ферментов в сыворотке в норме обусловлено естественным разрушением клеточных структур. К экскреторным ферментам относится щелочная фосфатаза, амилаза, липаза. Это ферменты неспецифичные для плазмы. В норме их в плазме мало и, следовательно, активность низка, но она резко увеличивается при патологии органа.

Присутствие ферментов в плазме может быть оценено как: гиперферментопатия, гипоферментопатия и дисферментопатия.
Гипоферментопатия касается большей степени секреторных ферментов и регистрируется редко. Она может быть обусловлена:

1. генетическими нарушениями, приводящими к нарушению синтеза фермента;
2. ингибированием синтеза фермента;
3. усилением деградации фермента.

Гиперферментопатия может быть обусловлена:

1. выходом ферментов из поврежденных органов и тканей;
2. результатом действия сильных раздражителей, сопровождающихся метаболическими перестройками (вместе с появлением лейкоцитоза, увеличением СОЭ);
3. усилением синтеза белка.

Дисферментопатии в основном связаны с появлением в крови органоспецифических ферментов. Диагностически значимые ферменты дают достаточно информации для установления факта развивающейся патологии, оценки тяжести заболевания, контроля проводимой терапии.

Лактатдегидрогеназа (КФ. 1.1.1.27) – ЛДГ.

Лактатдегидрогеназа – ЛДГ (КФ. 1.1.1.27) катализирует окисление лактата в пировиноградную кислоту. Для реакции необходимо присутствие НАД. Фермент присутствует во всех органах и тканях в разных количествах, включая эритроциты.
11
Определяется спектрофотометрически и колориметрически. Имеет диагностическое значение при:

- острый инфаркт миокарда – возрастает активность фермента, достигая максимального значения к 48 часам. При стенокардии увеличение активности фермента в сыворотке не регистрируется;
- паренхиматозный гепатит – регистрируется повышение активности в сыворотке в первую неделю желтушного периода;
- механическая желтуха – активность повышена на поздних стадиях заболевания, вследствие вторичных повреждений печени;
- злокачественные заболевания печени – повышение активности в плазме регистрируется не всегда;

хронический гепатит и цирроз – активность фермента повышена при обострении процесса, а в стадии ремиссии близка к норме. В сыворотке крови постоянно присутствуют 5 изоферментов, которые можно проанализировать (количественно и качественно) после электрофоретического разделения ЛДГ. Изоферментный спектр и преимущественные изменения соотношения изоформ в сыворотке характерны для разных патологий и органов.

Ферменты, наиболее часто используемые в диагностике.

фермент	Органы	Патология
Альдолаза	Скелетные мышцы печень	Заболевания мышц
Аланинаминотрансфераза (АлАТ)	Печень, скелетные мышцы, сердце	Паренхиматозные заболевания печени
Амилаза	Слюнные железы,	Патология поджелудочной

	поджелудочная железа	железы
Аспартатаминотрансфераза (АсАТ)	Печень, скелетные мышцы, сердце, почки.	Инфаркт миокарда, паренхиматозные заболевания печени, патология мышц
Гамма-глутамилтранспептидаза (ГГТ)	Печень, почки	Алкогольная интоксикация Патология гепатобилиарного тракта
Кислая фосфатаз (КФ)	Простата.	Опухоль простаты
Креатинкиназа (КК) Креаниифосфорокиназа (КФК)	Скелетные мышцы, мозг, сердце, гладкие мышцы	Инфаркт миокарда, заболевания мышц
Лактатдегидрогеназа (ЛДГ)	Сердце, печень, скелетные мышцы, эритроциты, тромбоциты, лимфатические узлы	Инфаркт миокарда, гемолиз, паренхиматозные заболевания печени, острые пневмония, злокачественные новообразования
Липаза	Поджелудочная железа	Патология поджелудочной железы
Щелочная фосфатаза (ЩФ)	Печень, кость, слизистая кишечника.	Патология костной ткани, патология гепатобилиарного тракта

Диагностическая значимость изоферментов ЛДГ.

Патология	Изоферменты в крови	Примечания
инфаркт миокарда	$ЛДГ_1$↑ и частично $ЛДГ_2$↑	Изменения активности изоферментов в крови сохраняются дольше, чем изменения суммарной активности ЛДГ
гепатит	$ЛДГ_5$↑ $ЛДГ_4$↑ $ЛДГ_1$↓ $ЛДГ_2$↓	
цирроз печени	$ЛДГ_5$↑ $ЛДГ_4$↑	
калькулезный холецистит, обтурационная желтуха опухолевого происхождения	ЛДГ5↑	
миопатия	$ЛДГ_1$↑, $ЛДГ_2$↑, $ЛДГ_3$↑, $ЛДГ_4$↓, $ЛДГ_5$↓	Снижение активности … соответствует тяжести заболевания
лейкозы	$ЛДГ_2$↑, $ЛДГ_3$↑,	В сыворотке крови и в лейкоцитах увеличение активности изоферментов параллельно увеличению количества незрелых клеток
опухолевой процесс	$ЛДГ_3$↑, $ЛДГ_4$↑, $ЛДГ_5$↑	Изменения в спектре изоферментов зависят от активности метастазирования
заболевания легких	$ЛДГ_3$↑	При выраженной гипоксии иногда увеличивается

Аминотрансферазы

Аминотрансферазы принимают участие в переаминировании аминокислот. Диагностически значимы:

- аспартатаминотрансфераза (КФ 2.6.1.1) – АСТ
- аланинаминотрансфераза (КФ 2.6.1.2) – АЛТ

Клеточные ферменты - аминотрансферазы встречаются во всех органах и тканях. Большое количество АСТ содержится в эритроцитах, поэтому для определения активности трансфераз в сыворотке гемолизированная

кровь не используется. Активность ферментов определяется хроматографическими, спектрофотометрическими и колориметрическими методами. Диагностически значимым при определении активности трансфераз является коэффициент де Ритиса АСТ/АЛТ, изменение которого характерно для патологических процессов.

Глутаматдегидрогеназа (КФ 1.4.1.2) – ГлДГ.

Катализирует превращение глутамата в альфа-кетоглутарат. Фермент локализован в митохондриях и определяется при диагностике заболеваний печени. Отношение активности двух ферментов: сорбитолдегидрогеназы и глутаматдегидрогеназы СДГ/ГлДГ может быть использовано для дифференциальной диагностики желтух. В норме в сыворотке крови фермент практически отсутствует, его активность в сыворотке повышается при повреждении гепатоцитов. При патологиях, некрозом печеночной ткани, активность ферментов резко увеличивается. Аналогичный эффект вызывает отравление гепатогенными ядами.

Патология	Фермент	Примечания
инфаркт миокарда	АСТ повышение	через 6-12 часов после возникновения инфаркта. Максимум повышения концентрации наблюдается через 24-48 часов. Возвращается к норме через 4-5 дней. Возрастает с увеличением размера очага и некроза
	АЛТ повышение	повышение активности менее резко выражено
стенокардия	АСТ повышение	в пределах нормы за исключением тяжелых приступов
заболевания печени	АЛТ повышение	первым появляется в крови, активность возрастает при инфекционном гепатите, активность возрастает в инкубационном периоде, максимум увеличения приходится на 6-10 день заболевания.
	АСТ повышение	появляется при углублении деструктивных процессов в клетках

Сорбитолдегидрогеназа (КФ 1.1.1.14) – СДГ.

Катализирует превращение сорбитола во фруктозу, обладает органоспецифичностью – содержится в основном в печени, простате, почках. Имеет диагностическое значение при оценке поражения печени. При всех формах острого гепатита в первые 10 дней растет активность этого фермента, поэтому он удобен для ранней диагностики. При хроническом гепатите и циррозе печени увеличение активности фермента характерно для периода обострения заболевания. При механических желтухах – повышение активности фермента регистрируется в первые недели желтушного периода.

γ-Глутамилтранспептидаза (КФ 2.3.2.2) – ГГТП.

γ-Глутамилтранспептидаза катализирует образование новых γ-глутамилпептидов за счет переноса γ-глутамилтранспептидного остатка. Увеличение активности фермента в крови регистрируется при патологии печени разного генеза, наиболее выражено отклонение активности фермента от нормы при циррозе печени алкогольного происхождения.

Активность может также быть увеличена при остром инфаркте миокарда, опухолях головки поджелудочной железы. Активность ферментов в крови таким образом часто определяется сопутствующими заболеваниями.

Превышение нормальных величин активности ГГТП в крови:

Более, чем в 10 раз	В 5-10 раз	Менее, чем в 5 раз
Алкогольное поражение печени Холестаз Рак головки поджелудочной железы	Гепатит Цирроз Заболевания печени Панкреатит	Алкоголизм Отравления Хроническая сердечная недостаточность

Холиноэстераза – ХЭ.

Различают два типа ферментов (ХЭ): одна группа – это истинная ХЭ (ацетилхолинэстераза КФ 3.1.1.7), вторая - псевдохолиноэстеразы (КФ 3.1.1.8), отличающиеся более широкой субстратной специфичностью.

Повышение активности ХЭ в сыворотке крови наблюдается при тяжелой форме болезни Боткина (на протяжение всего желтушного периода). Увеличение активности наблюдается также при циррозе печени, при онкологических заболеваниях, в случае метастазирования в печень, нефротическом синдроме, бронхиальной астме, ревматическом эндокардите.

Миорелаксанты могут приводить к длительному выраженному снижению ХЭ.

Ингибирование ХЭ имеет место при отравлении пестицидами, инсектицидами, фосфорорганическими соединениями. При интоксикации угнетение активности ХЭ в сыворотке крови наступает уже при низких дозах яда, и оценивается как один из первых симптомов интоксикации, что и является результатом

изменения активности синтеза белков в печени. Гипоферментемия регистрируется при тяжелых инфекционных заболеваниях, мышечной дистрофии, недостаточности питания.

Креатинкиназа (КФ 2.7.3.2) – КК.

Креатинкиназа– фермент, который присутствует в тканях, нуждающихся в больших количествах энергии в малые промежутки времени. Фермент определяется колориметрически и спектрофотометрически в сыворотке крови. Для определения изоформ может быть использован метод электрофореза или колоночной хроматографии.

Изоферменты КК:

1. ВВ – изофермент мозгового типа, обладает наибольшей подвижностью в электрическом поле;
2. ВМ – изофермент, содержащийся преимущественно в сердечной мышце, обладает наименьшей подвижностью при электрофорезе;
3. ММ – изофермент, характерный для скелетной мускулатуры.

Активность фермента возрастает:

- при повреждении скелетной мускулатуры;
- при прогрессирующей мышечной дистрофии (изоформа ММ)
- при остром инфаркте миокарда (изоформа МВ), при этом возрастание активности фермента обнаруживается через 3-4 часа после начала заболевания, опережая изменения других ферментов, но не повышается при инфаркте легкого или поражении паренхимы печени, и достигает максимума активности через 18-24 часа;
- при заболеваниях центральной нервной системы, таких как шизофрения, маниакально-депрессивный психоз и других (изоформа ВВ).

На активность фермента могут влиять анестезирующие средства, и изменение активности КК может быть зарегистрировано в послеоперационном периоде.

Щелочная фосфатаза (КФ 3.1.3.1) – ЩФ.

Щелочная фосфатаза активна при pH = 8,6-10,1 и сосредоточена в основном в костной ткани, слизистой кишечника, почках, печени.

Активность фермента определяется по используемому субстрату и отщепившемуся в результате реакции неорганическому фосфату или органическому соединению.

Около 10.фосфаты, бораты, оксалаты подавляют активность ферментов

Активность фермента в сыворотке крови у детей выше, чем у взрослых за счет высокой функциональной активности остеобластов. Активность фермента повышается при рахите, остеосаркомах, болезни Педжета, при метастазах опухолей в костную ткань.

Значительное возрастание активности фермента отмечается при патологии гепатобилиарной системы при желтухах различного генеза.

Фермент представлен в сывороткае несколькими изоформами (ИзФ), что может быть использовано для диагностики заболеваний печени и костной системы:

Наибольшее диагностическое значение имеют

Костная Изф- характеризует патологию костных систем, активность фермента заметно повышена при усиленном росте костей, рахите, гиперпаратиреозе, опухолях костей, переломе. Определение костной ИЗФ наиболее рационально радиоиммунными и изоферментными методами.

Печеночная Изф- представлена двумя изоферментами, активность которых повышается при гепатоцелмолярном раке печени, при васкулитах, а также в период беременности.

Кишечная Изф- может быть увеличена у лиц 1 и 3 групп крови при патологиях кишечника, сопровождающихся нарушениями всасывания.

Почечная Изф экскрентируется с мочой и также может быть использована в диагностике заболеваний почек

Кислая фосфатаза (КФ 3.11.3.3) – КФ.

Оптимум pH для этого фермента 5,0-5,5. Большое количество КФ содержится в предстательной железе человека. Активность фермента определяет состояние предстательной железы, ее сохранность и повышается при опухолевых процессах.

Диагностическая значимость ферментов

фермент	Повышение активности в сыворотке	Понижение активности в сыворотке	Примечание
Аспартатамин отрансфераза АСТ	Инфаркт миокарда Цирроз печени Мышечная дистрофия Дерматомиозит Опухоли печени	Авитаминоз В6 Почечная недостаточность Беременность Повторный гемодиализ	
Аланиламинот рансфераза	Цирроз печени Опухоли печени	Авитаминоз В6 Почечная	

АЛТ	Метастазы в печени Острый инфекционный гепатит	недостаточность Беременность Повторный гемодиализ	
Альфа-амилаза сыворотки	Острый панкреатит Киста поджелудочной железы Закупорка протока поджелудочной железы В случае почечной недостаточности, диабетического ацидоза, воспаления поджелудочной железы на фоне перфорации пептической язвы	Острый и хронический гепатит Недостаточность поджелудочной железы Токсикоз при беременности	
Креатинкиназа (КК)	Инфаркт миокарда Травма мышц Мышечная дистрофия Полимиозит, отравления Гипотиреоз Инсульт		Фермент нестабилен, сыворотку необходимо быстро отделить от сгустка, возможно замораживание
Изофермент КК ММ	Заболевания мышц Дистрофия Гипотиреоз Дерматомиозит. Состояния Рабдомиолиз, Рак, болезни печени. Физическая нагрузка		
Изофермент КК МВ	Инфаркт миокарда Рабдомиолиз Тяжелые поражения мышц Пятнистая лихорадка скалистых гор		
Изофермент ВВ	Тяжелый шок, роды Некоторые формы рака (легкие, молочная железа, яичники, простата) Заболевания соединительных тканей		
Гамма- глутамилтранспептидаза ГГТП	Алкогольная интоксикация Острый инфекционный, токсический гепатит Хронический или подострый гепатит Патология гепатобилиарной системы Опухоли печени		Высокочувствительный критерий состояния печени
Липаза (сыворотки)	Острый и хронический в стадии обострения панкреатит Закупорка протока поджелудочной железы		Образец может храниться замороженным до суток Повышенная активность сохраняется дольше, чем у амилазы, в моче не

			обнаруживается
Лактатдегидрогеназа (ЛДГ)	Некроз тканей Гемолитические анемии В12-дефицитная анемия Эритремия Острый инфекционный гепатит (острая фаза) Острые повреждения эритроцитов, почек, мышц, печени, легких, кожи		Нельзя использовать гемолизированную кровь Определению активности фермента мешает гепарин и оксалат

Кислая фосфатаза (КФ)	Карцинома простаты Болезнь Гоше Злокачественные поражения костей		Нельзя брать кровь в течение 24 часов после массажа простаты или ее инструментального исследования Активность фермента быстро падает Необходимо исключить гемолиз
Щелочная фосфатаза (ЩФ)	У детей (нормальный рост костей) Костные заболевания, связанные с увеличением количества остеобластов Гиперпаратиреоз Рахит Остеомаляция Опухоли костей Закупорка желчных протоков Заболевания печени, вызванныелекарствам и беременность	Гипотиреоз Замедленный рост у детей	Хранить в холодильнике сыворотку не более 48 часов Нельзя использовать фтористые соединения и оксалат

I. Перечень вопросов для проверки конечного уровня знаний:

1.Классификация ферментов.

2.Значение энзимодиагностики в медицине.

3.Гипер, -гипо, -дисферментопатии.

4.Энзимодиагностика заболеваний сердца, маркеры.

5. Энзимодиагностика заболеваний печени, маркеры.

6. Энзимодиагностика заболеваний поджелудочной железы, маркеры.

II. Самостоятельная работа обучающихся: составить ментальную карту по теме: «Энзимодиагностика заболеваний сердца, печени и поджелудочной железы».

III. Список используемой литературы:

Обязательная:

1.Е.С. Северин «Биохимия», Москва 2004;

2.Е.С. Северин «Биохимия с упражнениями и задачами», Москва 2008;

Дополнительная:

1.Интернет ресурсы

2.Материал конспектов занятия

Тема: Гипертиреоз: биохимические основы ведущих симтомов.

Диффузный токсический зоб, или аутоиммунный гипертироз – заболевание, обусловленное избыточной секрецией тироидных гормонов диффузно увеличенной щитовидной железой. Это наиболее частое заболевание, которое проявляется синдромом тиротоксикоза и на долю которого приходится до 80% всех его случаев.

В литературе довольно часто используют как синонимы термины “диффузный токсический зоб” и “тиротоксикоз”, или “гипертироз”. Однако эти понятия неоднозначны. Термин “тиротоксикоз” применим к патологическому состоянию, клинические и биохимические проявления которого связаны с избытком содержания тироидных гормонов в крови. К тиротоксикозу относятся также состояния, при которых имеются клинические и биохимические проявления избыточного содержания тироидных гормонов в крови без учета генеза повышения их уровня. Термин “гипертироз” правомерен в тех случаях, когда высокое содержание тироидных гормонов в крови является следствием повышенной их секреции.

Тиротоксикоз (гипертироз) – синдром, наличие которого связано с повышенным содержанием тироидных гормонов в крови, что встречается при различных заболеваниях или экзогенном избыточном поступлении тироидных гормонов. Тиротоксикоз наблюдается при диффузном токсическом зобе, многоузловом токсическом зобе, тиротоксической аденоме, подостром тироидите (первые 1-2 недели), послеродовом (немом) тироидите, аутоиммунном тироидите (гипертироидная его фаза – ”хаситоксикоз”), тироидите, развившимся после экспозиции ионизирующей радиации, тиротропиноме, синдроме нерегулируемой секреции ТТГ, фолликулярном раке щитовидной железы и его метастазах, эктопированном зобе (струма яичника), избыточном приеме йода (йод-базедова болезнь), трофобластических опухолях, секретирующих хорионический гонадотропин, ятрогенном и “искусственном или условном” тиротоксикозе.

Применение чувствительных методов определения ТТГ в сыворотке крови (третье поколение методов определения) позволило предложить термин “субклинический гипертироз”. Это состояние определяется как субнормальное (ниже нижней границы нормы) или “угнетенное” содержание ТТГ при нормальном уровне Т3 и Т4 в сыворотке крови. Однако следует иметь в виду, что снижение содержания ТТГ в сыворотке крови может быть вызвано другими причинами (применение глюкокортикоидов, различные хронические заболевания, нарушение функции гипофиза м др.). Основанием для диагноза субклинического гипертироза служит, как указано выше, выявление низкого содержания ТТГ при определении его уровня с помощью высокочувствительных методов. Многочисленные публикации отмечают, что субклинический гипертироз может встречаться при многоузловом токсическом зобе, тиротоксической аденоме. При выявлении такого состояния рекомендуется та же терапия, что и при лечении диффузного токсического зоба. По нашему мнению, необходима большая осторожность для установления такого диагноза и особенно назначения соответствующей терапии. Необходимо, во-первых, полностью исключить возможность угнетения секреции ТТГ под влиянием экзогенных и других причин. Во-вторых, перед окончательным решением о соответствующем диагнозе следует повторить лабораторное исследование уровня перечисленных гормонов. В-третьих, следует иметь в виду, что снижение ТТГ при нормальном значении тироидных гормонов в крови может быть при таких заболевания щитовидной железы, при которых сохраняется интактной система обратной связи регуляции синтеза и секреции гормонов щитовидной железы.

Диффузный токсический зоб чаще встречается у женщин, однако у мужчин это заболевание чаще сочетается с офтальмопатией или претибиальной микседемой. Офтальмопатия и претибиальная микседема встречаются не более чем у 5% лиц с диффузным токсическим зобом.

Этиология и патогенез. Диффузный токсический зоб – аутоиммунное заболевание и развивается у лиц с наследственной предрасположенностью. По мнению одних авторов, он наследуется аутосомно-рецессивным, по мнению других – аутосомно-доминантным путем. Вероятнее всего имеет место многофакторный (полигенный) тип наследования.

Длительное время к ведущим этиологическим факторам, вызывающим развитие этого заболевания, относили инфекцию и психическую травму. Предполагалось, что влияние ЦНС на повышение функции щитовидной железы опосредуется через гипоталамус и усиление секреции ТТГ. Однако нормальный или сниженный уровень этого гормона в сыворотке крови таких больных и нормальная гистологическая структура передней доли гипофиза (отсутствие гиперплазии тиротрофов) свидетельствуют, что повышенная функция щитовидной железы при этом заболевании обусловлена другим механизмом.

За последние 20-25 лет были получены экспериментальные и клинические данные, показывающие, что диффузный токсический зоб имеет аутоиммунные механизмы развития и относится к болезням, при которых выявляется иммунологическая недостаточность (диффузный токсический зоб, аутоиммунный тироидит и идиопатическая тромбоцитопеническая пурпура, миастения /myasthenia gravis/, ревматические заболевания, хронический гепатит, аутоиммунный орхит, неспецифический язвенный колит и др.). У родственников лиц, страдающих заболеваниями щитовидной железы (диффузный токсический зоб, идиопатическая микседема, аутоиммунный тироидит), при обследовании выявляется повышение титра антител к различным компонентам щитовидной железы, а также антител к другим органоспецифическим

антигенам (желудка, надпочечников, яичника и др.) по сравнению с лицами, не страдающими заболеваниями щитовидной железы. Генетические исследования показывают, что если один из монозиготных близнецов болен диффузным токсическим зобом, то для другого риск заболевания составляет 60%; в случае дизиготных пар этот риск равен лишь 9%.

Изучение антигенов гистосовместимости (HLA-антигенов) показало, что чаще всего диффузный токсический зоб сочетается с носительством HLA-B8. F.C. Grumet и соавт. (1974) впервые показали, что у больных с диффузным токсическим зобом ген HLA-B8 встречался почти в 2 раза чаще по сравнению с практически здоровыми лицами. В последующем эти данные были подтверждены и другими исследователями. Изучение локуса D в системе гистосовместимости у больных диффузным токсическим зобом показало, что наличие HLA-Dw3 и HLA-DR3 увеличивает риск заболевания в 3,86 и 5,9 раза соответственно по сравнению с наличием HLA-B8. Исследования последних лет позволили установить наиболее частое сочетание диффузного токсического зоба с генами HLA – DQA1*0501 (T. Yanagawa и соавт., 1993).

При диффузном токсическом зобе в сочетании с офтальмопатией выявлено увеличение частоты генов HLA-B8, HLA-Cw3 и HLA-DR3. Носительство последнего сопряжено с увеличением относительного риска развития офтальмопатии в 3,8 раза.

Первой работой, показавшей иммунный генез диффузного токсического зоба, было сообщение Адамса и Пурвеса (1956), которые установили, что у больных с диффузным токсическим зобом в сыворотке крови содержится вещество, способное стимулировать функцию щитовидной железы белых мышей в течение более длительного времени, чем это наблюдается под влиянием ТТГ. За это его действие оно было названо ЛАТС (LATS – long-acting thyroid stimulator). Однако прошло более 5 лет, прежде чем этот факт привлек внимание клиницистов и физиологов и явился толчком к проведению многочисленных исследований по выяснению структуры ЛАТС, механизма его действия и наличия в сыворотке крови при различной патологии щитовидной железы.

Было установлено, что ЛАТС является иммуноглобулином с мол. м.150 кД. Изучение уровня ЛАТС в сыворотке крови больных с диффузным токсическим зобом показало, что повышенный уровень ЛАТС наблюдается лишь у 45-50%, а при сочетании диффузного токсического зоба с экзофтальмом и претибиальной микседемой – у 80-90%. Оказалось, что уровень ЛАТС в сыворотке крови не коррелировал ни с тяжестью тиротоксикоза, ни с выраженностью офтальмопатии. Эти данные позволили усомниться в том, что только один ЛАТС ответствен за развитие диффузного токсического зоба, и стимулировали исследования, результатом которых в свою очередь явились новые методы определения тироидстимулирующих антител (см. ”Диагностика заболеваний щитовидной железы”).

В основе всех существующих методов определения тироидстимулирующих антител лежит их способность комплексироваться с рецептором к ТТГ. Ген рецептора к ТТГ локализуется на 14-й хромосоме (14q31) и кодирует полипептид, состоящий из 764 аминокислот. Апопротеиновый кор рецептора ТТГ имеет мол. м. 84,5 кD. Рецептор ТТГ имеет 7 трансмембранных фрагментов. Внеклеточный фрагмент рецептора способен комплексироваться с ТТГ и тироидстимулирующими антителами. Рецептор ТТГ является гликопротеидом, содержащим 30% углеводов и 10% нейраминовой кислоты, наличие которой необходимо для комплексирования ТТГ с рецептором. Взаимодействие ТТГ с олигосахаридным компонентом рецептора вызывает конформационные изменения гормона, ведущие к транслокации а-субъединицы ТТГ внутрь мембраны с активацией G-белка, активации аденилатциклазы и последующих серий реакций, характерных для действия ТТГ. Кроме того, у человека ТТГ активирует фосфолипазу С рецептора, результатом чего является повышение образования диацилглицерина и инозитолтрифосфата, являющихся также вторичными мессенджерами и принимающими участие в механизмах биологического действия ТТГ.

Механизм действия различных тироидстимулирующих антител и ТТГ на рецептор ТТГ в некоторых аспектах одинаков (схема 22).

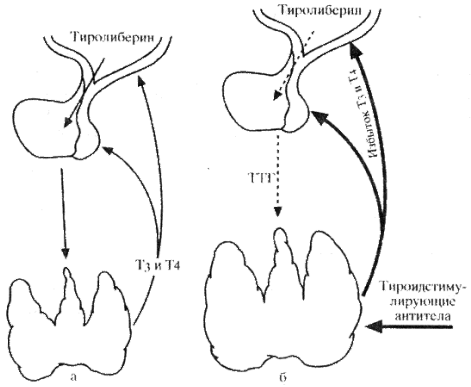


Схема 22. Регуляция функции щитовидной железы в норме (а) и при диффузном токсическом зобе (б).

Стимулирующее действие ЛАТС, ЛАТС-протектора, стимулятора щитовидной железы человека опосредуется через повышение образования количества цАМФ и далее путем увеличения биосинтеза и высвобождения тироидных гормонов, т.е. через тот же механизм, который известен для действия ТТГ. Как показали исследования E. Laurent и соавт. (1991), тироидстимулирующие антитела не влияют на активирование фосфолипазы С, а только стимулируют аденилатциклазу и образование цАМФ. Тем не менее исследования на клетках яичника китайского хомячка с рекомбинантным рецептором ТТГ продемонстрировали, что в этих условиях тироидстимулирующие антитела активировали как аденилатциклазу, так и фосфолипазу С (J. Van Sande и соавт., 1992), вызывая такие же конформационные изменения рецептора, как и при действии ТТГ.

Иммуноглобулины, угнетающие связывание ТТГ с рецептором, выявляются у некоторых больных с аутоиммунной (отечной) офтальмопатией при эутироидном и гипотироидном состоянии. Как указывалось выше, в отдельных случаях отсутствует взаимосвязь между уровнем антител к рецептору ТТГ и функциональной активностью щитовидной железы. Это несоответствие между уровнем тироидстимулирующих иммуноглобулинов в крови и функциональным состоянием щитовидной железы, вероятно, можно объяснить наличием иммуноглобулинов, оказывающих как стимулирующее действие на функцию щитовидной железы, так и не обладающих такими свойствами. По этим свойствам антитела к рецептору ТТГ можно разделить на два типа: стимулирующие аденилатциклазу и не стимулирующие, которые, взаимодействуя со щитовидной железой, блокируют рецептор, и такая щитовидная железа становится рефрактерной к действию ТТГ. Такой тип антител (ТТГ-ингибирующий или ТТГ-антагонистический тип) приводит к снижению биосинтеза тироидных гормонов и развитию гипотироза.
При диффузном токсическом зобе и особенно при аутоиммунном тироидите в щитовидной железе выявляется лимфоидная инфильтрация. Лимфоциты и плазматические клетки продуцируют антитела, часть которых взаимодействует с рецептором ТТГ, а возможно, и с другими структурами мембраны и лишь после этого – с рецепторами к ТТГ. Только часть образовавшихся антител попадает в лимфатическое и кровяное русло. Выявляются они различными методами исследования (см. выше).
Тироидстимулирующие иммуноглобулины принадлежат к классу G. При обработке протеолитическими ферментами этих антител удалось установить, какая часть молекулы отвечает за связывание ТТГ с рецепторами и какая – за стимулирующее действие на щитовидную железу.
К настоящему времени антиген, к которому при диффузном токсическом зобе образуются тироидстимулирующие антитела, не установлен. Однако показано, что образование тироидстимулирующих иммуноглобулинов лимфоцитами, взятыми от больных с диффузным токсическим зобом, стимулируется гомогенатами нормальной щитовидной железы человека.
Таким образом, наличие в сыворотке крови больных различных тироидстимулирующих иммуноглобулинов не объясняет полностью патогенез диффузного токсического зоба. Надо полагать, что в механизме его развития, помимо гуморального иммунитета, большое место занимают нарушения клеточно-опосредованного иммунитета.
Установлено, что при диффузном токсическом зобе значительно снижена супрессорная активность мононуклеарных клеток периферической крови, подобно тому, как это имеет место у больных системной красной волчанкой. У больных аутоиммунным тироидитом и раком щитовидной железы супрессорная функция лимфоцитов не была изменена по сравнению с группой практически здоровых лиц. Сниженная супрессорная функция лимфоцитов у больных с диффузным токсическим зобом не восстанавливается до уровня, наблюдаемого в группе практически здоровых лиц даже после достижения у них эутироидного состояния в результате применения тиростатических препаратов. Эта сниженная активность Т-супрессоров является врожденным специфическим нарушением у лиц, предрасположенных к развитию этого заболевания.

В соответствии с теорией Вольпе (1978), аутоиммунные заболевания (аутоиммунный тироидит, диффузный токсический зоб) развиваются в организме, имеющем дефект в системе “иммунологического выживания”. В этих условиях выживают и пролиферируют Т-лимфоциты, возникающие в результате спонтанной мутации и обладающие способностью реагировать с органоспецифическими антигенами (антигены щитовидной железы), т.е. появляются форбидные (“запрещенные”) клоны Т-лимфоцитов. Это обусловлено снижением другой субпопуляции Т-лимфоцитов Т-супрессоров, количество которых у больных диффузным токсическим зобом снижено. Некоторые из этих Т-лимфоцитов ведут себя как Т-помощники (хельперы) и, взаимодействуя с В-лимфоцитами, способствуют образованию ими органоспецифических антител. В одном случае такие подтипы Т- и В-лимфоцитов вовлечены в образование иммуноглобулинов, не оказывающих стимулирующего влияния на функцию щитовидной железы (аутоиммунный тироидит), в другом – в образование иммуноглобулинов, способных оказывать такое действие (диффузный токсический зоб).

Кроме того, Т-лимфоциты могут непосредственно участвовать в цитотоксических процессах (цитотоксические Т-лимфоциты) или продуцировать низкомолекулярные вещества – лимфокины, опосредующие иммунный ответ, например, фактор, подавляющий миграцию лейкоцитов, секретируемый Т-

лимфоцитами при условии повторного контакта их с антигеном, к которому ранее эти лимфоциты были сенсибилизированы. К лимфокинам относятся также и другие специфические белки: интерлейкины, интерферон, фактор некроза опухолей, которые принимают, как показано исследованиями последних лет, непосредственное участие в механизмах иммунного ответа.

Иммуноглобулины сыворотки крови больных с диффузным токсическим зобом и офтальмопатией могут вызывать у экспериментальных животных экзофтальм в отличие от иммуноглобулинов больных, у которых диффузный токсический зоб протекает без офтальмопатии (R. Stienne и соавт., 1976). Эти и другие данные послужили основанием для вывода о том, что диффузный токсический зоб и аутоиммунная (отечная) офтальмопатия являются двумя различными аутоиммунными заболеваниями, которые могут развиваться у одного и того же больного. Кроме того, антиген щитовидной железы больных диффузным токсическим зобом и антиген из ретроорбитальных мыщц больных офтальмопатией в случае применения их в пробе на угнетение (ингибицию) миграции лейкоцитов проявляют себя по-разному.

Образующийся на мембране тироцита комплекс антиген-антитело-комплемент обладает цитотоксическими свойствами, что приводит к повреждению щитовидной железы. Клетки-убийцы (киллеры, К-клетки), взаимодействуя с клетками-мишенями, которые прореагировали с иммуноглобулинами, осуществляют деструкцию этих клеток. Возникает как бы замкнутая патологическая цепная реакция, конечным результатом которой является в одном случае диффузный токсический зоб, в другом – аутоиммунный тироидит. Роль аутоиммунных механизмов в развитии диффузного токсического зоба подтверждается сочетанием заболевания с носительством антигенов HLA-B8 и HLA-Dw3 иHLA-DR3, которые располагаются на шестой хромосоме рядом с геном, отвечающим за иммунореактивность организма.

Проведенные к настоящему времени многочисленные исследования по уточнению механизма патогенеза диффузного токсического зоба позволили получить данные, проливающие свет на патогенез диффузного токсического зоба, которые объясняют лишь отдельные звенья, но не весь механизм образования антител к рецептору ТТГ.

Как отмечалось выше, наличие врожденной недостаточности антигенспецифических Т-супрессоров создает нарушение равновесия между субпопуляциями Т-лимфоцитов и условия, при которых происходит нерегулируемый синтез тироидстимулирующих антител. Этому способствует нарушенная реакция угнетения миграции макрофагов и лимфоцитов, наблюдаемая у больных диффузным токсическим зобом.

A. Weetman и соавт. (1985) считают, что первичный дефект имеется в тироцитах, способнх экспрессировать антигены II класса (HLA-DR), активируя таким образом Т-хельперы с последующим образованием тироидстимулирующих антител. Однако не исключено, что экспрессия генов HLA-DR является вторичной в ответ на образование лимфоцитами интерлейкина-2.

Еще в 1974 г. N.K. Jerne и соавт. высказали предположение о том, что первичное наличие антител (иммуноглобулинов) к антигенам щитовидной железы приводит к инициации образования вторичных антител – антиидиотипических антител, которые комплексируются с рецептором ТТГ и оказывают стимулирующее влияние на функцию щитовидной железы. Такие антиидиотипические антитела, комплексируясь с рецептором ТТГ, опосредуют (осуществляют) связывание как ТТГ, так и тироидстимулирующих антител.

Инициации образования антител к рецептору ТТГ могут способствовать некоторые бактерии, в частности, Yersinia enterocolitica, которая обладает способностью специфически комплексироваться с ТТГ (M. Weiss и соавт. 1983). Было показано, что помимо Yersinia enterocolitica, другие бактерии, например, микоплазма (J. Sack и соавт. 1989), также имеют белковую структуру (ТТГ-подобный рецептор), которая способна комплексироваться с ТТГ, что и инициирует образование антител к рецептору ТТГ. Не исключено, что перечисленные бактерии способны взаимодействовать с ТТГ рецептором и инициировать образование соответствующих антител лишь при участии макрофагов и лимфокинов, секретируемых этими макрофагами.

В литературе, посвященной диффузному токсическому зобу, неоднократно подчеркивалась роль психической травмы, эмоционального стресса в развитии заболевания. Многолетние наблюдения позволили В. Г. Баранову (1977) сформулировать представление о нейроциркуляторной дистонии как предстадии диффузного токсического зоба. Нейроциркуляторная или вегетососудистая дистония является самостоятельным заболеванием, имеет ряд симптомов (раздражительность, общую слабость, быструю утомляемость, сердцебиение и др.), которые присутствуют при легком тиротоксикозе. Однако патогенетически это два самостоятельных заболевания. Более того, проведенные в различных странах

эпидемиологические исследования не подтверждают того, что эмоциональный стресс может играть этиологическую роль в развитии диффузного токсического зоба.

И все же следует иметь в виду, что при стрессе повышается секреция гормонов мозгового вещества надпочечников (адреналин и норадреналин), которые, как известно, увеличивают скорость синтеза и секреции тироидных гормонов. С другой стороны, стресс активирует гипоталамо-гипофизарную систему, усиливает секрецию кортизола, ТТГ, что может служить триггером – пусковым моментом в механизме развития диффузного токсического зоба. По мнению большинства исследователей, эмоциональный стресс участвует в развитии диффузного токсического зоба путем влияния на иммунную систему организма. Установлено, что эмоциональный стресс приводит к атрофии вилочковой железы, снижает образование антител, уменьшает концентрацию интерферона в сыворотке крови, повышает предрасположенность к инфекционным заболеваниям, увеличивает частоту аутоиммунных заболеваний и рака.

Симпатическая нервная система, имеющая адренергические рецепторы на капиллярах, тесно соприкасающихся с мембранами фолликулов щитовидной железы, может принимать участие в изменении биогенных аминов или изменять отдельные белки, являющиеся компонентами мембраны. В организме с нарушенной иммунной системой такие повторные изменения могут вызывать различные аутоиммунные реакции.

Нельзя исключить роль различных вирусов, которые, взаимодействуя с белками мембраны тироцита и образуя иммунные комплексы, могут стимулировать синтез антител к макрокомплексу “вирус-антитела к нему-мембрана тироцита” или, нарушая структуру белка отдельных участков мембраны, изменяют таким образом ее антигенные свойства. Выше отмечалась роль микоплазмы и Yersinia enterocolitica в инициации образования антител к рецептору ТТГ. И в том, и в другом случае вирус или бактерии являются триггером аутоиммунной реакции. Патогенез диффузного токсического зоба представлен на схеме 23.

Клиническая картина. Больные с диффузным токсическим зобом предъявляют жалобы на общую слабость, повышенную раздражительность, нервозность и легкую возбудимость, нарушение сна, иногда бессонницу, потливость, плохую переносимость повышенной температуры окружающей среды, сердцебиения, иногда боли в области сердца колющего или сжимающего характера, повышенный аппетит и, несмотря на это, похудание, диарею.

Щитовидная железа диффузно увеличена, но степень ее увеличения часто не соответствует тяжести заболевания. Как правило, у мужчин при выраженной клинической форме диффузного токсического зоба щитовидная железа увеличена незначительно, пальпируется с трудом, так как увеличение происходит в основном за счет боковых долей железы, которые плотно прилегают к трахее. В большинстве случаев железа диффузно увеличена до II-III степени, плотная при пальпации, что может создавать впечатление узлового зоба, особенно при несимметричном ее увеличении. Кровоснабжение железы повышено, и при надавливании на нее фонендоскопом прослушивается систолический шум.

Существует несколько классификаций степени увеличения щитовидной железы. В нашей стране широко применяется классификация, предложенная О. В Николаевым в 1955 г. и незначительно модифицированная в последующем (О. В. Николаев, 1966). В соответствии с этим различают:
0-щитовидная железа не пальпируется;
I степень – пальпаторно определяется увеличение перешейка щитовидной железы;
II степень – пальпаторно определяются увеличенные боковые доли щитовидной железы;
III степень – визуально определяется увеличение щитовидной железы (“толстая шея”);
IV степень – значительное увеличение щитовидной железы (зоб ясно виден);
V степень – зоб огромных размеров.
I и II степень относят к увеличению щитовидной железы, а III-V степень увеличения щитовидной железы является собственно зобом.
Наряду с этим до последнего времени применялась и классификация, предложенная ВОЗ. В соответствии с этой классификацией различают следующие степени увеличения щитовидной железы: 0-щитовидная железа не пальпируется; Iа-щитовидная железа отчетливо пальпируется, но визуально не определяется; Iб-щитовидная железа пальпируется и определяется визуально в положении с запрокинутой головой; II-щитовидная железа определяется визуально при нормальном положении головы; III- зоб виден на расстоянии; IV- очень большой зоб.

В 1992 г. эта классификация была пересмотрена и предложено различать: 0 – зоб не виден и не пальпируется; I степень – на шее пальпируется образование, соответствующее увеличенной щитовидной железе, смещаемое при глотании, но не видимое при нормальном положении шеи; при этом в щитовидной

железе может пальпироваться один или несколько узлов, даже при неувеличенной щитовидной железе; II степень – щитовидная железа пальпируется и отчетливо видна при нормальном положении головы.

Развитие клинических признаков диффузного токсического зоба связано с избыточной секрецией тироидных гормонов и их влиянием на различные органы и ткани, в частности, с повышением образования тепла (калоригенное действие), увеличением потребления кислорода, что отчасти связано с разобщением окислительного фосфорилирования. Большинство эффектов избытка тироидных гормонов опосредуется через симпатическую нервную систему: тахикардия, тремор пальцев рук, языка, всего туловища (симптом телеграфного столба), потливость, раздражительность, чувство беспокойства и страха (рис. 19, см. вклейку).

Нарушения сердечно-сосудистой деятельности проявляются в виде тахикардии (пульс даже в период ночного сна более 80 в минуту), повышения систолического и снижения диастолического артериального давления (увеличение пульсового давления), приступов мерцательной аритмии, появления ее постоянной формы с развитием сердечной недостаточности. Тоны сердца громкие, на верхушке сердца прослушивается систолический шум. Сосуды кожи расширены (компенсаторная реакция для отдачи тепла), в связи с чем она теплая на ощупь, влажная. Помимо этого, на коже у некоторых больных выявляется витилиго, гиперпигментация складок кожи, особенно в местах трения (шея, поясница, локоть и др.), крапивница, следы расчесов (зуд кожи, особенно при присоединении поражения печени), на коже головы – алопеция (локальное выпадение волос). Сердечно-сосудистые изменения обусловлены действием избытка тироидных гормонов на сердечную мышцу, что приводит к нарушению многих внутриклеточных процессов (разобщение окислительного фосфорилирования и др.), формированию синдрома тиротоксического сердца.

При обследовании на ЭКГ, помимо синусовой тахикардии, может выявляться синусовая аритмия, высокий вольтаж зубцов, ускорение или замедление предсердно-желудочковой проводимости, отрицательный или двухфазный зубец Т, мерцательная аритмия.

У лиц пожилого возраста тиротоксикоз может проявляться исключительно приступами мерцательной аритмии, что представляет определенную трудность для диагностики заболевания. В межприступный период у таких больных общее состояние остается удовлетворительным и число сердечных сокращений может быть в пределах нормы. При этом клинические проявления сердечной недостаточности плохо поддаются лечению препаратами наперстянки. Исследование функции щитовидной железы, определение уровня тироидных гормонов в крови, проведение пробы с тиролиберином или угнетением с Т3 помогает своевременной диагностике диффузного токсического зоба у лиц старшего и пожилого возраста.

Повышенное образование тепла вследствие повышения обмена веществ под влиянием тироидных гормонов приводит к повышению температуры тела: больные отмечают постоянное чувство жара, ночью спят под одной простыней (симптом простыни).

Отмечается повышенный аппетит (у лиц пожилого возраста аппетит может быть снижен), жажда, нарушение функции желудочно-кишечного тракта, диарея, умеренное увеличение печени, а в некоторых случаях даже незначительно выраженная желтуха. При обследовании выявляются повышение активности аминотрансфераз и щелочной фосфатазы в сыворотке крови и избыточная задержка сульфобромфталеина. Больные худеют. В тяжелых случаях не только исчезает подкожный жировой слой, но и уменьшается объем мышц. Развивается мышечная слабость как следствие не только изменения мышц (катаболизм белка), но и поражения периферической нервной системы. При этом заболевании выявляется слабость мышц проксимальных отделов конечностей (тиротоксическая миопатия). Сравнительно редко развивается тиротоксический периодический паралич, который может продолжаться от нескольких минут до нескольких часов и даже дней. Более часто это состояние встречается у японских и китайских больных, страдающих диффузным токсическим зобом. В патогенезе его определенная роль отводится снижению концентрации калия в сыворотке крови. Прием препаратов калия иногда приводит к прерыванию этих симптомов и предупреждает появление новых приступов.

Глубокие сухожильные рефлексы повышены, выявляются тремор вытянутых пальцев рук, гиперкинезия (суетливость), у детей – хореоподобные подергивания. Иногда тремор рук настолько выражен, что больным с трудом удается застегнуть пуговицы, изменяется почерк и характерен симптом “блюдца” (при нахождении в руке пустой чашки на блюдце издается дребезжащий звук как результат мелкого тремора кистей рук).

Под влиянием тироидных гормонов наблюдаются изменения в костной системе. У детей происходит ускорение роста. Катаболическое действие гормонов приводит к потере белка костной ткани (матрица кости), что проявляется остеопорозом. Боли в области спины и в костях имеют “остеопоротическое” происхождение.

Нарушения функции ЦНС проявляются раздражительностью, беспокойством, повышенной возбудимостью, лабильностью настроения, потерей способности концентрировать внимание (больной переключается с одной мысли на другую), расстройства сна, иногда депрессия и даже психические реакции. Истинные психозы встречаются редко.

Нарушения функции половых желез проявляются в виде олиго- или аменореи, снижением фертильности. У мужчин появляется гинекомастия как следствие нарушения обмена половых гормонов в печени и изменения соотношения эстрогенов и андрогенов. Снижаются либидо и потенция. Кроме того, проведенные нами исследования (М.И. Балаболкин и Т.В Мохорт, 1983) показали, что у больных диффузным токсическим зобом имеется гиперпролактинемия, которая коррелирует с нарушениями функции половых желез.

Жажда и полиурия могут быть симптомами диабета в том случае, если у больного до заболевания была нарушена толерантность к глюкозе, а избыток тироидных гормонов способствует декомпенсации углеводного обмена вплоть до развития явного сахарного диабета.

При диффузном токсическом зобе в большинстве случаев имеются характерные изменения (блеск глаз и др.) со стороны глаз. Глазные щели расширены, что создает впечатление гневного, удивленного или испуганного взгляда. Широко расширенные глазные щели часто создают впечатление наличия экзофтальма. Однако экзофтальм характерен для офтальмопатии, которая нередко сочетается с диффузным токсическим зобом. Характерно редкое мигание (симптом Штельвага), пигментация век (симптом Еллинека), как правило, при длительном и тяжелом течении заболевания.

При взгляде вниз между верхним веком и радужной оболочкой появляется участок склеры (симптом Грефе). При взгляде вверх также обнаруживается участок склеры между нижним веком и радужкой (симптом Кохера). Нарушение конвергенции глазных яблок (симптом Мебиуса). При взгляде прямо иногда выявляется полоска склеры между верхним веком и радужной оболочкой (симптом Дельримпля). Развитие этих симптомов связано с усилением тонуса гладких мышечных волокон, участвующих в поднимании верхнего века, которые иннервируются симпатической нервной системой.

Аутоиммунная офтальмопатия – самостоятельное аутоиммунное заболевание, представляющее собой комплексное поражение тканей орбиты и сопровождающееся инфильтрацией, отеком и пролиферацией ретробульбарных мышц, клетчатки и соединительной ткани. В течение десятков лет офтальмопатия описывалась под названием отечного экзофтальма, злокачественного экзофтальма, нейродистрофического экзофтальма, орбитопатии, эндокринного экзофтальма, тиротоксического экзофтальма и др. Различные приведенные названия отражают попытку связать патогенез офтальмопатии с перечисленными состояниями. Лишь в последние годы удалось получить убедительные доказательства в пользу аутоиммунного генеза офтальмопатии. Аутоиммунная офтальмопатия может встречаться как самостоятельное, независимое от тиротоксикоза заболевание, в сочетании с диффузным токсическим зобом или с претибиальной микседемой. Описаны многочисленные сочетания аутоиммунной офтальмопатии с аутоиммунным тироидитом, протекающим с нормальной или пониженной функцией щитовидной железы. По данным различных авторов, частота аутоиммунной офтальмопатии в сочетании с диффузным токсическим зобом составляет от 5 до 20%. Применение для диагностики аутоиммунной офтальмопатии УЗИ, компьютерной или МР-томографии показало, что аутоиммунная офтальмопатия в различной степени ее проявления встречается более часто, чем считалось раньше, и ее распространенность составляет до 40-50% у больных, страдающих диффузным токсическим зобом.

Аутоиммунная офтальмопатия чаще встречается у мужчин, причем у лиц белой расы она встречается, по данным различных авторов, в 4-6 раз чаще, чем у азиатских индейцев, проживающих в тех же районах. Показано, что использование радиоактивного йода для лечения диффузного токсического зоба удваивает частоту развития аутоиммунной офтальмопатии, в то время как хирургическое лечение или медикаментозная терапия диффузного токсического зоба не являются факторами риска развития аутоиммунной офтальмопатии. Аутоиммунную офтальмопатию следует отличать от глазных симптомов, описанных выше и являющихся частью синдрома тиротоксикоза.

Характерным для аутоиммунной офтальмопатии является наличие экзофтальма и кроме этого больные предъявляют характерные жалобы на боли в глазных яблоках, ощущение “песка в глазах”, слезотечение, светобоязнь. Постоянно выявляются отечность век, инъекция сосудов склеры и новообразование сосудов (плохой прогностический признак). Как правило, экзофтальм при аутоиммунной офтальмопатии несколько асимметричный, может быть односторонним, сочетается с отеком, инфильтрацией век и конъюнктивитом (рис 20, см. вклейку). Отсутствует параллелизм в течении диффузного токсического зоба и офтальмопатии.

В норме протрузия глазного яблока составляет 16-19 мм. Различают три степени офтальмопатии, при которых протрузия глазного яблока увеличивается на 3-4 мм, 5-7 мм и свыше 8 мм соответственно. Американская ассоциация по заболеваниям щитовидной железы предлагает изменения глаз при диффузном токсическом зобе подразделять на следующие классы: “0” – отсутствие каких- либо изменений; 1-й класс – только ретракция верхнего века, которая достаточно выражена при наличии тиротоксикоза и спонтанно исчезает при эутироидном состоянии; 2-й класс – к указанным выше изменениям присоединяется отек мягких тканей (периорбитальный отек), иногда с отеком и покраснением конъюнктивы; 3-й класс – к перечисленным симптомам присоединяется экзофтальм и протрузия глазного яблока увеличивается на 3-4 мм; 4-й класс – увеличение протрузии глазного яблока на 5-7 мм по сравнению с нормой и вовлечение в воспалительный патологический процесс глазных мышц; 5-й класс – из-за выраженного экзофтальма в патологический процесс вовлекается роговица (кератит); 6-й класс – из-за изменений на глазном дне и вовлечения в процесс зрительного нерва наблюдается снижение остроты зрения.

Таким образом, в последней классификации к собственно офтальмопатии следует отнести классы 3-6, тогда как классы 0-2 следует относить к глазным симптомам тиротоксикоза.

При значительной офтальмопатии (III степени) глазные яблоки выступают из орбит, веки и конъюнктива отечны, воспалены, развивается кератит вследствие постоянного высыхания роговицы и ее изъязвления, что может приводить к развитию “бельма” и снижению зрения вплоть до полной слепоты.

Изменения при аутоиммунной офтальмопатии преимущественно наблюдаются в мышцах глазницы, а также в слезных железах и ретробульбарной жировой клетчатке. Вовлекаются в патологических процесс все структурные элементы орбиты. Выявляется местная лимфатическая инфильтрация и интерстициальный отек, особенно мышц, объем которых увеличивается в 7-10 раз по сравнению с нормой. Увеличение вследствие этого объема орбиты приводит к появлению экзофтальма. Изменения в начальном периоде развития офтальмопатии характеризуются преимущественно явлениями инфильтрации перечисленных тканей, а при длительном течении аутоиммунной офтальмопатии в пораженных тканях развиваются уже необратимые явления фиброза. Последний приводит к ограничению движений глазного яблока, прогрессированию экзофтальма, ухудшению зрения вследствие венозного застоя в сосудах сетчатки.

Описаны случаи окклюзии центральной вены сетчатки, нейропатия глазного нерва, а также потеря зрения вследствие механического сдавления глазного нерва отечной, увеличенной в объеме ретробульбарной клетчаткой. В.И. Мазуров и др. (1991) при обследовании с помощью компьютерной томографии выявили несколько вариантов патологических изменений в орбите: а) преимущественное увеличение объема глазодвигательных мышц, б) преимущественное увеличение объема ретробульбарной клетчатки, названное ими смешанный тип изменений, при котором выявляется увеличение почти в одинаковой степени и мышц, и клетчатки. Обследование орбит с помощью УЗИ выявляет увеличение протяженности ретробульбарного пространства, утолщение прямых глазодвигательных мышц и увеличение их акустической плотности. Ю.Т. Фишкина (1985) подчеркивает, что основным эхографическим признаком, отличающим стадию фиброза от инфильтративной стадии, является значительное увеличение акустической плотности мышц глаза. Повышенное ретробульбарное давление в результате лимфоидной инфильтрации, накопления жидкости и отека ретроорбитальных и ретробульбарных тканей не только приводит к выталкиванию глазного яблока из глазницы – экзофтальму, но и является причиной сдавления зрительного нерва с потерей зрения и может вызвать тромбоз вен сетчатки. Изменения в глазных мышцах приводят к диплопии.

Аутоиммунные механизмы развития офтальмопатии подтверждены многочисленными исследованиями. В мышцах глаза и ретробульбарной клетчатке имеет место характерная для аутоиммунных процессов инфильтрация CD4+ и CD8+ лимфоцитами и макрофагами. На фибробластах из тканей орбит выявляется экспрессия генов HLA II класса. Аутоактивированные лимфоциты CD4+ и CD8+ с участием макрофагов и различных цитокинов (g-интерферон, интерлейкин-1, фактор некроза опухолей, b-трансформирующий фактор роста, факторы, активирующие рост и функцию фибробластов, и др.) стимулируют местные фибробласты, которые усиливают синтез гликозамингликанов, являющихся гидрофобными структурами, что и способствует мощному отеку и увеличению объема тканей орбиты. Последние способствуют местной гипоксии, которая в свою очередь усиливает синтез гликозаминогликанов.

Роль клеточно-опосредованного и гуморального иммунитета в развитии аутоиммунной офтальмопатии неодинакова и зависит от профиля секретируемых цитокинов. Методом цепной полимеразной реакции McLachlan и. соавт. (1994) установили наличие 2 типов Т-хельперов в орбитальных тканях при диффузном токсическом зобе. Т-хельперы I типа секретируют g-интерферон, а Т-хельперы II типа – интерлейкин-4 и 5. Интерлейкин-10 в незначительных количествах секретируется Т-хельперами обоих типов. В патогенезе офтальмопатии, по мнению авторов, ключевая роль принадлежит интерлейкину-4, а не g-интерферону.

Пролиферация активированных Т-лимфоцитов стимулирует гуморальный иммунитет и образование антител к мышцам глазницы и фибробластам орбитальных тканей. Выявляются антитела к антигену с мол. м. 55, 64 и 95 кДа. При офтальмопатии, сочетающейся с диффузным токсическим зобом, в мышцах глаза, эндотелиальных и интерстициальных клетках выявляется экспрессия генов HLA-DR, но преимущественно гена белка-70 температурного шока.

Исследованиями последних лет установлено, что одним из антигенов, к которому образуются антитела при аутоиммунной офтальмопатии, является рецептор к ТТГ. Так, H. Burch и соавт. (1994), используя антисыворотку к высокоиммунной части рецептора ТТГ человека (последовательность аминокислот 352-367), идентифицировали методом иммуноблотинга несколько белков с мол. м. 95, 71 и 18 кДа, участвующих в патогенезе аутоиммунной офтальмопатии, сочетающейся с диффузным токсическим зобом. Другая группа исследователей (R. Pascke и соавт., 1994) в ретроорбитальных мышцах, фибробластах, мононуклеарных клетках крови обнаружили транскрипты рецептора ТТГ. Более того, имело место образование гликозаминогликанов в культуре фибробластов под влиянием бычьего ТТГ, тогда как рекомбинантный ТТГ человека, даже в высокой концентрации, не стимулировал синтез гликозаминогликанов. Высказано предположение о наличии в орбиталных тканях лишь экстраклеточной части рецептора к ТТГ, который проявляет свойства нефункционального аутоантигена. Эти данные соответствуют результатам других исследований, в которых показано, что фибробласты содержат РНК, кодирующую внеклеточный домен рецептора ТТГ, и что при аутоиммунной офтальмопатии удалось обнаружить точечную мутацию, ведущую к замене треонина на пролин в экстраклеточном домене рецептора ТТГ (R.S. Bahn и соавт., 1993; A. Feliciello и соавт., 1993; R. Bahn и соавт. 1994). Такой мутантный рецептор к ТТГ, выявляемый в фибробластах при офтальмопатии и претибиальной микседеме, сочетающейся с диффузным токсическим зобом, может иметь, по мнению авторов, уникальные иммуногенетические свойства и участвовать в патогенезе аутоиммунной офтальмопатии. Этот аутоантиген фибробластов может распознаваться лимфоцитами, направленными против рецептора ТТГ при диффузном токсическом зобе. Последующая инфильтрация тканей орбиты активированными цитокинпродуцирующими лимфоцитами сопровождается, вероятнее всего, избыточным синтезом гликозаминогликанов и дополнительной пролиферацией фибробластов и вовлеченных в процесс тканей.

Претибиальная (локальная) микедема является также самостоятельным аутоиммунным заболеванием и встречается при диффузном токсическом зобе значительно реже (не более 4% популяции больных диффузным токсическим зобом), чем аутоиммунная офтальмопатия. Термин претибиальная микседема не соответствует современному взгляду на патогенез и развитие этой патологии. Некоторые авторы обозначают эти поражения кожных покровов как “дермопатия”. С нашей точки зрения, правильнее обозначать такие изменения кожных покровов как “аутоиммунная дермопатия”, которая почти всегда сочетается с наличием офтальмопатии. Как правило, поражается кожа передней поверхности голени, она становится отечной, утолщенной, с выступающими волосяными фолликулами, пурпурно-красного цвета и напоминает кожу апельсина (рис. 20, б). Действительно, наиболее часто аутоиммунная дермопатия проявляется поражением кожи передней поверхности голени. Однако такие же поражения встречаются на коже тыльной поверхности и пальцах кисти. Поражение часто сопровождается значительной эритемой и зудом. Гистологически в периферическом слое кожи обнаруживаются отек, повышенная инфильтрация мукополисахаридами и избыточное количество муцина, которое как бы “расщепляет” пучки коллагена на отдельные коллагеновые волокна. Иногда аутоиммунная дермопатия, так же как и аутоиммунная офтальмопатия, возникает через 4-20 мес. после лечения диффузного токсического зоба радиоактивным йодом.

а

б

Рис 20. Офтальмопатия (а) и претибиальная микседема (б) при диффузном токсическом зобе.

Акропатия – характерные изменения (отечность мягких тканей и подлежащих костных тканей в области кистей фаланги пальцев, кости запястья). На рентгенограммах выявляются субпериостальные образования костной ткани, которые выглядят, как пузыри мыльной пены. Эти изменения обычно сочетаются с тиротоксикозом, офтальмопатией и претибиальной микседемой. При отсутствии последних диагноз акропатии затруднителен и в таких случаях необходима дифференциальная диагностика между акромегалией, легочной гипертрофической остеоартропатией. Для подтверждения диагноза акропатии

необходимо сканирование пораженной области после внутривенного введения 99mTc-пирофосфата. Вовлеченные в процесс мягкие и костные ткани почти избирательно поглощают, как и участки поражения претибиальной микседемы, указанный изотоп.

Особенностью клинического течения диффузного токсического зоба у детей и подростков является, как правило, отсутствие классических признаков заболевания и офтальмопатии. Сравнительно редко диффузный токсический зоб встречается у детей дошкольного возраста, тогда как частота заболевания увеличивается в подростковом возрасте, причем у девочек диффузный токсический зоб встречается в 5-7 раз чаще, чем у мальчиков. Такие больные предъявляют жалобы на повышенную утомляемость и общую слабость, снижение способности в концентрации внимания. Подростки начинают плохо учиться, пропускают школу, наблюдаются изменения в поведении. У девочек позже, чем обычно, появляются менархе и устанавливается менструальный цикл. Щитовидная железа не достигает в большинстве случаев размеров, наблюдаемых при диффузном токсическом зобе у взрослых. Клиническое и лабораторное обследование больных в таких случаях позволяет своевременно диагностировать заболевание и проводить необходимую терапию.

В.Г. Баранов (1977) предлагает следующие критерии для оценки степени тяжести тиротоксикоза. Тиротоксикоз I степени сопровождается нерезко выраженной симптоматикой, пульс не более 100 в минуту, основной обмен не превышает +30%, признаков нарушения функции других органов и систем нет. Для тиротоксикоза II степени характерны отчетливо выраженная симптоматика при значительной потере массы тела, нарушения функции желудочно-кишечного тракта, тахикардия 100-120 в минуту с эпизодами нарушения ритма, основной обмен от +30 до 60%. При тиротоксикозе III степени (висцеропатическая форма, которая без лечения может прогрессировать в кахексическую форму) наблюдаются выраженный дефицит массы тела, тахикардия свыше 120 в минуту, нередко мерцательная аритмия, сердечная недостаточность, поражение печени, основной обмен превышает +60%.

Большую опасность для жизни представляет **тиротоксический криз**, который встречается у 0,02 – 0,05% больных и обычно развивается под влиянием провоцирующих факторов. Среди них на первом месте стоит травма (хирургическое вмешательство на щитовидной железе или других органах, грубая пальпация щитовидной железы), непроходимость кишечника, психическая травма, инфаркт миокарда. Диабетический кетоацидоз, эмоциональный стресс, прием избыточного количества йода у лиц, проживающих в условиях йодной недостаточности, интеркуррентные инфекции (часто пневмония), беременность, роды, радиойодтерапия. Тиротоксический криз чаще возникает при диффузном токсическом зобе, чем при других формах тиротоксикоза. Он почти исключительно встречается у женщин с диффузным токсическим зобом, чаще в теплое время года (лето) и в 70% случаев развивается остро.

Основное место в патогенезе тиротоксического криза отводится тироидным гормонам. Выше указывалось, что грубая пальпация, операция на щитовидной железе, психические травмы играют провоцирующую, “запускающую” роль в развитии тиротоксического криза, особенно у нелеченных или нерегулярно принимающих тиростатические препараты больных. Под влиянием перечисленных моментов происходит внутритироидальное высвобождение гормонов и поступление их в кровь. В некоторых случаях тироидные гормоны высвобождаются из связанного с белками (тироксинсвязывающий глобулин и др.) крови состояния под влиянием приема лекарств (салицилаты, клофибрат и др.), которые конкурируют с тироидными гормонами за связь с этими белками, особенно после окончания приема тиростатических препаратов.

В большинстве случаев при тиротоксическом кризе или в начале его развития выявляется повышение содержания Т3 и Т4 в сыворотке крови. Однако нет полной корреляции между уровнем тироидных гормонов в крови и степенью выраженности клинических проявлений тиротоксикоза. Это связано, вероятно, с тем, что внеклеточный уровень тироидных гормонов не соответствует их внутриклеточному содержанию. Установлено, что тироксин в связанной форме с транстиретином комплексируется мембранами клеток и Т4 транспортируется внутрь мембраны, где происходит его конверсия в Т3, а последний поступает лишь после этого во внеклеточное пространство и в кровь или внутрь клеток. Не исключено, что при тиротоксическом кризе блокируется поступление образовавшегося в толще мембраны клетки Т3 в кровь, вследствие чего он далее транспортируется только к ядру и митохондриям клетки.

Избыток тироидных гормонов вызывает усиление катаболизма и ускорение окислительных процессов внутри клетки. Снижается масса тела больного, быстро расходуются источники энергии – уменьшается содержание гликогена и жира в печени. Катаболизм белков мышц сопровождается резкой мышечной слабостью. Повышение окислительных процессов на периферии (окисление жиров, углеводов и в последнюю очередь белков), с одной стороны, требует постоянного достаточного количества кислорода, а с другой – образуется избыточное количество тепловой энергии, которая вызывает гипертермию, иногда до 400С. Наблюдаемые при этом тахикардия, тахипноэ, повышение систолического объема крови и систолическая артериальная гипертензия являются до известной степени компенсаторными реакциями для удовлетворения повышенной потребности периферических тканей в кислороде и рассредоточения образовавшейся тепловой энергии. Кроме того, тироидные гормоны могут оказывать прямое токсическое влияние на сердечную мышцу.

Эти факторы приводят к развитию сердечно-сосудистой недостаточности и мерцательной аритмии. Избыточное количество тироидных гормонов в крови вызывает нарушения функции ЦНС и желудочно-кишечного тракта.

Диффузный токсический зоб сопровождается повышением скорости обмена кортикостероидов в организме, усилением их распада, выведения и преимущественным образованием менее активных соединений. В результате при этом заболевании развивается относительная надпочечниковая недостаточность, которая усиливается при тиротоксическом кризе.

Кроме того, при тиротоксикозе вообще, а особенно при тиротоксическом кризе наблюдается активирование калликреин-кининовой системы, что проявляется резким повышением содержания брадикинина, кининогена, активности кининаз и других компонентов системы. Эти нарушения приводят к выраженным расстройствам микроциркуляции, развитию необратимой гипотензии и коллапса, которые являются неотъемлемой частью клинической картины финальной стадии тиротоксического криза.

Клиника тиротоксического криза сопровождается резким нарушением функции ряда систем и органов, в частности ЦНС, сердечно-сосудистой, желудочно-кишечной, гипоталамо-гипофизарно-надпочесниковой, а также печени и почек. Выражены психическое и двигательное беспокойство вплоть до острого психоза или, наоборот, сонливость (реже), дезориентация и даже коматозное состояние, высокая температура (выше 380С), удушье, боли в области сердца, тахикардия, достигающая 150 в минуту, иногда мерцательная аритмия. У пожилых больных повышение температуры может быть лишь незначительным. Частота сердечных сокращений, как правило, не соответствует повышению температуры, т.е. превышает таковую, наблюдаемую при гипертермии другой этиологии (инфекция и т. п.). Кожа горячая, гиперемирована, влажная от профузного пота, с гиперпигментацией складок. Боли в животе, сопровождающиеся тошнотой, диареей, иногда желтухой и редко картиной острого живота. Часто гепатомегалия, особенно при сердечно-сосудистой недостаточности. Увеличивается минутный объем и происходит перераспределение крови от внутренних органов на периферию для рассредоточения образующейся в избыточном количестве тепловой энергии. Нарушение функции печени может быть следствием такого перераспределения крови. Пульсовое давление и оксигенация венозной крови увеличиваются. Вследствие этого увеличивается клиренс как эндогенных гормонов, так и различных лекарственных препаратов, что необходимо иметь в виду при проведении терапии. При тиротоксическом кризе повышается чувствительность к b-адренергическим агонистам. Указанное диктует необходимость проведения мониторирования показателей сердечно-сосудистой деятельности при лечении тиротоксического криза.

Выраженность психоневрологических симптомов тиротоксического криза имеет и прогностическое значение, так как прогрессирующая спутанность сознания, потеря ориентировки, заторможенность являются предвестниками тиротоксической комы, почти всегда заканчивающейся летально.

Неблагоприятным прогностическим признаком при тиротоксическом кризе служит желтуха, появление которой указывает на угрозу печеночной недостаточности.

Самым опасным **осложнением** тиротоксического криза является сердечно-сосудистая недостаточность. Дистрофия миокарда и снижение его функциональных резервов, развивающиеся при диффузном токсическом зобе, усугубляются гипоксией, выраженными метаболическими и микроциркуляторными нарушениями в течении тиротоксического криза. В этой связи около половины летальных исходов при тиротоксическом кризе связано с развитием острой сердечно-сосудистой недостаточности.

В период тиротоксического криза наблюдается дальнейшее повышение содержания общего и свободного Т3 и Т4 в сыворотке крови, однако их определение не требуется для подтверждения тиротоксического криза. Большее значение имеет определение функции печени, почек и содержание электролитов в сыворотке крови. Восстановление нормального водно-электролитного баланса в период лечения является обязательным условием успешной терапии тиротоксического криза.

Диагноз и дифференциальная диагностика. Диагноз диффузного токсического зоба основывается на результатах клинического обследования и подтверждается лабораторными данными. Необходимо отметить, что в поликлинических условиях чаще встречается гипердиагностика диффузного токсического зоба, и нередко среди лиц, поступающих в отделения эндокринологии с таким диагнозом, выявляются больные с неврастенией, нарушениями психики, нейроциркуляторной дистонией. Если у больного с диффузным токсическим зобом кисть теплая и влажная, то у больного неврастенией – холодная, влажная от липкого пота.

Похудание может наблюдаться при обоих состояниях, однако при нейроциркуляторной дистонии, как правило, умеренное снижение веса сопровождается снижением аппетита, при диффузном токсическом зобе аппетит не только не снижен, но повышен. Несмотря на значительно больший прием пищи у больных диффузным токсическим зобом снижение веса прогрессирует. Тахикардия исчезает в покое. В качестве теста для проведения дифференциальной диагностики рекомендуется простая, но реливантная процедура, заключающаяся в следующем. У больного в два часа ночи необходимо посчитать пульс. При нейроциркуляторной дистонии его частота будет ниже 80 ударов в минуту, а у больного диффузным токсическим зобом – свыше 80. Артериальное давление часто пониженное, но может быть в норме и умеренно повышенным. При этом пульсовое давление в обычных пределах, тогда как при диффузном токсичесом зобе повышено. Повышение основного обмена до высоких цифр встречается при диффузном токсическом зобе, причем уровень холестерина в сыворотке крови у этих больных, как правило, снижен, тогда как при неврастении как основной обмен, так и содержание холестерина в сыворотке крови в пределах нормы.

Близкая клиническая симптоматика (помимо диффузного токсического зоба и нейроциркуляторной дистонии – раздражительность, эмоциональная неустойчивость, плохой сон, плаксивость, чувство жара, повышенная плаксивость) имеет место при климактерическом неврозе. Если нейроциркуляторная дистония встречается чаще у лиц молодого возраста, то невроз климактерического периода у лиц после прекращения менструального цикла (обычно 45-50 лет). Вместо характерного снижения массы тела – его повышение. Чувство "жара" не постоянно, а характерные "приливы", длящиеся несколько секунд или минут и сменяющиеся иногда чувством зябкости. Помимо различия в клинической картине, при лабораторном обследовании выявляется достоверная разница в содержании тироидных гормонов в сыворотке крови.

В некоторых случаях при диффузном токсическом зобе имеется выраженная атрофия мышц, что необходимо дифференцировать от неврологических заболеваний, сопровождающихся миопатией.

Исключительно редко встречается тиротоксический периодический паралич, развивающийся спонтанно и внезапно и сопровождающийся почти полной обездвиженностью. При этом всегда имеет место гипокалиемия. Тиротоксический паралич можно предупредить введением препаратов калия и b-блокаторов.

У лиц пожилого возраста (чаще женщин) диффузный токсический зоб может протекать под маской сердечно-сосудистых заболеваний (тахикардия с признаками сердечной недостаточности, нарушение ритма по типу мерцательной (предсердной) аритмии, которая резистентна к лечению препаратами дигиталиса). Повышенная раздражительность, нервозность и лабильность, столь характерная для лиц сравнительно молодого возраста, у них отсутствует. Чаще имеет место апатия, сонливость, что обычно расценивается как сенильные (возрастные) проявления. Снижение массы тела у больных пожилого возраста наблюдается на фоне сниженного аппетита, что часто диктует необходимость исключения патологии желудочно-кишечного тракта. Гастроскопия и другие исследования, проводимые до компенсации тиротоксикоза, могут способствовать резкому ухудшению состояния больного. Следует иметь в виду, что умеренные клинические признаки тиротоксикоза у пожилых больных могут наблюдаться при раке щитовидной железы и его метастазах. Поэтому при увеличенной щитовидной железе, неоднородности ее строения, выявляемого на УЗИ или сканировании, необходимо также проводить биопсию.

Большое диагностическое значение имеет исследование содержания гормонов щитовидной железы в крови (общий и свободный Т4, Т3, тироксинсвязывающие белки). У больных с диффузным токсическим зобом уровень Т4 и Т3 в сыворотке крови повышен. Необходимо иметь в виду, что увеличение общего тироксина в сыворотке крови еще не является свидетельством повышения функции щитовидной железы. Встречается так называемый синдром повышенного содержания тироксинсвязывающего белка (семейная дисальбуминемичекая гипертироксинемия), для которого характерна высокая концентрация общего Т4 и тироксинсвязывающих белков (преимущественно альбумина) при нормальном показателе свободного Т4, Т3 и ТТГ. Это наследственное заболевание, и у многих родственников таких лиц повышенный уровень Т4 при отсутствии клинических признаков тиротоксикоза сочетается с соответствующим увеличением концентрации тироксинсвязывающих белков. Данная патология наследуется как признак, сцепленный с Х-хромосомой.

Кроме того, повышение уровня Т4 и Т3 в сыворотке крови встречается при синдроме резистентности к тироидным гормонам как доминантный признак, и данная патология связана с нарушением взаимодействия гормона с клеточными рецепторами.

В некоторых случаях выявляется нормальная концентрация Т4 и избыточное содержание Т3 в сыворотке крови – так называемый Т3-токсикоз, клиническая картина которого не отличается от таковой обычного тиротоксикоза.

Необходимо отличать так называемый йод-базедов феномен – состояние, при котором клиническая картина тиротоксикоза развивается в случае применения препаратов йода в больших дозах, в том числе у лиц, находящихся в йоддефицитных районах. Развитие тиротоксикоза в этих случаях связывают с тем, что гиперплазированная щитовидная железа, которая постоянно встречается при йодной недостаточности, продолжает поглощать йод, как и ранее, хотя йодная недостаточность ликвидирована. Это в свою очередь приводит к избыточной секреции тироидных гормонов. Кроме того, нельзя исключить и другую возможность, когда в период йодной недостаточности наряду с диффузной гиперплазией имеются узлы, которые в условиях недостатка йода никак себя не проявляют, а при достаточном количестве йода начинают функционировать автономно, избыточно продуцируя тироидные гормоны.

Для диагностики диффузного токсического зоба широко используются радионуклидные методы исследования. Радиодиагностика выявляет повышенное поглощение радиоактивного йода, так же как и 99mTc. Наряду с определением поглощения радиоактивного йода проводится сканирование щитовидной железы (рис. 21, см. вклейку), которое можно сочетать с пробой с трийодтиронином. Угнетение поглощения радиоактивного йода после приема Т3 исключает диагноз диффузного токсического зоба. Проведение пробы с трийодтиронином может привести (особенно у лиц пожилого возраста) к развитию сердечной недостаточности при наличии скрытой ИБС. В настоящее время вместо этого теста широко применяется проба с тиролиберином, которую можно проводить беременным. Нормальный ответ секреции ТТГ на введение тиролиберина исключает диагноз диффузного токсического зоба, тогда как при его наличии повышения уровня ТТГ в сыворотке крови не происходит. При проведении пробы с тиролиберином следует иметь в виду, что некоторые фармакологические препараты (альдактон, сульпирид и др.), не меняя базальный уровень Т4, Т3 и ТТГ в сыворотке крови, резко повышают ответ ТТГ на введение тиролибеина.

Это связано с модуляцией рецепторов тиротрофов к тиролибеину или изменением гормонорецепторного взаимодействия Т3 в гипофизе.
Сравнительно редко причиной тиротоксикоза является тиротропинома – аденома передней доли гипофиза, продуцирующая ТТГ. Клиническая картина не отличается от таковой при диффузном токсическом зобе. При обследовании выявляется наряду с повышенными цифрами общего и свободного Т4 и Т3 высокий уровень ТТГ в сыворотке крови, который при диффузном токсическом зобе изредка в норме или чаще снижен.
Для дифференциальной диагностики диффузного токсического зоба и тиротоксической аденомы щитовидной железы необходимо сканирование как до, так и после стимуляции ТТГ. Наличие тироидстимулирующих антител свидетельствует о диффузном токсическом зобе, а отсутствие – о тиротоксической аденоме.

Тиротоксикоз, обычно легкой или средней тяжести, может быть при послеродовом, “безболезненном” или подостром тироидите, при которых низкое или неопределяемое содержание ТТГ в сыворотке крови сочетается с повышенным уровнем тироидных гормонов.

Обязательно необходима дифференциальная диагностика диффузного токсического зоба и тиротоксической фазы аутоиммунного тироидита. При аутоиммунном тироидите щитовидная железа диффузно увеличенна и при пальпации ощущается неравномерность ее плотности, в то время как при диффузном токсическом зобе она более эластична и одинаковой плотности. Тиротоксикоз при аутоиммунном тироидите легкой или в крайнем случае средней тяжести. Различно и время проявления клинической картины тиротоксикоза. При аутоиммунном тироидите более длителен анамнез, тогда как при диффузном токсическом зобе развернутая клиническая картина проявляется в течение более короткого периода. Однако антитела к тироглобулину и к тироидной пероксидазе выявляются как при диффузном токсическом зобе, так и при аутоиммунном тироидите, для которого характерен гипотироз даже после небольшого периода, в течение которого отмечалась невыраженная картине умеренного тиротоксикоза.

Диагностика аутоиммунной офтальмопатии при отсутствии тиротоксикоза представляет определенные трудности. Антитела к тироглобулину и к тироидной пероксидазе выявляются у 70-75% больных с офтальмопатией, и титр их значительно выше, чем у больных с диффузным токсическим зобом. При одностороннем экзофтальме необходимо исключить опухоль, кисту, эхинококк ретроорбитальной области. Для диагностических целей применяется ультросонография (УЗИ) или компьютерная томография, реже венография.

Выше указывалось, что претибиальная микседема чаще встречается в сочетании с диффузным токсическим зобом и офтальмопатией. При претибиальной микседеме титр ЛАТС-фактора, как и других тироидстимулирующих антител в сыворотке крови, повышен. Область кожи, пораженная претибиальной микседемой, концентрирует 99mTc-пирофосфат в большом количестве.

Лечение. Терапия диффузного токсического зоба комплексная. Больной должен получать полноценное питание с достоточным количеством витаминов и микроэлементов. Необходимо восстановить нормальный сон и с этой целью целесообразно использовать различные седативные препараты. При выборе последних следует иметь в виду, что барбитураты ускоряют метаболизм тироксина и, следовательно, такие препараты, как фенобарбитал, помимо седативного эффекта, будут снижать уровень тироидных гормонов в крови.
Для лечения диффузного токсического зоба применяются тиростатические препараты, препараты йода, комбинация седативных препаратов и b-блокаторов, радиоактивный йод, хирургическое вмешательство. При тиротоксикозе легкой степени проводят лечение йодом в сочетании с b-блокаторами и седативными препаратами. Йодиды применяются для предоперационной подготовки по поводу тиротоксикоза, а также вместе с антитироидными препаратами для терапии тиротоксического криза. Традиционно для этой цели используется раствор Люголя или насыщенный раствор йодида калия, который назначают в дозе от 1 до 10 капель в день. Люголевский раствор готовят по следующей прописи: Kalii iodati 2,0; Iodi puri 1,0; Aq. destill. ad 30,0. В 5 каплях раствора содержится 180 мг йодидов.
Эффект терапевтических доз йодида (180-200 мг в день) проявляется уже через 2-3 недели: снижается уровень Т4 и Т3 в сыворотке крови, повышается реакция ТТГ на введение тиролиберина. Препараты йода тормозят биосинтез тироидных гормонов, при этом нарушается способность щитовидной железы поглощать из крови неорганический йод и снижается секреция Т4 и Т3. Кроме того, уменьшается чувствительность железы к стимулирующему действию ТТГ, а при диффузном токсическом зобе – к влиянию тироидстимулирующих антител. Следует иметь в виду, что длительное использование препаратов йода может вести к усилению тиротоксикоза.
В таких случаях целесообразнее применять различные b-блокаторы (индерал, анаприлин, обзидан, атенолол, альпренолол, метопролол) по 40-60 мг в сутки, но доза в случае необходимости может быть увеличена до 100-120 мг в сутки. b-Блокаторы уменьшают силу и частоту сердечных сокращений, блокируют положительный хронотропный и инотропный эффект катехоламинов. За счет замедления синусового ритма,

уменьшения и исчезновения экстрасистолии, снижения АД и ударного объема b-блокаторы значительно уменьшают гиперфункцию тиротоксического сердца. Несмотря на отдельные публикации о положительном эффекте b-блокаторов в качестве монотерапии при диффузном токсическом зобе, такая терапия как самостоятельный метод лечения в настоящее время не рекомендуется. При внезапной отмене b-блокаторов могут наблюдаться явления усиления функции симпато-адреналовой системы (тремор, потливость, раздражительность, слабость, сердцебиение), что диктует необходимость постепенной (в течение 3-5 дней) отмены b-блокаторов.

b-Адренергический механизм опосредует только часть сопровождающих тиротоксикоз вегетативных и висцеральных расстройств и прямо не связан с выраженными метаболическими нарушениями (в том числе с расстройствами тканевого дыхания), которые во многом определяют тяжесть состояния. Вместе с тем клиническая практика показала, что фармакодинамический эффект b-блокаторов при тиротоксикозе выражен больше, чем можно было бы ожидать, исходя из представлений о механизме их действия. Как теперь установлено, они уменьшают периферическую конверсию тироксина в трийодтиронин, благодаря чему уже через 1 ч после введения b-блокаторов концентрация Т3 в крови снижается. Следует иметь в виду, что b-блокаторы и другие симпатолитики не являются средством этиотропного лечения и должны использоваться только как дополнительная патогенетическая терапия. Показано также применение резерпина по 0,1 мг 2-3 раза в день.

Клинический эффект приема йодидов – не только снижение и ликвидация явлений тиротоксикоза, но и уменьшение размеров, плотности и кровоснабжения щитовидной железы. У лиц, ранее лечившихся радиоактивным йодом или подвергавшихся хирургическому вмешательству, при этой терапии могут развиваться даже явления гипотироза.

В последние годы значительное распространение получило применение йодидов в виде иподата натрия (ораграфин или телепак), который, помимо прямого ингибирующего влияния на функцию щитовидной железы, снижает скорость образования Т3 из Т4. Препарат назначают в дозе 1 г в день и уже через 10-14 дней может наблюдаться восстановление эутироидного состояния.

Перхлорат калия, который поглощается щитовидной железой и конкурирует с йодом за связывание с йодконцентрирующей системой щитовидной железы и тем самым блокирует поглощение йода щитовидной железой, может применяться в период предоперационной подготовки в суточной дозе 600-800 мг. В настоящее время применяется крайне редко.

Препараты лития в виде карбоната лития в суточной дозе 900-1500 мг с успехом используются для лечения диффузного токсического зоба. Литий стабилизирует мембраны и тем самым снижает стимулирующее действие ТТГ и тироидстимулирующих антител на щитовидную железу, уменьшая высвобождение гормонов из щитовидной железы, что приводит к уменьшению концентрации Т4 и Т3 в сыворотке крови. По скорости снижения клинических проявлений тиротоксикоза препараты лития сравнимы с препаратами йода. В отличие от йода препараты лития снижают скорость метаболизма тироидных гормонов. В этой связи карбонат лития применяется в комбинации с тиростатическими препаратами при необходимости быстро ликвидировать тиротоксикоз, а препараты йода не могут быть использованы из-за высокой к ним чувствительности. Карбонат лития может быть использован при диффузном токсическом зобе в качестве монотерапии. Эутироидное состояние достигается быстро, но через 3-4 месяца щитовидная железа “выскальзывает” из-под влияния ионов лития с рецидивом клинических проявлений тиротоксикоза. Применяя терапевтические дозы препаратов лития, при которых концентрация лития в крови не должна превышать 1 мэкв/л, необходимо иметь в виду возможность появления признаков его токсического действия (тошнота, рвота, нарушение сердечной деятельности, судороги и даже кома). Поэтому лечение карбонатом лития следует проводить под контролем его содержания в крови.

Из методов консервативной терапии широко применяется лечение тиростатическими препаратами, среди которых наиболее распространены производные имидазола (мерказолил, карбимазол, метимазол) и тиоурацила (пропилтиоурацил).

Мерказолил блокирует образование тироидных гормонов на уровне органофикации и взаимодействия моно- и дийодтирозина, а также тормозит йодирование тирозиновых остатков тироглобулина. Пропилтиоурацил ингибирует, как и мерказолил, образование тироидных гормонов путем снижения активности пероксидазы и образования йодтиронинов из йодтирозинов. Кроме того, пропилтиоурацил подавляет монодейодирование тироксина на периферии и его конверсию в Т3. Как известно, дейодирование происходит только в микросомальной фракции клеток, и ферментная система, катализирующая эту реакцию, состоит из дейодиназы-5, дейодирующей Т4 с переходом его в Т3, и дейодиназы-5, дейодирующей Т4 с переходом его в об. Т3. Поэтому эффект действия от использования пропилтиоурацила наступает быстрее, чем при применении мерказолила.

Лечение пропилтиоурацилом начинают с суточной дозы 300-600 мг (по 100-150 мг каждые 6 ч) и по достижении эутироидного состояния (обычно через 2-3 недели) доза препарата снижается до 200-400 мг (обычно на 1/3 от исходной) с постепенным ее уменьшением каждые 2-2,5 недели до поддерживающих доз – 50-100 мг в сутки.

Мерказолил назначают в дозе 40-60 мг (при легком тиротоксикозе – 30 мг). Указанная суточная доза должна быть разделена на 4 приема (каждые 6 ч). Обычно такая доза 2-3,5 нед. приводит к уменьшению симптомов тироткcикоза, масса тела больных увеличивается. С момента наступления эутироидного состояния доза

антитироидных препаратов постепенно снижается (мерказолила до 5-10 мг в день). Прием поддерживающих доз антитироидных препаратов продолжается до 1-1,5 лет. Преждевременная отмена препарата приводит к рецидиву тиротоксикоза и необходимости назначать вновь высокие дозы антитироидных препаратов.

При длительном приеме тиростатических препаратов вследствие длительного и значительного (ниже нижней границы нормы) снижения уровня тироидных гормонов в крови и при условии восстановления функции обратной связи (гипофиз-щитовидная железа) усиливается секреция ТТГ, что приводит к стимуляции (гиперплазии) щитовидной железы и увеличению ее размеров (струмогенное действие). Для предупреждения такого действия антитироидных препаратов рекомендуется прием небольших доз тироидных гормонов (0,05-0,1 мкг тироксина в день), причем дозу тироксина подбирают так, чтобы состояние больного оставалось эутироидным.

В ряде публикаций показано, что при комбинированном применении тиростатиков с тироксином снижается (до 35%) частота рецидивов диффузного токсического зоба по сравнению с больными, у которых терапия в течение 18 месяцев проводилась только тиростатиками. B. McIver и соавт. (1996) обследовали и лечили 111 больных с диффузным токсическим зобом, которые в течение первого месяца получали 40 мг карбимазола (аналог мерказолила), а после рандомизации больных разделили на две группы: монотерапия карбимазолом (первая группа – 52 больных) и комбинированная терапия – карбимазол +L-тироксин (вторая группа – 59 больных). Доза тироксина вначале составляла 100 мкг в сутки, а затем подбиралась индивидуально и поддерживалась на уровне, необходимом для ингибирования секреции ТТГ. В течение 18 месяцев терапии концентрация тироидстимулирующих антител снижалась с 23,4±28,4 до 3,4 ±7,3 ЕД/л (первая группа) и 30,6±35,0 до 5,3±12,1 ЕД/л (вторая группа). У 8 больных первой группы наблюдался рецидив диффузного токсического зоба через 6±4 мес после окончания терапии. У такого же числа больных (8 человек), получавших комбинированную терапию (вторая группа), наблюдался рецидив диффузного токсического зоба через 7±4 мес после окончания терапии. Эти данные убедительно показывают, что комбинированная терапия (карбимазол + тироксин) не снижает частоту рецидива диффузного токсического зоба.

Кроме того, в последние годы были опубликованы сообщения японских авторов об одинаковой терапевтической эффективности малых (10 мг) и больших (40 мг) доз тиростатических препаратов при лечении диффузного токсического зоба. С целью подтверждения этих данных было проведено многоцентровое (15 европейских клиник) исследование, в котором 251 больной получал 10 мг, а 258 больных – 40 мг метимазола. У больных определяли содержание тироидстимулирующих антител, тироидных гормонов, ТТГ и оценивали состояние щитовидной железы. Через 3 недели от начала лечения эутироидное состояние при больших дозах метимазола отмечалось у 65% больных по сравнению с 42% больных, получавших малые дозы препарата. Еще через 3 недели (6 недель от начала лечения) эутироидное состояние наблюдалось у 93 и у 78% соответственно. Через 12 недель от начала терапии клинические признаки тиротоксикоза присутствовали у 0,5% больных, получавших 40 мг, и у 4% больных, получавших 10 мг препарата. Результаты исследования убедительно показали преимущество больших доз тиротстатичеких препаратов в начальной фазе диффузного токсического зоба.

Об эффективности антитироидной терапии можно судить по содержанию общего и свободного Т4 и Т3, количеству тироксинсвязывающих белков. В период лечения необходимо учитывать, что в этих условиях щитовидная железа больше секретирует Т3, чем Т4, поэтому уровень Т4 при эутироидном состоянии может быть даже несколько снижен или находиться на низшей границе нормы. Больные, находящиеся на терапии тиростатиками, должны быть через каждые 3-4 мес обследованы (мониторинг веса, АД, пульс, определение свободного Т4, Т3, тироидстимулирующих антител). После окончания медикаментозного лечения больные должны находиться еще в течение 2-3 лет под диспансерным наблюдением.

В комплексной терапии диффузного токсического зоба показано применение иммуномодуляторов (декарис, Т-активин). Проведенные нами совместно с Н.А. Петуниной исследования показали, что иммуномодуляторы способствуют более быстрой нормализации функции щитовидной железы и восстановлению нарушенной функции иммунной системы. Это положительное влияние более выражено у Т-активина. Под влиянием декариса улучшение показателей иммунной системы наблюдалось лишь у лиц молодого возраста, тогда как у больных старше 60 лет прием декариса сопровождался ухудшением показателей функции иммунной системы. Поэтому Т-активин является препаратом выбора. Его назначают в виде 0,01% раствора в инъекциях по 1 мл в течение 5 дней (подряд или лучше на 1, 3, 5, 7, 11-й день). Курсы лечения повторяются 4-5 раз с интервалами в 3-4 недели. Декарис применяется по 150 мг 5 дней. Повторные курсы проводятся через 2-3 нед 2-4 раза.

Объективным контролем эффективности проводимого лечения (помимо клинической картины) является определение уровня Т3, Т4, тироидстимулирующих антител в крови, и снижение концентрации этих антител является хорошим прогностическим показателем, позволяющим надеяться на успех консервативного лечения. Такие же данные можно получить при проведении пробы с угнетением трийодтиронином или пробы с тиролиберином. Положительные результаты этих проб показывают, что функция щитовидной железы “ускользает” из-под влияния тироидстимулирующих антител (т.е. развивается иммунологическая ремиссия) и нормализуется функция системы гипоталамус-гипофиз-щитовидная железа. Если, несмотря на длительную антитироидную терапию (1-1,5 года), уровень тироидстимулирующих антител в сыворотке крови не снижается или проба с угнетением Т3 или тиролиберином отрицательная, дальнейшее продолжение консервативной терапии можно считать бесперспективным и рекомендовать в этих случаях

хирургическое вмешательство или лечение радиоактивным йодом (по показаниям). Клиническая ремиссия диффузного токсического зоба, которая наступает сравнительно быстро под влиянием лечения антитироидными препаратами, должна перейти в иммунологическую ремиссию. Только в этом случае можно говорить о полном излечении диффузного токсического зоба. В противном случае наблюдаются рецидивы заболевания и необходимость использования альтернативных методов лечения. Длительное время был непонятен механизм воздействия тиростатиков на иммунную систему. Лишь в последние годы были получены данные, проливающие свет на эти вопросы. S. Nagataki и K. Eguchi (1992) и A. Weetman и соавт. (1992) показали, что антитироидные препараты снижают образование интерлейкина-1 и интерлейкина-6 в тироцитах. Оба цитокина участвуют в патогенезе аутоиммунных процессов в щитовидной железе посредством стимуляции интратироидных Т-лимфоцитов и участия в различных воспалительных эффектах в щитовидной железе, а также стимуляции В-лимфоцитов – продуцентов антител. Таким образом, прерывается порочный круг, поддерживающий аутоиммунные и процессы аутоагрессии в щитовидной железе.

Терапия антитироидными препаратами может в некоторых случаях сопровождаться побочными явлениями, к которым относится зуд и кожная сыпь, сравнительно быстро исчезающие при приеме антигистаминных препаратов. Реже встречается гранулоцитопения и даже агранулоцитоз (по данным различных авторов, от 0,02 до 0,3%), при наличии которых проводимое лечение следует прервать и использовать альтернативные методы лечения. Описаны также и другие осложнения медикаментозной терапии (артралгия, холестатический гепатит, некроз печени, невриты и выпадение волос). Некоторые авторы считают, что выпадение волос, умеренная лейкопения и артралгия являются не следствием побочного действия тиростатиков, а симптомами нормализации нарушенной до этого функции щитовидной железы. Перечисленные побочные явления чаще встречаются при применении производных тиоурацила. Производные имидазола (мерказолил, метимазол и карбимазол) являются более безопасными препаратами. Тем не менее больные до начала терапии тиростатиками должны быть предупреждены о возможных побочных явлениях и необходимости проведения общего анализа крови, особенно в период использования максимальных доз препарата, а также немедленно обращаться за медицинской помощью к лечащему врачу при появлении болей в горле или фурункулеза, воспалении слизистых, повышении температуры.

Хирургическое лечение показано при тиротоксикозе тяжелой степени, большом увеличении щитовидной железы, при наличии аллергических и других реакций к антитироидным препаратам, отсутствии эффекта от консервативной терапии, в том числе при тиротоксикозе у детей и беременных. Производится субтотальная субфасциальная резекция щитовидной железы по О.В. Николаеву, техника которой детально описана во многих руководствах по эндокринологии.

В период подготовки к операции больному проводят антитироидную терапию до возможно максимального снятия симптомов тиротоксикоза. Для предупреждения большой кровопотери во время операции (кровоточивость паренхимы поджелудочной железы) в течение 2 нед. рекомендуется прием препаратов йода, которые не только снижают клинические проявления тиротоксикоза, но и уменьшают кровоснабжение щитовидной железы. Назначение препаратов йода сочетают с b-блокаторами, прием которых необходимо продолжить и в послеоперационном периоде.

Недопустима отмена антитироидной терапии у больных тиротоксикозом. Прежде всего это относится к b-блокаторам, резкая отмена которых особенно опасна у больных с сопутствующей ишемической болезнью сердца, поскольку в таких случаях часто развивается острая ишемия миокарда. Кроме того, возможно развитие острой надпочечниковой недостаточности у больных тиротоксикозом после резекции щитовидной железы, если предоперационная подготовка включала применение глюкокортикоидов и b-блокаторов. С целью профилактики послеоперационного тиротоксического криза рекомендуется продолжить тиростатическую медикаментозную терапию в течение 7-8 дней после субтотальной резекции щитовидной железы по поводу тиротоксикоза.

После тироидэктомии могут развиваться ранние осложнения (кровотечение, которое может вызвать асфиксию; парез возвратного нерва) и поздние (гипотироз, гипопаратироз). Возможен рецидив диффузного токсического зоба.

Лечение радиоактивным йодом показано в следующих случаях: при отсутствии эффекта от консервативной терапии, проводимой в течение длительного времени, наличии небольшого диффузного увеличения щитовидной железы у больного старше 40 лет; при рецидиве диффузного токсического зоба после хирургического вмешательства; при диффузном токсическом зобе, протекающем с выраженной сердечно-сосудистой недостаточностью, которая не позволяет проводить длительный курс антитироидной терапии или осуществить хирургическое лечение.

Для этих целей используется 131I, причем щитовидная железа больных, подвергающихся этому виду терапии, должна хорошо поглощать радиоактивный йод, что определяется предварительной радиойоддиагностикой. Лечебная доза радиоактивного йода зависит не только от способности железы поглощать йод, но и от ее размеров и массы, которые определяют с помощью сканирования. Проводился сравнительный анализ результатов облучения щитовидной железы 131I в лечебных дозах 6000-7000 рад (грей-Гр) и 3500 Гр. Среди 326 больных, получивших 131I в дозе 7000 Гр, частота гипотироза через 7 лет после лечения составила около 40%, тогда как при дозах 3500 Гр – лишь 8-9%. Большинство исследователей считают, что терапевтические дозы 131I 3000-4000 Гр должны быть оптимальными для большинства

больных, тогда как в некоторых случаях (тяжелый тиротоксикоз с проявлениями сердечно-сосудистой недостаточности) эти дозы могут быть увеличены до 5000-6000 Гр.

Лечение диффузного токсического зоба при беременности. Диффузный токсический зоб часто сопровождается нарушением менструального цикла, и беременность при тиротоксикозе средней и тяжелой степени тяжести наступает редко. В случае наличия беременности при лечении возникают дополнительные трудности по сохранению жизни плода, особенно в тех случаях, когда беременность желанна. При неконтролируемом тиротоксикозе большая вероятность спонтанного прерывания беременности. Поэтому лечение необходимо проводить так, чтобы на протяжении всей беременности поддерживалось эутироидное состояние при наименьших дозах антитироидных препаратов.

Применение любых лекарственных препаратов нежелательно в течение I триместра беременности (возможность их тератогенного действия). Поэтому при тиротоксикозе легкой степени антитироидные препараты можно не назначать. Следует подчеркнуть, что беременность сама по себе оказывает положительное влияние на течение диффузного токсического зоба, что проявляется в необходимости снижения дозы или даже отмены антитироидных препаратов в III триместре беременности. В случае необходимости использования тиростатиков предпочтение следует отдать пропилтиоурацилу, который меньше проходит через плаценту по сравнению с мерказолилом. Однако можно применять и препараты группы имидазола. Лечение тиростатиками проводят максимально низкими дозами и терапию рекомендуется начинать пропилтиоурацилом в суточной дозе 300-450 мг, а мерказолилом (карбимазолом или тиамазолом) в дозе 15-20 мг в день. По достижении эутироидного состояния доза тиростатиков снижается – пропилтиоурацила до 50-150 мг, а мерказолила – до 5-15 мг в день.

При тяжелой форме тиротоксикоза оперативное лечение лучше всего провести во II триместре, так как в I нежелательно из-за возможности спонтанного аборта, а в III триместре – из-за возможности индуцирования преждевременных родов.

Препараты йода для лечения тиротоксикоза при беременности не рекомендуются из-за развития возможности струмы у новорожденного. b-блокаторы можно использовать только в первые месяцы беременности, так как в последующем они способствуют задержке роста плода, вызывают брадикардию.

Особое внимание необходимо уделить послеродовому периоду, когда обычно усиливаются клинические проявления тиротоксикоза. Поэтому медикаментозная терапия не только не должна быть прервана, а наоборот усилена по сравнению с III триместром беременности.

У новорожденного могут выявляться признаки тиротоксикоза, которые носят кратковременный характер и обусловлены трансплацентарным переходом тироидстимулирующих антител. Как правило, тиротоксикоз не требует специфической терапии и через 2-3 недели (период полужизни иммунноглобулина составляет около 20 дней) проходит без лечения. При выраженных проявлениях тиротоксикоза (значительная тахикардия, повышенная возбудимость, значительная потеря массы тела, превышающая физиологическую) назначается симптоматическая терапия. Тиростатики, как правило, не применяются.

Лечение тиротоксического криза начинают с введения больших доз тиростатических препаратов и желательно пропилтиоурацила в связи с тем, что, помимо блокады биосинтеза гормонов щитовидной железы, препарат оказывает и периферическое действие, уменьшая конверсию Т4 в Т3. Первоначальные дозы составляют 600-800 мг; далее препарат вводят по 300-400 мг каждые 6 ч. Первоначальная ударная доза мерказолила 60-80 мг и далее по 30 мг каждые 6-8 ч. Если больной не может принять препарат per os, его вводят через назогастральный зонд или в свечах по 25 мг каждые 6 ч.

Препараты йода вводят не раньше чем через 1-2 часа после начала лечения тиростатиками; в противном случае происходит накопление йода в щитовидной железе, что после снижения дозы тиростатических препаратов вызывает усиление синтеза тироидных гормонов. Йодистые препараты вводят внутривенно: по 10 мл 10% раствора йодида натрия или по 1 мл раствора Люголя каждые 8 ч либо дают per os по 30-50 капель один раз в день или по 8-10 капель каждые 8 ч. Препараты йода, так же как и тиростатики, блокируют процессы органификации йода, т.е. образование МИТ и ДИТ, а также снижают биосинтез тироглобулина и угнетают реабсорбцию коллоида и последующее высвобождение из него Т3 и Т4.

Водорастворимые препараты глюкокортикоидов (ацетат кортизола, сукцинат гидрокортизона по 200-400 мг в сутки) вводят внутривенно. В случае их отсутствия можно применять дексаметазон по 2-2,5 мг 4 раза в день или эквивалентные дозы других препаратов. Глюкокортикоиды, помимо влияния на сердечно-сосудистую систему, уменьшают периферическую конверсию Т4 в Т3 и высвобождение тироидных гормонов из щитовидной железы.

Для ингибирования активности калликреин-кининовой системы с целью профилактики и терапии тиротоксического криза рекомендуется введение ингибитора протеаз трасилола или контрикала в дозе 40000 ЕД в 500 мл изотонического раствора хлорида натрия в виде внутривенной инфузии.

Наряду с перечисленными препаратами при тиротоксическом кризе применяются адреноблокаторы и в первую очередь b-адреноблокаторы (индерал, обзидан, анаприлин), которые вводят внутривенно медленно по 1-2 мг каждые 3-4 ч. В случае применения per os доза препарата должна быть увеличена до 20-60 мг каждые 4-8 ч. У больных с наличием (или указанием в анамнезе) симптомов бронхиальной астмы следует применять селективные b-блокаторы – атенолол или метопролол. Помимо влияния на сердечно-сосудистые и психомоторные проявления тиротоксикоза, b-адреноблокаторы снижают конверсию Т4 в Т3. В случае сохранения на фоне проводимой терапии психомоторного возбуждения показано применение седативных

средств и препаратом выбора при этом является фенобарбитал, который помимо непосредственного действия ускоряет метаболизм и инактивацию Т3 и Т4.
Возможно применение резерпина и гуанетидина (исмелин), однако эти препараты вызывают побочные явления в виде артериальной гипотонии, угнетения ЦНС; кроме того, их эффект развивается очень медленно.
В качестве жаропонижающих средств применять ацетилсалициловую кислоту и салицилаты не следует, так как они конкурируют с Т4 и Т3 за связь с тироксинсвязывающими белками крови и повышают уровень свободных Т3 и Т4 в крови. Для этих целей показан ацетаминофен или амидопирин, который наряду с жаропонижающим эффектом ингибирует активность калликреин-кининовой системы.
При сердечно-сосудистой недостаточности применяются препараты дигиталиса, диуретики, кислородотерапия.
В случае отсутствия эффекта от проводимого лечения и при наличии противопоказаний к применению b-адреноблокаторов проводится плазмаферез или гемосорбция, которая позволяет вывести избыток тироидных гормонов из организма.
Наряду с инфузией различных препаратов (йод, кортикостероиды и др.) в случае выраженных микроциркуляторных нарушений производится внутривенная инфузия 5% раствора глюкозы, реополиглюкина, гемодеза, раствора альбумина. Следует обратить большое внимание на необходимость поддержания нормального состояния энергетического, водного обмена, уровня электролитов в течение всего периода лечения.
Лечение офтальмопатии. При сочетании офтальмопатии с тиротоксикозом следует принять активные меры для ликвидации последнего. Некоторые исследователи предпочитают в таких случаях применять лечение радиоактивным йодом или оперативную терапию. Однако клиническая практика показывает, что в некоторых случаях офтальмопатия развивается или усиленно прогрессирует после проведения такой терапии. В большей степени это относится к терапии радиоактивным йодом, поэтому при сочетании диффузного токсического зоба с аутоиммунной офтальмопатией даже при минимальных клинических проявлениях последней проводить радиойодтерапию не следует.
Глазные симптомы диффузного токсического зоба (ретракция век и др.) по мере исчезновения симптомов тиротоксикоза также имеют тенденцию к регрессу. При значительно выраженном экзофтальме особое внимание необходимо уделять профилактике возможной инфекции (глазные капли с антибиотиками). Применение глазных капель, содержащих 5% раствор гуанетидина, уменьшает ретракцию век. Солнцезащитные очки уменьшают светобоязнь, а применение “искусственных слез” позволяет значительно уменьшить сухость глаз.
При офтальмопатии (экзофтальм, хемоз, периорбитальный отек) наряду с лечением тиротоксикоза рекомендуется прием кортикостероидов, например преднизолона, начиная с больших доз (60-100 мг в сутки) и по достижении положительного эффекта (обычно через 2-2,5 недели) постепенное снижение дозы (продолжительность лечения 1,5-3 мес). Результаты некоторых авторов и наш собственный опыт позволяют рекомендовать следующую схему приема преднизолона: 60-65 мг в течение первой недели; 50-55 мг – второй недели; 40-45 мг – третьей недели; 30-35 мг – четвертой недели; 20-25 мг – пятой недели; каждую последующую неделю доза уменьшается на 5 мг до 5 мг в день. Эту минимальную эффективную дозу рекомендуется принимать до окончания лечения (общая продолжительность лечения 2,5-3 мес). В случае если на одной из указанных доз отмечается ухудшение клинического течения офтальмопатии, необходимо дозу увеличить и затем снижать до минимально эффективной. Следует подчеркнуть, что при отмене глюкокортикоидов во избежание синдрома отмены необходимо в течение последней недели преднизолон оставить в дозе 2,5 мг в день или по 5 мг через день.
Если, несмотря на проводимое лечение, развиваются симптомы повышения давления в ретробульбарной области (резкая боль в глазных яблоках, чувство выталкивания глаз из орбит, ухудшение зрения вследствие сдавления глазного нерва), рекомендуется увеличить дозу глюкокортикоидов (иногда до 100 мг в сутки). Показано применение диуретиков и резерпина. Раньше считалось, что для терапии офтальмопатии глюкокортикоиды предпочтительнее вводить ретробульбарно. Приводились убедительные данные и аргументы в пользу ретробульбарного применения глюкокортикоидов. Исследованиями последних лет показано, что эффективность глюкокортикоидов при системном или ретробульбарном применении одинакова (L. DeGroot и соавт., 1995).
Некоторые авторы имеют удовлетворительные результаты при применении следующей схемы приема преднизолона: первые две недели по 100 мг ежедневно, а затем по 100 мг через день в течение до 12 недель и далее постепенное снижение дозы. Nagayama и соавт. (1987) рекомендуют так называемую “пульс-терапию” метилпреднизолоном. Ежедневно в течение трех дней проводится внутривенная медленная (в течение 60 мин) инфузия 1 г метилпреднизолона сукцината натрия. Повторные курсы в случае необходимости повторяются несколько раз с недельными интервалами.
Прием кортикостероидов можно сочетать с рентгенотерапией на область орбит в суммарной дозе 1000-2000 рад (грей-Гр). Рентгенотерапия проводится в течение до 2 недель и разовая доза облучения составляет 1,5-2 Гр. Передняя камера глаза, роговица и хрусталик должны быть защищены от воздействия радиации.

Как правило, под влиянием такой комплексной терапии уменьшаются инъекция сосудов склер, отечность век и протрузия глазных яблок на 1-3 мм. Если на фоне такой терапии офтальмопатия продолжает прогрессировать, рекомендуется декомпрессия глазниц с удалением отечной ретробульбарной клетчатки.

Хороший терапевтический эффект наблюдается при применении плазмафереза. Так, у наблюдаемых нами 4 больных прогрессирование офтальмопатии продолжалось, несмотря на проведенное лечение кортикостероидами, включая ретробульбарное введение дексаметазона и рентгенотерапию на область глазниц. После 3 сеансов плазмафереза (по 1800 мл) течение заболевания стабилизировалось, а затем отмечалась регрессия клинических признаков офтальмопатии. Очевидно, плазмаферез показан в тех случаях, когда терапия глюкокортикоидами и Т-активином не стабилизирует течение офтальмопатии. Плазмаферез должен предшествовать рентгенотерапии.

В.И. Мазуров с сотр. (1993) рекомендуют комплексное лечение в зависимости от степени тяжести аутоиммунной офтальмопатии. С целью профилактики офтальмопатии авторы применяли вольтарен (75 мг в день в течение 2-3 месяцев), дексаметазон по 4 мг ретробульбарно (10-15 инъекций), а при наличии нарушений иммунного статуса – плазмаферез (3 процедуры) с последующим приемом метатрексата по 0,0075 г в неделю в течение 3 мес. При офтальмопатии с вовлечением в процесс ретробульбарной клетчатки к приведенной выше схеме добавляли g-терапию на область орбиты. Положительные результаты получены во всех трех группах обследованных больных.

Необходимо еще раз подчеркнуть, что лечение офтальмопатии следует начинать как можно раньше, так как воспалительные процессы в ретробульбарных мышцах уже через 6-8 месяцев от начала процесса сменяются образованием соединительной ткани и тогда обратное развитие офтальмопатии под влиянием консервативной терапии уже невозможно и остается возможность применения только хирургического лечения.

При претибиальной микседеме местно на пораженную поверхность кожи применяются кортикостероиды (триамцинолоновая, бетаметазоновая, преднизолоновая мази, оксикорт и др.). Отмечено улучшение и после ультрафилетового облучения пораженного участка кожи.

Прогноз. При диффузном токсическом зобе благоприятный. Более чем у 60-70% больных ремиссия наступает под влиянием тиростатической терапии, приема препаратов йода. Часто ремиссия наступает спонтанно или в результате неспецифической терапии. Многочисленные работы, опубликованные в 1920-40 гг., показывают, что под влиянием лечения, которое сейчас можно рассматривать как неспецифическое (санаторно-курортное лечение, физиотерапия, бальнеотерапия и др.), в 80-90% наступала ремиссия. Это можно объяснить опосредованным влиянием (иммуномодулирующее действие) перечисленных факторов на иммунную систему и восстановление иммунно-нейро-гормональных взаимоотношений. Приведенные данные подтверждают положение о возможности спонтанной ремиссии при диффузном токсическом зобе, как и при других аутоиммунных заболеваниях.

I. Перечень вопросов для проверки конечного уровня знаний:

1. Определение диффузного токсического зоба.
2. Этиология и патогенез заболевания.
3. Клиническая картина, основные симптомы.
4. Класссификация степени увеличения щитовидной железы.
5. Диагностика диффузного токсического зоба.
6. Лечение.

II Самостоятельная работа обучающихся:

Составить ментальную карту по теме: «Гипертиреоз: биохимические основы ведущих симтомов».

III Список используемой литературы:

Обязательная:

3. Е.С. Северин «Биохимия», Москва 2004;
4. Е.С. Северин «Биохимия с упражнениями и задачами», Москва 2008;

Дополнительная:

3. Интернет ресурсы
4. Материал конспектов занятия

Тема: Перекисное окисление, роль перекисного окисления в норме и патологии.

I Научно-методическое обоснование темы:

1. Активные формы кислорода – классификация и свойства.

Кислород, необходимый организму для функционирования ЦПЭ и многих других реакций, является одновременно и токсическим веществом, если из него образуются так называемые активные формы.

- К активным формам кислорода относят:
- $OH^{\bullet}$ - гидроксильный радикал;
- $O_2^{\bullet-}$ - супероксидный анион;
- H_2O_2 - пероксид водорода.

А также пергидроксильный (HO2·), пероксильный (RO2·) и алкоксильный (RO·) радикалы, оксид азота (NO·), пероксинитрит (ONOO-), гипохлорит (HOCl), перекись водорода (H2O2) и др. Помимо продуктов восстановления O2, к АФК относят также озон (O3) и синглетный кислород 1O2, то есть кислород, находящийся в возбужденном (синглетном) состоянии [Владимиров, 1998; Осипов, Азизова, Владимиров, 2003].

Активные формы кислорода образуются во многих клетках в результате последовательного одноэлектронного присоединения 4 электронов к 1 молекуле кислорода. Конечный продукт этих реакций - вода, но по ходу реакций образуются химически активные формы кислорода. Наиболее активен гидроксильный радикал, взаимодействующий с большинством органических молекул. Он отнимает от них электрон и инициирует таким образом цепные реакции окисления. Эти свободнорадикальные реакции окисления могут выполнять полезные функции, например, когда клетки белой крови с участием активных форм кислорода разрушают фагоцитированные клетки бактерий. Но в остальных клетках свободнорадикальное окисление приводит к разрушению органических молекул, в первую очередь липидов, и, соответственно, мембранных структур клеток, что часто заканчивается их гибелью. Поэтому в организме функционирует эффективная система ингибирования перекисного окисления липидов (ПОЛ).

Источники активных форм кислорода

ЦПЭ как источник активных форм кислорода

Утечка электронов из ЦПЭ и непосредственное их взаимодействие с кислородом - основной путь образования активных форм кислорода в большинстве клеток.

Кофермент Q в ЦПЭ принимает от доноров последовательно по одному электрону, превращаясь в форму семихинона (рис. 8-55) - KoQH$^{\bullet}$ (см. раздел 6).

Этот радикал может непосредственно взаимодействовать с кислородом, образуя супероксидный анион $O_2^{\bullet-}$, который, в свою очередь, может превращаться в другие активные формы кислорода:

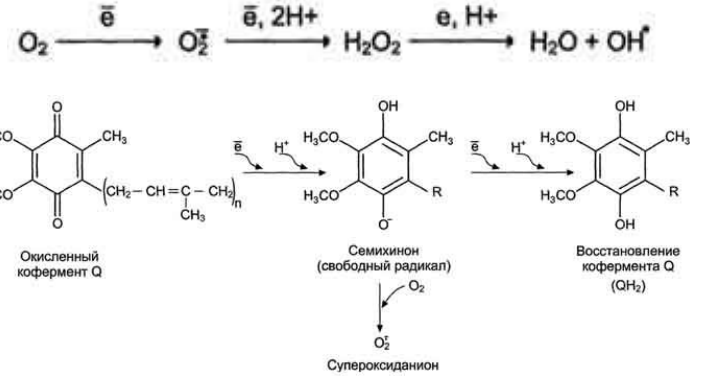


Рис. 1. Реакции последовательного восстановления убихинона вдыхательной цепи.

Многие оксидазы - ферменты, непосредственно восстанавливающие кислород, образуют пероксид водорода - H_2O_2. Оксидазы образуют пероксид водорода по схеме:

$O_2 + SH_2 \rightarrow S + H_2O_2$,

где SH_2 - окисляемый субстрат.

Примеры таких оксидаз - оксидазы аминокислот, супероксид дисмугаза, оксидазы, локализованные в пероксисомах. Оксидазы пероксидом окисляют, в частности, жирные кислоты с очень длинной углеродной цепью (более 20 углеродных атомов) до более коротких, которые далее подвергаются β-окислению в митохондриях.

Монооксигеназы, например, цитохром P_{450}, включающий один атом кислорода в окисляемую молекулу, и диоксигеназы, включающие оба атома кислорода, также служат источниками активных форм кислорода.

Пероксид водорода химически не очень активен, но способствует образованию наиболее токсичной формы кислорода - гидроксильного радикала ($OH^{\bullet}$) по следующей реакции:

$Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + OH^- + OH^{\bullet}$.

Наличие в клетках Fe^{2+} или ионов других переходных металлов увеличивает скорость образования гидроксильных радикалов и других активных форм кислорода. Например, в эритроцитах окисление иона железа гемоглобина способствует образованию супероксидного аниона.

Супероксидный анион-радикал (O_2^-). Среди кислородных свободных радикалов ему отводят наиболее значительную роль, так как считается, что именно он является родоначальником многих других активных форм кислорода. **Супероксидный радикал** (СОР) образуется при присоединении одного электрона к молекуле кислорода в основном состоянии [Chen, Warden, Stenken, 2004]. Химическая активность O_2^- в значительной степени зависит от физико-химического состояния окружающей его клеточной или внеклеточной среды. В водных растворах O_2^- способен окислять аскорбиновую кислоту, адреналин и тиоловые соединения, выступая как слабый окислитель [Хавинсон, Баринов, Арутюнян 2003]. Значительно более выражены восстановительные свойства супероксидного радикала. В присутствии ионов негемового железа СОР достаточно активно восстанавливает его из 3+ в 2+. Это свойство СОР чрезвычайно важно, поскольку двухвалентное железо играет большую роль в образовании агрессивных липидных и гидроксильных радикалов. Супероксидный радикал также может восстанавливать содержащие трехвалентное железо комплексы (цитохром с, ферри-ЭДТА) и нитросиний тетразолий.

Супероксиданион-радикал – пусковое звено каскада радикальных реакций, приводящих к возникновению большинства АФК и продуктов перекисного окисления липидов. Он участвует в синтезе хемотаксических пептидов, усиливает митогенстимулированную пролиферацию лимфоцитов, ингибирует действие эндотелиального фактора расслабления, может повреждать мембраны эритроцитов, ингибировать Са-АТФазу, синтез РНК и белка эндотелиальных клеток, окислять белки сыворотки, в тоже время его непосредственная цитотоксичность невелика.

2. Перекисное окисление липидов

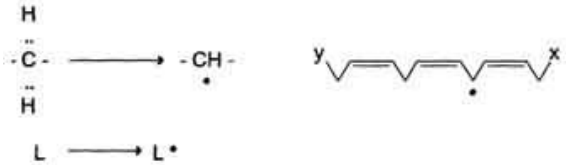
Все активные формы кислорода обладают высокой цитотоксичностью в отношении любых типов клеток и клеточных образований, что определяется их химической активностью. Можно выделить 4 наиболее вероятные мишени окислительной цитотоксической атаки АФК: индукция процессов ПОЛ в биологических мембранах, повреждение мембраносвязанных белков, инактивация ферментов и повреждение ДНК клеток.

Реакции перекисного окисления липидов (ПОЛ) являются свободнорадикальными и постоянно происходят в организме. Свободнора-дикальное окисление нарушает структуру многих молекул. В белках окисляются некоторые аминокислоты. В результате разрушается структура белков, между ними образуются ковалентные "сшивки", всё это активирует протеолитические ферменты в клетке, гидролизующие повреждённые белки. Активные формы кислорода легко нарушают и структуру ДНК. Неспецифическое связывание Fe^{2+} молекулой ДНК облегчает образование гидроксильных радикалов, которые разрушают структуру азотистых оснований. Но наиболее подвержены действию активных форм кислорода жирные кислоты, содержащие двойные связи, расположенные через CH_2-группу. Именно от этой CH_2-группы свободный радикал (инициатор окисления) легко отнимает электрон, превращая липид, содержащий эту кислоту, в свободный радикал.

ПОЛ - цепные реакции, обеспечивающие расширенное воспроизводство свободных радикалов, частиц, имеющих неспаренный электрон, которые инициируют дальнейшее распространение перекисного окисления.

Стадии перекисного окисления липидов

1) Инициация: образование свободного радикала (L•)



Инициирует реакцию чаще всего гидроксильный радикал, отнимающий водород от CH_2-групп полиеновой кислоты, что приводит к образованию липидного радикала.

2) Развитие цепи:

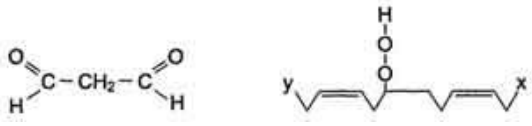
$$\mathbf{L\bullet + O_2 \rightarrow LOO\bullet}$$

$$\mathbf{LOO\bullet + LH \rightarrow LOOM + LR\bullet}$$

Развитие цепи происходит при присоединении O_2, в результате чего образуется липопе-роксирадикал LOO• или пероксид липида LOOH.

ПОЛ представляет собой свободнорадикальные цепные реакции, т.е. каждый образовавшийся радикал инициирует образование нескольких других.

3) Разрушение структуры липидов



Конечные продукты перекисного окисления полиеновых кислот - малоновый диальдегид и гидропероксид кислоты.

4) Обрыв цепи - взаимодействие радикалов между собой:

LOO• + L• → LOOH + LH, L• + vit E → LH + vit E•

vit E• + L• → LH + vit $E_{окисл.}$

Развитие цепи может останавливаться при взаимодействии свободных радикалов между собой или при взаимодействии с различными антиоксидантами, например, витамином Е, который отдаёт электроны, превращаясь при этом в стабильную окисленную форму.

В последние годы широко обсуждается роль активных форм кислорода (АФК) и инициируемых ими свободнорадикальных процессов при различных патологических процессах. В нормальных условиях активность этих процессов находится на невысоком уровне, но при стрессовых ситуациях происходит усиленное образование АФК, под действием которых происходит избыточная и неконтролируемая активация процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ), что в конечном итоге может привести к патологическому состоянию, которое сопровождается дисбалансом ферментативных и неферментативных компонентов системы антиоксидантной защиты. Характерным проявлением окислительного стресса является интенсификация процессов перекисного окисления липидов, индикатором которой служит увеличение содержания хотя бы одного из его продуктов. Данные о содержании продуктов ПОЛ в биологических объектах могут нести в себе информацию о глубине и степени патологического процесса. В качестве количественных маркеров наиболее часто используются такие интермедиаты ПОЛ, как диеновые конъюгаты (ДК), а также один из его конечных продуктов – малоновый диальдегид (МДА).

II Цель деятельности обучающихся на занятии

Обучающийся должен знать:

1. АФК. Каким действием они обладают;
2. Источники образования АФК;
3. ПОЛ в норме;
4. ПОЛ при патологии;
5. Стадии ПОЛ;

Обучающийся должен уметь:

1. Написать стадии ПОЛ.

IIIСодержание обучения:

Основные вопросы:

1. АФК. Механизм действия;
2. Источники АФК в организме;
3. ПОЛ в норме;
4. Особенности ПОЛ в условиях патологии;
5. Стадии ПОЛ;

IV Перечень лабораторных работ, наглядных пособий и средств ТСО.

Наглядные пособия:

Рисунки: 1. Реакции последовательного восстановления убихинона вдыхательной цепи;
2. Повреждающее действие свободных радикалов на компоненты клетки.

V Наименование лабораторной работы:

VI Перечень вопросов для проверки исходного уровня знаний:

Самостоятельная работа: составление тестов и кроссворда по теме ПОЛ.

Тестовый контроль:

Тема: ПОЛ.

1. К активным формам кислорода относят:

1. OH- - гидроксильный радикал;
2. супероксидный анион;
3. H2O2 - пероксид водорода
4. все перечисленное

Отв.: 4

2. Образование активных форм кислорода происходит:

1. в процессе переноса электронов в митохондриальной дыхательной цепи;
2. в реакциях, которые катализируются оксидазами (образуется перекись водорода), в том числе в свободнорадикальных процессах, совершающихся в фагоцитах;
3. в реакциях микросомального окисления при обезвреживании веществ с участием цитохрома Р-450;
4. в реакциях самопроизвольного (неферментативного) окисления веществ (гемоглобина, ферредоксинов, адреналина и др.);
5. в биологических системах с наличием ионов металлов с переменной валентностью и, прежде всего, железа (свободных атомов, так называемых внегемовых);
6. верно все

Отв.: 6

3. Перечислите ряд причин, вызывающих активацию ПОЛ в тканях:

1. снижение поступления в организм алиментарных антиоксидантов (АО), таких как: токоферол, аскорбат, биофлавоноиды и др.;
2. стресс различного генеза, в частности эмоциональный (под влиянием катехоламинов и кортикостероидов в кровь поступает избыток жирных кислот и кислород);
3. внешние химические прооксиданты (пестициды, лекарственные окислители, алкоголь, продукты смога и т.д.);
4. физические факторы (повышенный радиоактивный фон, ультрафиолетовое облучение, электромагнитное поле, ультразвук с интенсивностью выше 2 Вт/см);
5. избыточное и несбалансированное потребление жиров и углеводов на фоне недостаточного их расходования;
6. гипокинезия с низким уровнем биологического окисления ферментов, т.е. сниженный уровень восстановления пиридиннуклеотидов;
7. врожденные энзимопатии антиоксидантных ферментов (каталазы, глутатионредуктазы, глутатионпероксидазы, глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназы);
8. падение с возрастом активности антиоксидантных ферментов.
9. верного ответа нет
10. верно все перечисленное

Отв.: 10

4. Этот витамин активирует ПОЛ так как является полиненасыщенным спиртом и легко окисляется кислородом может быть прооксидантом (в высоких дозах):

1. К:
2. А;
3. Д;
4. Е;
5. РР

Отв.: 2

5. Процесс свободнорадикального перекисного окисления липидов можно условно разделить на три этапа. Перечислите их в правильной последовательности.

1. продукция перекисей липидов (перекисный этап);
2. образование свободных радикалов органических и неорганических веществ (свободнорадикальный этап);
3. кислородная инициация (кислородный этап

Отв.: 3,2,1

IX Самостоятельная работа обучающихся:

Составление тестов и кроссвордов по данной теме.

X Список используемой литературы:

Обязательная:

1. Биохимия. Учебник для вузов / Под ред. Е.С.Северина. М.:Гэотар-мед, 2003. 784 с.
2. Березов Т.Т., Коровкин Б.Ф. Биологическая химия, Москва, 1998. 740 с.
3. Биохимия. Краткий курс с упражнениями и задачами. Под ред. проф. Е.С.Северина и проф. А.Я.Николаева. М.: Гэотар-мед, 2001. 441 с.
4. Строев Е.А. Биологическая химия. Москва, 1986.
5. Дзугкоева Ф.С., Калоева Л.А., Каряева Э.А., Гурина А.Е., Баллаева С.А. «Обмен веществ (учебно-методическое пособие)» с грифом Учебно -методическое объединение МЗ РФ, Владикавказ, 2003. 170 с.

Дополнительная:

1. Владимиров Ю.А. Свободные радикалы в живых системах / Ю.А. Владимиров, О.А. Азизова, А.И. Деев с соавт. // Итоги науки и техники, 2000. – Т. 29. - С. 151-167.
2. Евстигнеева Р.П. Витамин Е как универсальный антиоксидант и стабилизатор биологических мембран / Р.П. Евстигнеева, И.М. Волков, В.В. Чудинова // Биол. Мембраны, 2003. - № 2. С. 119-137.
3. Зборовская В.А. Антиоксидантная система организма, ее значение в метаболизме / В.А. Зборовская, М.В. Банникова // Вестник РАМН, 2000. - № 6. - С. 53-63.
4. Зенков Н.К. Окислительный стресс / Н.К. Зенков, В.З. Ланкин, Е.Б. Меньщикова. - М.: Наука, 2004. - 343с.
5. Лакин Г.Ф. Биометрия / Г.Ф. Лакин. - М.: Высш. школа, 1998. - 293с.

6. Соловьева А.Г. Активность альдегиддегидрогеназы в эритроцитах, тромбоцитах и плазме крови крыс в норме и при ожоге / А.Г. Соловьева // Успехи соврем. Естествознания, 2007. - № 12. – С. 12-15.
7. Суханова Т.А Патохимия клетки / Т.А. Суханова // Успехи соврем. биологии, 2004. – Т. 40. – С. 82-104.
8. Шепелев А.П. Роль процессов свободнорадикального окисления в патогенезе инфекционных болезней / А.П. Шепелев, И.В. Корниенко, А.В. Шестопалов с соавт. // Вопр. мед. Химии, 2004. - № 2. - С. 15-17.

Наглядные пособия **по теме: Перекисное окисление липидов в норме и патологии.**

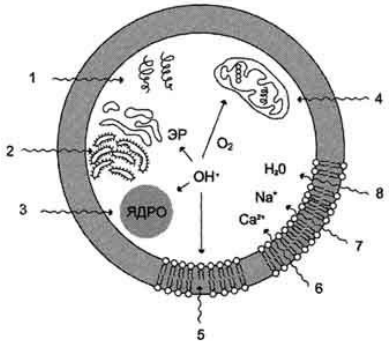


Рис. 1. Повреждающее действие свободных радикалов на компоненты клетки. 1 - разрушение белков; 2 - повреждение ЭР; 3 - разрушение ядерной мембраны и повреждение ДНК; 4 - разрушение мембран митохондрий; 5 - ПОЛ клеточной мембраны; 6, 7, 8 - проникновение в клетку воды и ионов.

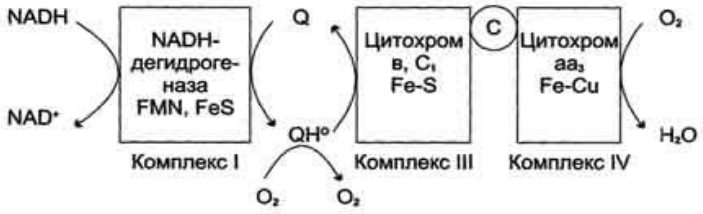


Рис. 2. Образование супероксида в ЦПЭ. "Утечка" электронов в ЦПЭ может происходить при переносе электронов с участием коэнзима Q. При восстановлении убихинон превращается в анион-радикал семихинона. Этот радикал неферме́нта-тивно взаимодействует с O_2 с образованием супероксидного радикала. Комплекс II на рисунке не указан.

Тема: Ферментативное звено антиоксидантной защиты (каталаза, пероксидаза, супероксиддисмутаза). Антиоксиданты.

Антиоксидантная система (АОС).

Образование АФК, известных как прооксиданты, наблюдается во многих метаболических процессах и является обязательным атрибутом нормальной аэробной жизни. Функционирование и развитие клеток, а также организма в целом, в кислородсодержащем окружении не могло бы быть возможным без существования защитных систем, основу которых составляют ферментативные и неферментативные антиоксиданты. Постоянное образование прооксидантов в живых организмах уравновешено их дезактивацией антиоксидантами, поэтому для поддержания гомеостаза необходима непрерывная регенерация антиоксидантной способности. Отсутствие или сбои этой непрерывности сопровождаются накоплением окислительных повреждений и приводят к возникновению окислительного стресса.

Классификация АОС системы:

А.Специфическая АОС:

- Специализированные ферментные системы:
- ✓ Супероксиддисмутаза (СОД);
- ✓ Каталаза (КАТ);
- ✓ Глутатионпероксидаза и глутатион трансфераза (ГПО и ГТ)

(локализуются преимущественно внуриклеточноо0

- Специализированные неферментные системы:
- ✓ Жирорастворимые антиоксиданты (АО): витамины Е,А,К; стероидные гормоны; влавоноиды; полифенолы (витамин Р, убихинон).
- ✓ Аскорбатная АО-система;
- ✓ Тиолдисульфидна система на основе глутатиона;
- ✓ Ароматические соединения.

Б. Неспецифическая АОС

Основными функциями специфической АОС являются:

1. ограничение интенсивности реакции свободнорадикального и перекисного окисления, т.е. разрушение, образующихся АФК и продуктов их дальнейших превращений;
2. защита чувствительных к окислительным повреждениям биомолекул мембран, внутри - и внеклеточных структур от действия свободных радикалов и перекисных соединений;
3. восстановление окислительных молекулярных повреждений. В целом основная задача системы антиоксидантной защиты состоит в предотвращении и ограничении развития патологических состояний, вызываемых окислительными повреждениями структур организма.

Неспецифическая АОС

Функция: предотвратить условия в процессе аутоокисленисубстратов (микросомальное окисление).

4. Ферментативное звено АОС

К ферментам, защищающим клетки от действия активных форм кислорода, относят супероксиддисмутазу, каталазу и глутатионпероксидазу; Наиболее активны эти ферменты в печени, надпочечниках и почках, где содержание митохондрий, цитохрома P_{450} и пероксисом особенно велико.

СОД - это ключевой водорастворимый фермент. Превращает супероксидные анионы в пероксид водорода: $2O_2^{\bullet-} + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$ интка, железа и имидазол гистидина. Локализуется в цитоплазме. Обладает высокой термоустойчивостью, устойчив к действию протеаз, обладает широким оптимумом pH каталитической активности.

Изоферменты СОД находятся и в цитозоле и в митохондриях и являются как бы первой линией защиты, потому что супероксидный анион образуется обычно первым из активных форм кислорода при утечке электронов из дыхательной цепи.

СОД - индуцируемый фермент, т.е. синтез его увеличивается, если в клетках активируется перекисное окисление. Пероксид водорода, который может инициировать образование самой активной формы ОН•, разрушается ферментом каталазой: $\mathbf{2H_2O_2 \rightarrow 2\ H_2O + O_2}$.

Каталаза (КАТ) находится в основном в пероксисомах, где образуется наибольшее количество пероксида водорода, а также в лейкоцитах, где она защищает клетки от последствий "респираторного взрыва".

КАТ обеспечивает расщепление перекисси водорода до двух молекул воды и кислорода. Из-за большго молекулярного веса практичеки не проникает через мембрану клетки.

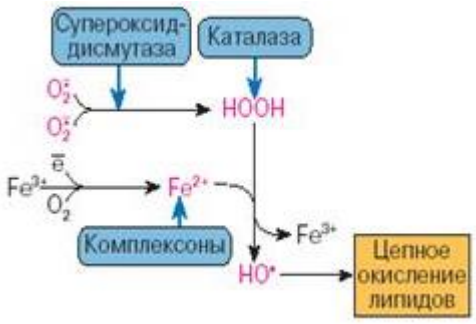


Рис.2. Антиоксиданты водной фазы

Глутатионпероксидаза (ГПО) - важнейший фермент, обеспечивающий инактивацию АФК, так как он разрушает и пероксид водорода и гидропероксиды липидов. Он катализирует восстановление пероксидов с помощью трипептида глутатиона (γ-глутамилцистеинилглицин). Сульфгидрильная группа глутатиона (GSH) служит донором электронов и, окисляясь, образует дисульфидную форму глутатиона, в которой 2 молекулы глутатиона связаны через дисульфидную группу.

$$H_2O_2 + 2\ GSH \rightarrow 2\ H_2O + G\text{-}S\text{-}S\text{-}G.$$

Окисленный глутатион восстанавливается глутатионредуктазой:

$$GS\text{-}SG + NADPH + H^+ \rightarrow 2\ GSH + NADP^+.$$

Глутатионпероксидаза, которая восстанавливает гидропероксиды липидов в составе мембран, в качестве кофермента использует **селен** (необходимый микроэлемент пищи). При его недостатке активность антиоксидантной защиты снижается.

ГПО является главной ферментативной системой плазмы крови: внеклеточных жидкостей и гидроперекисей липидов (ГПО 4), которая будучи липофильным соединением эффективно взаимодействует с гидроперекисями фосфотидилхолина, холестерина и эфиров холестерина в липопротеинах низкой плотности (ЛПНП), восстанавливая их, следовательно, защищая от окислительной модификации. Кроме того, ГПО 4 совместно с токоферолом практически полностью подавляет ПОЛ в биологических мембранах благодаря тому, что витамин Е эффективно восстанавливает пероксирадикалы, а фермент разлагает гидроперекиси, препятствуя тем самым их вовлечению в окислительный цикл.

Глутатионтрансфераза (ГТ)

ГТ, в отличие от селенсодержащей ГПО, для которой лучшими субстратами являются гидрофильные гидроперекиси с малым размером молекул, эффективно восстанавливает гидрофобные гидроперекиси с большим объемом молекулы: гидроперекиси полиненасыщенных жирных кислот (линолевой и арахидоновой), фосфолипидов.

Вместе с тем во всех водных и липидных фазах организма могут протекать радикальные окислительные процессы, в защите от которых важную роль играют антиоксиданты-ингибиторы органических радикалов, среди которых важное место занимают соединения фенольного типа.

В настоящее время выделено несколько тысяч фенольных соединений, среди которых выраженным антиоксидантным эффектом обладают витамины Е и К, убихиноны, триптофан и фенилаланин, а также большинство растительных (флавоноиды) и животных пигментов.

Неферментативнгое звено АОС

Витамин Е (α-токоферол) - наиболее распространённый антиоксидант в природе - является липофильной молекулой, способной инактивировать свободные радикалы непосредственно в гидрофобном слое мембран и таким образом предотвращать развитие цепи перекисного окисления. Различают 8 типов токоферолов, но α-токоферол наиболее активен.

Витамин Е отдаёт атом водорода свободному радикалу пероксида липида (ROO•), восстанавливая его до гидропероксида (ROOH) и таким образом останавливает развитие ПО. Свободный радикал витамина Е, образовавшийся в результате реакции, стабилен и не способен участвовать в развитии цепи. Наоборот, радикал витамина Е непосредственно взаимодействует с радикалами липидных перекисей, восстанавливая их, а сам превращается в стабильную окисленную форму -- токоферолхинон.

В антирадикальной защите липопротеинов плазмы крови и клеточных мембран α-токоферолу принадлежит ведущая роль – одна его молекула защищает ≈10000 молекул ненасыщенных жирных кислот, при этом считается, что α-токоферол способен обезвредить не менее 60% образующихся пероксильных радикалов. Окисление α-токоферола со свободными радикалами компенсируется биорегенерацией молекул этого антиоксиданта в реакциях восстановления коантиоксидантами (АН), редокс-потенциал которых ниже, чем у радикала α-токоферола (α-Тф-О.). В результате такой реакции не только происходит восстановление витамина Е, но и предотвращается возможность инициации α-токофероксильным радикалом окисления липидов:

α-Тф-О. + RH→ α-Тф-ОН + R. (1)

α-Тф-О. + АН→ α-Тф-ОН + А. (2)

В физиологических условиях вторая реакция обычно превалирует над первой, так как константа скорости реакции α-Тф-О. с НЖК не превышает 103М-1с-1, в то время как для реакции (1) константа

скорости может достигать значений 104-107М-1с-1.К наиболее изученным коантиоксидантам относятся убихинол, аскорбиновая кислота (АК), билирубин.

Витамин Е (а-токоферол) ингибирует свободнорадикальное окисление путём отдачи электрона, что приводит к инактивации радикала липида, а витамин Е превращается в стабильный, полностью окисленный токоферолхинон.

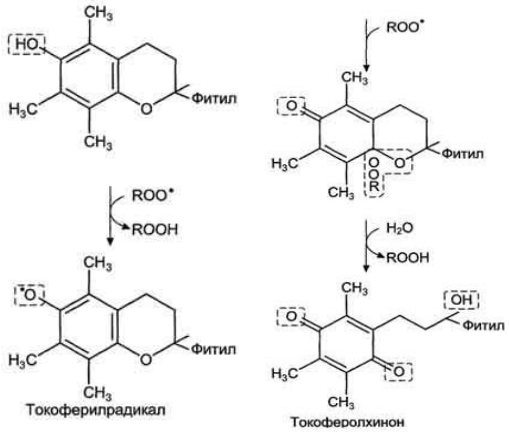


Рис. 3. Механизм антиоксидантного действия витамина Е.

Рис.4. Окислительно-восстановительные превращения α-токоферола и сопряженных с ним коантиоксидантов.

Витамин С (Рис.5.) (аскорбиновая кислота) также является антиоксидантом и участвует с помощью двух различных механизмов в ингибировании ПОЛ. Во-первых, витамин С восстанавливает окисленную форму витамина Е и таким образом поддерживает необходимую концентрацию этого антиоксиданта непосредственно в мембранах клеток. Во-вторых, витамин С, будучи водорастворимым витамином и сильным восстановителем, взаимодействует с водорастворимыми активными формами кислорода - $O_2^{\bullet}$, H_2O_2, OH• и инактивирует их.

β-**Каротин,** предшественник витамина А (рис.6.), также обладает антиоксидантаьш действием и ингибирует ПОЛ. Показано, что растительная диета, обогащённая витаминами Е, С, кароти-ноидами, существенно уменьшает риск развития атеросклероза и заболеваний ССС, подавляет развитие катаракты - помутнения хрусталика глаза, обладает антиканцерогенным действием. Имеется много доказательств в пользу того, что положительное действие этих компонентов пищи связано с ингибированием ПОЛ и других молекул и, следовательно, с поддержанием нормальной структуры компонентов клеток.

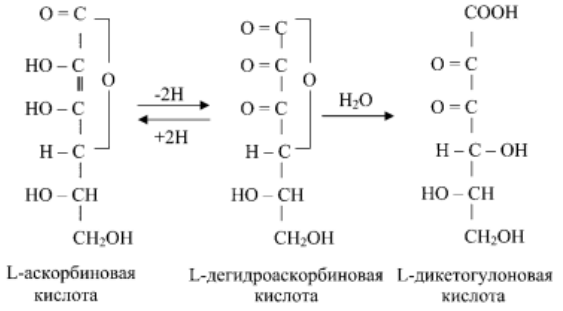


Рис.5. Витамин С.

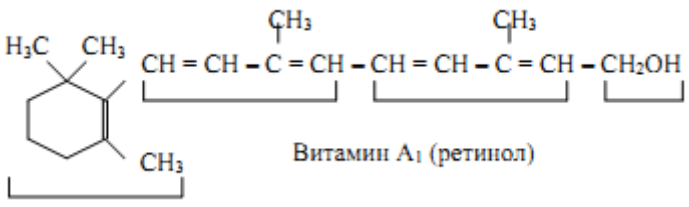


Рис. 6. Витамин А

АК превосходит другие антиоксиданты плазмы в защите липидов от перекисного окисления, так как только это соединение достаточно реакционноспособно, чтобы эффективно ингибировать инициацию ПОЛ в водной фазе.

Важными внеклеточными антиокислителями являются альбумины – простые гидрофильные белки плазмы крови, которые являются основными носителями SH групп. SH содержащим соединениям принадлежит ведущая роль в защите клеток от ОН-радикала, образующегося в реакции Фентона или в результате разложения молекул воды под действием ионизирующих излучений.

Необходимо отметить наличие антирадикальных свойств у белков, хелатирующих ионы железа и других металлов с переменой валентностью. В первую очередь это трансферрин, лактоферрин и церулоплазмин. Основная роль трансферрина и близкого ему по структуре лактоферрина, содержащегося в молоке и выделяющегося фагоцитами при их активации, состоит в акцептировании «свободного» железа, что препятствует образованию радикалов НО, в реакциях Фентона, катализируемых ионами Fe. Значимую роль в этом процессе играет церулоплазмин, Cu-содержащий белок, обеспечивающий окисление Fe 2+ до Fe3+ и делающий тем самым железо доступным для связывания трансферрина.

Наиважнейшим антиоксидантом внеклеточной жидкости является мочевая кислота (МК). Ввиду высокого ее содержания в плазме крови человека некоторые исследователи считают, что на нее приходится 35-65% защиты липопротеинов от окисления, 10-15% ингибирования НО. и 12% ингибирования синглетного кислорода. Кроме того, МК может выступать синергистом с радикалами α-токоферола и аскорбиновой кислотой, что усиливает их антиоксидантное действие.

II Цель деятельности обучающихся на занятии

Обучающийся должен знать:

1. АОС, классификация, функции;
2. Ферментативное звено АОС;
3. Описать действие СОД, характеристики;
4. КАТ. Механизм действия;
5. ГПО и ГП. Механизм действия;
6. Неферментативное звено АОС;
5. Роль ионов меди, цинка, железа и других металлов в АОС;
6. «Окислительный стресс»;

Обучающийся должен уметь:

1. Уметь писать реакцию, катализируемую СОД;
2. Уметь писать реакцию, катализируемую КАТ;
3. Роль витамина Е в стрессовой ситуации.

IIIСодержание обучения:

Основные вопросы:

1. АОС, классификация, функции;
2. Ферментативное звено АОС;
3. Характеристики СОД. Механизм действия;
4. КАТ. Механизм действия;
5. ГПО и ГП. Механизм действия;
6. Неферментативное звено АОС;
7. Роль витамина Е в стрессовой ситуации.
8. Роль витамина А, К в защите клеток от действия АФК;
9. Роль ионов меди, цинка, железа и других металлов в АОС;
10. «Окислительный стресс».

IV Перечень лабораторных работ, наглядных пособий и средств ТСО.

Наглядные пособия:

Рисунки: 1. Реакции последовательного восстановления убихинона в дыхательной цепи; 2. Антиоксиданты водной фазы; 3. Механизм антиоксидантного действия витамина Е; 4. Окислительно-восстановительные превращения α-токоферола и сопряженных с ним коантиоксидантов; 5. Витамин С. 6. Витамин А; 7. Образование супероксида в ЦПЭ.

V Наименование лабораторной работы:

VI Перечень вопросов для проверки исходного уровня знаний:

Тестовый контроль:

1. Антиоксиданты нужны для…, исключите неправильный ответ:

1. обновления липидного состава мембран;
2. синтеза эйкозаноидов
3. обезвреживания ксенобиотиков и токсичных продуктов метаболизма;
4. функционирования иммунной системы.
5. синтеза глюкогона

Отв.: 1,2,4,5

2. Оксидативный стресс приводит:

1. Повреждение ДНК, белков, липидов мембран.
2. Канцерогенез, нейродегенеративные болезни, атеросклероз, сахарный диабет, сердечно сосудистые заболевания, старение.
3. 1,2

Отв.: 1,2

3. Этот витамин ингибирует свободнорадикальное окисление путём отдачи электрона, что приводит к инактивации радикала липида и превращается в стабильный, полностью окисленный токоферолхинон:

1. B1
2. PP
3. E
4. C
5. Д

Отв.: 3

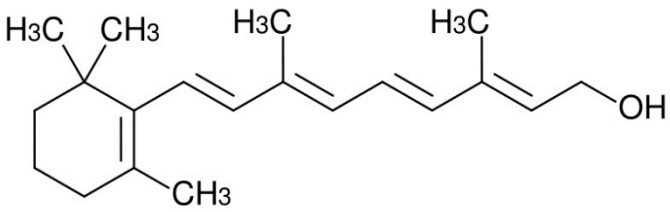
4. Вит. А:

1. увеличивает антиоксидантное действие Вит. Е; Вместе с Вит. Е и Вит. С;
2. активирует включение Se в состав *глутатионпероксидазы;*
3. препятствует окислению SH-групп белков и пептидов.
4. может быть прооксидантом
5. все верно

Отв. 5

5.Структура, какого витамина представлена ниже:

1. A;
2. Д;
3. E;
4. PP;
5. K



Отв.: 1

IX Самостоятельная работа обучающихся:

Составление тестов и кроссвордов по данной теме.

X Список используемой литературы:

Обязательная:

1. Биохимия. Учебник для вузов / Под ред. Е.С.Северина. М.:Гэотар-мед, 2003. 784 с.
2. Березов Т.Т., Коровкин Б.Ф. Биологическая химия, Москва, 1998. 740 с.
3. Биохимия. Краткий курс с упражнениями и задачами. Под ред. проф. Е.С.Северина и проф. А.Я.Николаева. М.: Гэотар-мед, 2001. 441 с.
4. Строев Е.А. Биологическая химия. Москва, 1986.
5. Дзугкоева Ф.С., Калоева Л.А., Каряева Э.А., Гурина А.Е., Баллаева С.А. «Обмен веществ (учебно-методическое пособие)» с грифом Учебно -методическое объединение МЗ РФ, Владикавказ, 2003. 170 с.

Дополнительная:

9. Владимиров Ю.А. Свободные радикалы в живых системах / Ю.А. Владимиров, О.А. Азизова, А.И. Деев с соавт. // Итоги науки и техники, 2000. – Т. 29. - С. 151-167.
10. Евстигнеева Р.П. Витамин Е как универсальный антиоксидант и стабилизатор биологических мембран / Р.П. Евстигнеева, И.М. Волков, В.В. Чудинова // Биол. Мембраны, 2003. - № 2. С. 119-137.
11. Зборовская В.А. Антиоксидантная система организма, ее значение в метаболизме / В.А. Зборовская, М.В. Банникова // Вестник РАМН, 2000. - № 6. - С. 53-63.
12. Зенков Н.К. Окислительный стресс / Н.К. Зенков, В.З. Ланкин, Е.Б. Меньщикова. - М.: Наука, 2004. - 343с.
13. Лакин Г.Ф. Биометрия / Г.Ф. Лакин. - М.: Высш. школа, 1998. - 293с.
14. Соловьева А.Г. Активность альдегиддегидрогеназы в эритроцитах, тромбоцитах и плазме крови крыс в норме и при ожоге / А.Г. Соловьева // Успехи соврем. Естествознания, 2007. - № 12. – С. 12-15.
15. Суханова Т.А Патохимия клетки / Т.А. Суханова // Успехи соврем. биологии, 2004. – Т. 40. – С. 82-104.

16. Шепелев А.П. Роль процессов свободнорадикального окисления в патогенезе инфекционных болезней / А.П. Шепелев, И.В. Корниенко, А.В. Шестопалов с соавт. // Вопр. мед. Химии, 2004. - № 2. - С. 15-17.

Наглядные пособия **по теме: Перекисное окисление липидов в норме и патологии.**

Рис. 1. Реакции последовательного восстановления убихинона вдыхательной цепи.

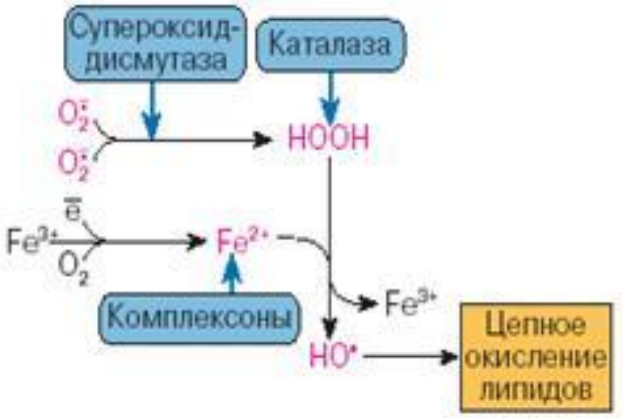


Рис.2. Антиоксиданты водной фазы

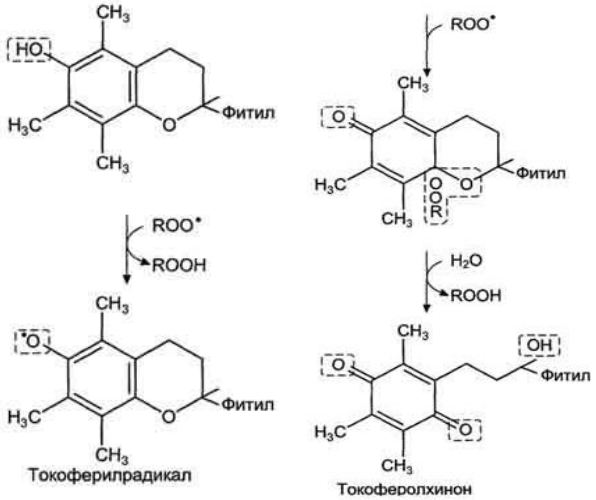


Рис. 3. Механизм антиоксидантного действия витамина Е.

Рис.4. Окислительно-восстановительные превращения α-токоферола и сопряженных с ним коантиоксидантов.

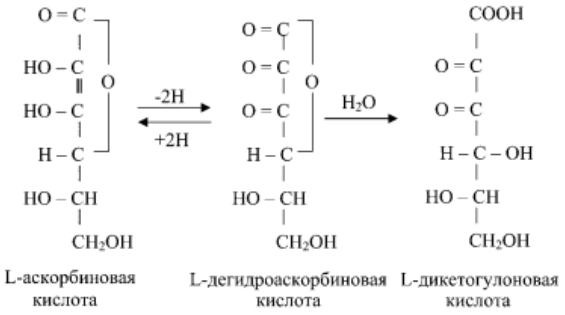


Рис.5. Витамин С.

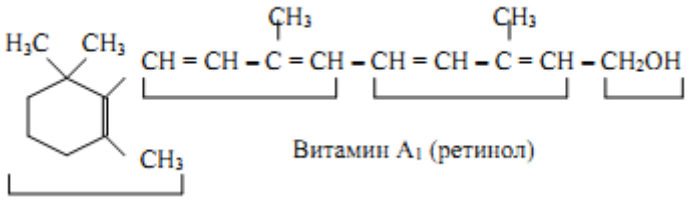


Рис. 6. Витамин А

Тема:Механизм оксигеназного окисления. Монооксигеназы (МОГ) и диоксигеназы (ДОГ), их важнейшие субстраты.

Оксигеназы это ферменты, которые катализируют включение кислорода в молекулу субстрата, они участвуют в синтезе и деградации многих типов метаболитов. Оксигеназы работают в составе мультиферментных комплексов, встроенных в мембрану. По способу включения кислорода их делят на: монооксигеназы и диоксигеназы.

Монооксигеназы это ферменты, которые включают в субстрат только один атом молекулы кислорода. Другой атом кислорода восстанавливается до воды с участием электронов и протонов $НАДФН_2$, $НАДН_2$, реже витамин С: $A\text{-}H + O_2 + ZH_2 \rightarrow A\text{-}OH + H_2O + Z$

Монооксигеназные реакции протекают на цитоплазматической поверхности гладкого ЭПР, их называют микросомальным окислением, и на внутренней поверхности внутренней мембраны митохондрии.

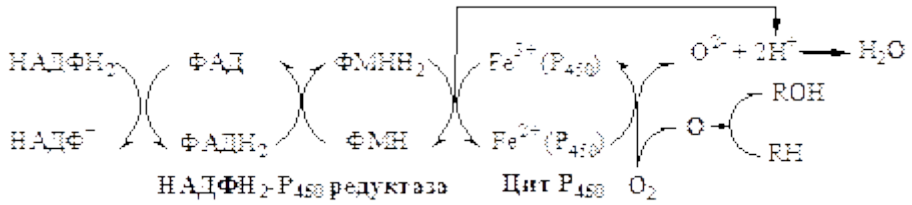
Катализируют низкоспецифичные реакции. Эти монооксигеназы функционируют в комплексе с различными ЦПЭ:

А. Цепь $НАДФН_2$-$Р_{450}$ редуктаза – Цитохром $Р_{450}$

Донорами протонов и электронов для этой цепи являются $НАДФН_2$.

$НАДФН_2$-$Р_{450}$ редуктаза. Цитозольный домен содержит 2 кофермента ФАД и ФМН, гидрофобный домен фиксирует фермент в мембране. $НАДФН_2$-$Р_{450}$ редуктаза переносит 2 электрона с $НАДФН_2$на цитохром $Р_{450}$.

Цитохром $Р_{450}$ – интегральный гемопротеин, содержит простетическую группу гем, имеет участки связывания для кислорода и субстрата. Открыто 150 генов, кодирующих различные изоформы цитохрома $Р_{450}$. Каждая из изоформ $Р_{450}$ имеет много субстратов. Цитохром $Р_{450}$передает 2 электрона на 1 атом молекулы кислорода, который превращается в O^{2-}, при взаимодействии с 2 протонами O^{2-} дает воду. Второй атом молекулы кислорода включается в субстрат RH, образуя ROH.



Субстратами являются гидрофобные вещества экзогенного (лекарства, ксенобиотики) и эндогенного (стероиды, жирные кислоты и т.д.) происхождения.

Регуляция активности осуществляется индукцией синтеза ферментов. Открыто более 250 веществ-индукторов. Например: барбитураты, спирты, кетоны, стероиды, ароматические углеводороды.

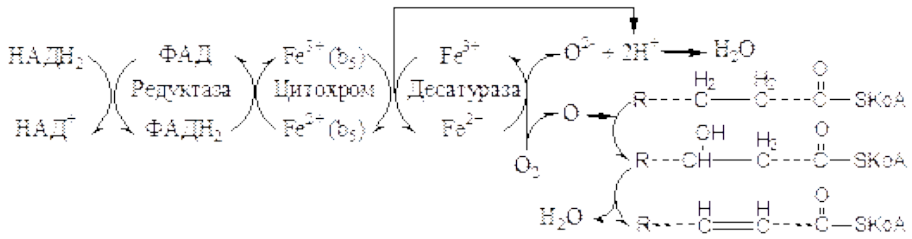
Б. Цепь $НАДН_2$-цитохром b_5 редуктаза – Цитохром b_5 – стеароил-КоА-десатураза

Донорами протонов и электронов для этой цепи являются $НАДН_2$.

$НАДН_2$-цитохром b_5 редуктаза – двухдоменный белок, цитозольный домен содержит ФАД, гидрофобный домен фиксирует фермент в мембране. $НАДН_2$-b_5 редуктаза переносит 2 электрона с $НАДН_2$ на цитохром b_5.

Цитохром b_5. Цитозольный домен содержит гем, гидрофобный домен фиксирует фермент в мембране. Цитохром b_5 может передавать свои электроны на различные ферменты (цитохром$Р_{450}$, Стеароил-КоА-десатуразу и т.д.), образуя различные ЦПЭ, при этом он участвует в десатурации и элонгации жирных кислот, в синтезе холестерина, плазминогенов и церамида.

Стеароил-КоА-десатураза – интегральный фермент, содержит негеминовое железо. Катализирует образование 1 двойной связи между 9 и 10 атомами углерода в жирных кислотах. Стеароил-КоА-десатураза переносит электроны с цитохрома b_5 на 1 атом кислород, при участии протонов этот кислород образует воду. Второй атом кислорода включается стеариновую кислоту с образованием её оксиацила, который дегидрируется до олеиновой кислоты.



Митохондриальные монооксигеназные системы

Митохондриальные монооксигеназные системы состоят из нескольких компонентов, локализованных на внутренней поверхности внутренней мембране митохондрий, и катализируют высокоспецифичные реакции. Компонентами этих систем могут быть: $НАДН_2$-зависимые ФАД-содержащее редуктазы, Fe_2S_2-белки (адренодоксин), цитохромы P_{450}, b_5, элонгазы и т.д.

Эти системы находятся в стероидогенных тканях — в коре надпочечников, в семенниках, яичниках и плаценте; они участвуют в биосинтезе стероидных гормонов из холестерола (гид-роксилирование по C_{22} и C_{20} при отщеплении боковой цепи и по положениям 11β и 18).

Ферменты почечной системы катализируют гидроксилирование 25-гидроксихолекальциферола по положениям 1α и 24; в печени происходит гидроксилирование холестерола по положению 26 при биосинтезе желчных кислот.

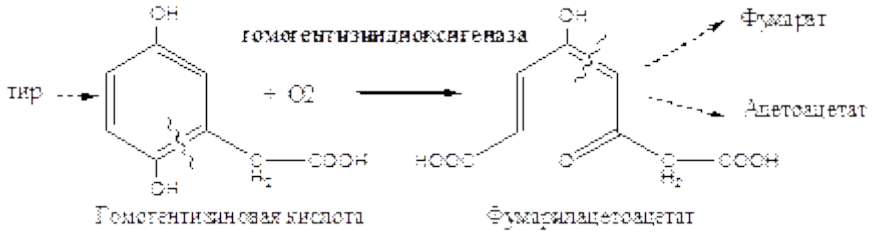
Пролингидроксилазы включают гидроксильные группы в аминокислотные остатки пролина в молекуле проколлагена. Донором протонов и электронов для нее является витамин С. С оксипролином зрелый коллаген приобретает большую механическую прочность.

Диоксигеназы это ферменты, которые включают в субстрат оба атома молекулы кислорода:

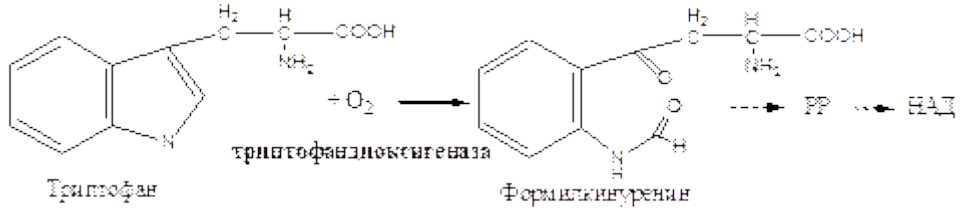
$A + O_2 \rightarrow AO_2$

Таким путем окисляются циклические труднокисляемые структуры, реакции идут с разрывом цикла. Диоксигеназные реакции протекают на цитоплазматической поверхности гладкого ЭПР.

Например, гомогентизатдиоксигеназа печени, содержит Fe^{2+}, участвует в катаболизме тирозина:



L-триптофандиоксигеназа печени, содержит гем, участвует в катаболизме триптофана:



I Перечень вопросов для проверки конечного уровня знаний:

1.Оксигеназы, опреджеление, характеристика.

2.Классификация оксигеназ, их характеристика.

3.Митохондриальные монооксигеназные системы.

4.Механизм оксигеназного окисления.

II Самостоятельная работа обучающихся: составить ментальную карту по теме: «Механизм оксигеназного окисления. Монооксигеназы (МОГ) и диоксигеназы (ДОГ), их важнейшие субстраты».

III Список используемой литературы:

Обязательная:

1.Е.С. Северин «Биохимия», Москва 2004;

2.Е.С. Северин «Биохимия с упражнениями и задачами», Москва 2008;

Дополнительная:

1.Интернет ресурсы

2. Материал конспектов занятия

Тема: Использование ДНК-технологий для диагностики некоторых заболеваний и получения лекарственных препаратов.

В настоящее время стало очевидным, что достижения в области молекулярной биологии способны сильно изменить практическую медицину. Они не только углубили наши знания об экспрессии генов и причинах многих болезней, но способствовали разработке новых подходов к их диагностике и лечению.

Было установлено, что полиморфизм генов широко распространён в популяции людей, показана взаимосвязь между изменениями в структуре ДНК и многими болезнями. Идентификация генов, нарушение работы которых приводит к развитию наследственных заболеваний, создала предпосылки для подробного анализа генетических и биохимических основ патогенеза этих заболеваний и разработки наиболее эффективных методов лечения.

Методами молекулярной медицины были созданы вакцины для предотвращения гепатитов, инсулин человека - для лечения сахарного диабета, фактор VIII - для восстановления нормального свёртывания крови и лечения гемофилии и многие другие препараты.

С помощью генной терапии оказалось возможным вводить в организм больного полноценно работающие гены и таким образом восстанавливать метаболические нарушения, вызванные мутантными генами. Таким путём осуществляется лечение детей с иммунодефицитом, вызванным дефектом аденозиндезаминазы, в стадии клинических испытаний находятся методы гено-коррекции таких наследственных болезней, как семейная гиперхолестеринемия, гемофилия В, му-ковисцидоз и некоторые другие.

Для выявления дефектов в структуре ДНК она должна быть выделена из соответствующего источника (биологической жидкости, биоптата, культуры клеток и т.д.) и "наработана" в количествах, достаточных для исследования. Для генно-терапевтических работ необходимы выделение нормальных генов и введение их в дефектные клетки таким образом, чтобы они экспрессировались, позволяя восстановить здоровье пациента.

В настоящем разделе будут даны основные представления о методах, используемых в решении проблем ДНК-диагностики наследственных болезней и генной терапии.

А. Методы выделений ДНК

ДНК может быть выделена из любого типа тканей и клеток, содержащих ядра. Этапы выделения ДНК включают быстрый лизис клеток, удаление фрагментов клеточных органелл и мембран с помощью центрифугирования, ферментативное разрушение белков протеиназами и экстрагирование ДНК из раствора с помощью фенола и хлороформа. Затем ДНК осаждают, как правило, этанолом и после удаления надосадочной жидкости растворяют в буферном растворе.

- Оценку качества экстрагированной ДНК проводят на основании измерения оптической плотности раствора ДНК в области белкового и нуклеинового спектров поглощения, т.е. при 280 и 260 нм, соответственно. Для чистых образцов ДНК соотношение оптических плотностей, полученных при 260/280 нм, должно быть больше 1,8.
- Молекула ДНК одной хромосомы среднего размера содержит 150х106 пар нуклеотидов и имеет длину около 4 см. Молекулы такого размера чувствительны к механическим воздействиям, возникающим в растворе в процессе выделения, и часто фрагментируются. В ходе выделения получают молекулы ДНК значительно меньше исходных, но всё равно очень большие - тысячи или десятки тысяч пар нуклеотидов. Такие молекулы неудобны для исследований, и их приходится дополнительно фрагментировать.

Расщепление ДНК с помощью рестриктаз

Для фрагментирования используют рестриктазы (ферменты, расщепляющие ДНК) или рестрикционные эндонуклеазы (от англ, *restriction endonucleases*), выделенные из бактериальных клеток. Эти ферменты *in vivo* участвуют в узнавании и разрушении чужеродных для бактерий ДНК, расщепляя внутренние участки молекулы на сравнительно небольшие фрагменты. Рестриктазы узнают специфические последовательности из 4-6, реже 8-12 нуклеотидов в двухцепочечной молекуле ДНК (сайты рестрикции) и "разрезают" её в местах локализации этих последовательностей. Количество образующихся рестрикционных фрагментов ДНК при использовании одной рестриктазы зависит от количества сайтов рестрикции, а размер фрагментов определяется положением этих сайтов по всей длине исходной молекулы ДНК.

Известно более 500 различных типов рестриктаз бактериального происхождения, причём каждый из этих ферментов узнаёт свою специфическую последовательность (рис. 4-.62). С помощью набора рестриктаз можно разрезать молекулу ДНК на фрагменты желаемой длины. Например, для изучения первичной структуры (метод секвенирования) удобны фрагменты размером около 300 пар нуклеотидов. Следовательно, ДНК одной хромосомы в 150×10^6 пар нуклеотидов нужно разрезать на 500 000 фрагментов и каждый из фрагментов изучать отдельно.

Образующиеся в результате рестрикции фрагменты ДНК могут быть исследованы методом электрофореза в агарозном или полиакриламидном геле. Выявление ДНК в геле возможно в присутствии бромида этидия, связывающегося с фрагментами молекулы и дающего специфическое розовое окрашивание в ультрафиолетовой области спектра.

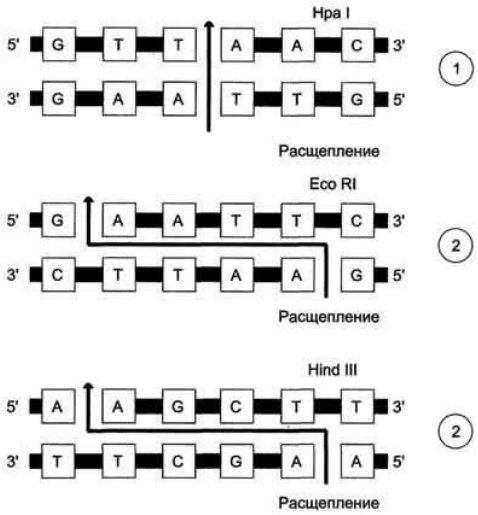


Рис. 4-62. Последовательность нуклеотидов в ДНК, узнаваемая тремя наиболее часто используемыми рестриктазами. Рестрикцирующие нуклеазы получают из различных бактерий: HPA I - *Haemophilus parainfluenzae*; Eco RI - из *Escherichia coir*, Hind III - из *Haemophilus influenzae*. Рестриктазы типа 1 расщепляют ДНК с образованием "слепых" концов, а другие (типа 2) с образованием по месту разрыва одноцепочечных "липких" концов.

Б. Идентификация специфических последовательностей

При обработке геномной эукариотической ДНК, в частности, ДНК человека, рестриктазами образуется так много фрагментов различной длины, что их не удаётся удовлетворительно разделить с помощью электрофореза в полиакриламидном или агарозном геле. После электрофореза рестрикцированной геномной ДНК и проявления с помощью бромида этидия получается равномерное окрашивание по всей длине геля. Идентификация нужных фрагментов ДНК в таком геле возможна только путём гибридизации с мечеными ДНК-зондами. Синтез ДНК-зондов осуществляется в автоматизированных машинах, позволяющих синтезировать фрагменты однонитевой ДНК длиной свыше 100 нуклеотидных звеньев со строго определённой первичной структурой. Такие молекулы можно использовать для специфического связывания с исследуемыми участками гена.

Блот-гибридизация по Саузерну

Классическим методом идентификации интересующих участков ДНК стал метод блот-гибридизации по Саузерну, предложенный в 1975 г. Суть метода заключается в том, что сплошная "лестница" фрагментов ДНК, получившаяся в результате их деления по молекулярной массе в гелях, подвергается денатурации и переносится с геля на плотный носитель (нитроцеллюлозный фильтр или нейлоновую мембрану). Перенос, или блоттинг, осуществляется за счёт капиллярных сил, электрического поля или вакуума (рис. 4-63). Фиксированную на фильтре ДНК гибридизуют с ДНК- или РНК-зондом, содержащим метку. Методом радиоавтографии определяют положение искомого фрагмента геномной ДНК на электрофореграмме. Блот-гибридизация- высокочувствительный метод идентификации специфических последовательностей.

К настоящему времени разработано много модификаций этого метода. Так, ДНК-зонд не всегда метят радиоактивными изотопами, нередко используют соединения, ковалентно связывающиеся с ДНК; их можно обнаружить по образованию окрашенного продукта или флюоресценции. Длина олигонуклеотидов в ДНК-зондах также может сильно варьировать, будучи иногда очень короткой - в 15-20 пар нуклеотидов. Описаны методы дот- (пятно) или слот- (полоска) гибридизации, когда на твёрдый носитель наносят препараты ДНК или РНК без предварительной рестрикции или электрофореза и гибридизуют их с мечеными ДНК-зондами.

В. Установление первичной структуры ДНК-фрагментов (секвенирование ДНК)

Наиболее часто для установления первичной структуры ДНК используют дидезоксисеквени-рование. В реакционных пробах, содержащих денатурированную однонитевую ДНК, ДНК-полимеразу, дезоксинуклеозидтрифосфаты (дНТФ) - дАТФ, дЦТФ, дГТФ и дТТФ, один из которых является радиоактивным, и праймер инициируют синтез ДНК в присутствии специфических дидезоксинуклеозидтрифосфатов (ддНТФ), или терминаторов, - ддАТФ, ддЦТФ, ддГТФ или ддТТФ. Синтез одновременно ведут в четырёх параллельных пробах, в каждую из которых наряду с компонентами реакционной смеси прибавляют один из 4 ддНТФ. ддНТФ будут конкурировать с нормальными дНТФ за включение в растущую полинуклеотидную цепь. При встраивании ддНТФ вместо соответствующего

нуклеотида синтез ДНК прекращается. В результате в каждой из пробирок получается набор различающихся по длине меченых фрагментов ДНК с одним из специфических дидезоксинуклеотидов на конце. После одновременного разделения этих фрагментов в электрическом поле на 4 соседних дорожках и радиоавтографии размер синтезированных молекул может быть установлен, а это значит, что может быть определена локализация терминирующих дидезоксинуклеотидов. На основании этих данных устанавливают последовательность нуклеотидов во вновь сингезированных фрагментах, комплементарных ДНК-матрице (рис. 4-64).

В настоящее время создают приборы для автоматического одновременного секвенирования большого числа проб с использованием меченных разными флюорохромами дидезоксинуклеотидов.

В то же время разрабатывают новые, более эффективные и экономичные методы секвенирования. Сущность одного из них заключается в следующем: из 4 нуклеозидтрифосфатов (дАТФ, дГТФ, дТТФ, дЦТФ) создаётся набор олигонуклеотидов (например, октануклеотидов), включающий все возможные варианты последовательностей. Эти октануклеотиды иммобилизуют (пришивают) в ячейках, в результате чего создаётся так называемая олигонуклеотидная

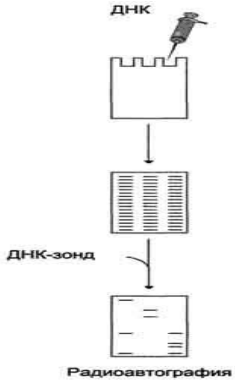


Рис. 4-63. Блот-гибридизация по Саузерну. Фрагменты ДНК разделяют с помощью электрофореза, денатурируют, переносят на нитроцеллюлозный фильтр и гибридизуют с ДНК-зондом.

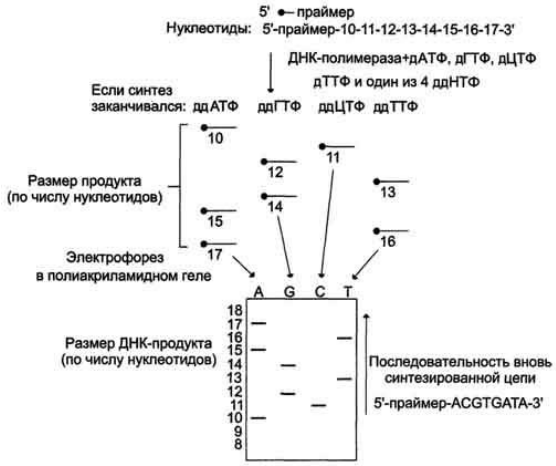


Рис. 4-64. Дидезоксисеквенирование последовательности ДНК. Используют 4 пробы, каждая из которых содержит ДНК-матрицу, праймер, ДНК-полимеразу, 4 дНТФ (дАТФ, дГТФ, дЦТФ, дТТФ). Праймер либо один из нуклеотидов содержит радиоактивную метку, благодаря чему полосы могут быть обнаружены в геле с помощью радиоавтографии. Один из 4 дидезоксирибонуклеотидов (ддНТФ) добавляют в каждую пробирку. Остановка синтеза происходит в том случае, когда ддНТФ включается в растущую олигонуклеотидную цепь.

матрица. Секвенируемый фрагмент ДНК метят по фосфатному остатку и добавляют в ячейки матрицы. Фрагмент ДНК гибридизуется только с теми октануклеотидами, последовательности которых комплементарны его участкам. Таким образом, определяется набор всех возможных октануклеотидов, присутствующих в исследуемом фрагменте ДНК. Далее при помощи специальной компьютерной обработки упорядочивается расположение октамеров в исследуемом фрагменте ДНК.

Г. Получение рекомбинантных ДНК и их амплификация

Для работы с нуклеотидными последовательностями в генах и других участках ДНК необходимо иметь достаточное количество материала для исследования. Это непростая задача, особенно если источником ДНК служат ткани человека. Поэтому исследуемые фрагменты ДНК обычно предварительно амплифицируют (увеличивают количественно в миллионы раз), для того чтобы получать их в любое время и в неограниченном количестве. Исключительно ценным инструментом в решении этой проблемы оказалось использование рекомбинантныгх ДНК (т.е. ДНК, построенных из участков разного происхождения).

1. Получение рекомбинантных ДНК

Для получения таких молекул первоначально выделяют ДНК из 2 разных источников (рис. 4-65).

Каждую из них в отдельности фрагментируют, используя одну и ту же рестриктазу, расщепляющую ДНК с образованием "липких" концов. После процедуры нагревания и медленного охлаждения (отжига) наряду с исходными

молекулами $ДНК_X$ и $ДНК_Y$ могут образовываться рекомбинантные молекулы, состоящие из фрагментов $ДНК_X$ и $ДНК_Y$ связанных между собой "липкими" концами. Ковалентное сшивание фрагментов осуществляют с помощью ДНК-лигазы в присутствии АТФ как источника энергии.

В технологии рекомбинантных ДНК, кроме фрагментов ДНК, выделенных из клеток, содержащих ядра, используют ДНК, полученную с помощью обратной транскриптазы. При добавлении в реакционную среду 4 разных дезоксирибонуклеозидтрифосфатов фермент на матрице мРНК по принципу комплементарности синтезирует ДНК-копию, или кДНК. Так как источником информации при образовании кДНК служит зрелая цитоплазматическая мРНК, то такая ДНК, в отличие от ДНК фрагментов, полученных при расщеплении геномной ДНК эукариотов, не содержит нитронов.

2. Клонирование ДНК

Для получения значительных количеств интересующего нас материала проводят клонирование ДНК, предполагающее встраивание нужного нам фрагмента ДНК в векторную молекулу ДНК (или вектор). Вектор обеспечивает проникновение этой рекомбинантной, или химерной, ДНК в бактериальные клетки. В качестве векторов используют плазмиды, фаги, ретро- и аденовирусы. Особенно часто в качестве вектора служит плазмидная ДНК.

Плазмиды - небольшие кольцевые двухце-почечные молекулы ДНК, присутствующие в бактериальных клетках в различном количестве копий. Они имеют автономную систему контроля репликации, которая поддерживает их количество в клетках на определённом уровне - от нескольких единиц до нескольких сотен копий геномов на клетку.

Используемую для клонирования плазмидную ДНК и интересующую нас ДНК расщепляют по определённому участку рестриктазой, получают рекомбинантную ДНК, возвращают гибридную плазмиду в кольцевую форму и вводят в бактериальные клетки, т.е. осуществляют трансформацию бактерий. При размножении трансформированных бактерий происходит увеличение числа копий введённого в плазмиду фрагмента ДНК, т.е. таким способом чужеродный

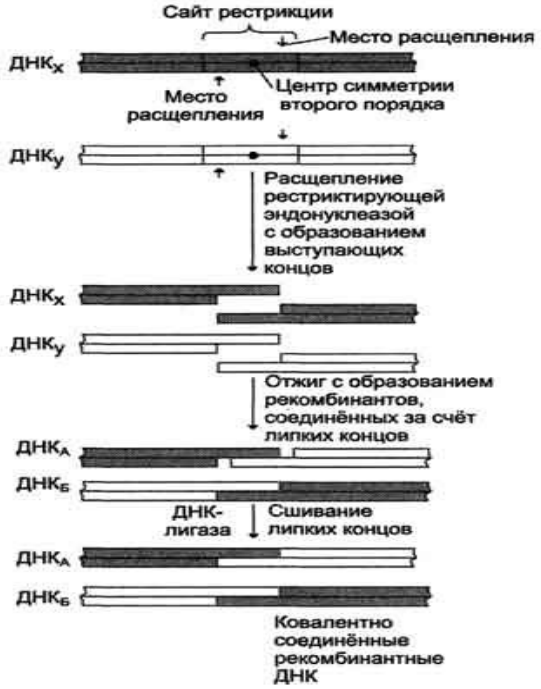


Рис. 4-65. Получение рекомбинантных ДНК. Два образца ДНК: $ДНК_X$ и $ДНК_Y$ расщепляют одной и той же рестриктазой и получают фрагменты с "липкими" концами. При денатурации и последующем "отжиге" образуются рекомбинантные молекулы $ДНК_А$ и $ДНК_Б$, первоначально соединённые друг с другом за счёт "липких" концов, затем сшиваемых ДНК-лигазой. В качестве клонирующих векторов часто используют фаги. Если экзогенную ДНК вводят в эукариотические клетки, то эту процедуру называют трансдукцией.

3. Полимеразная цепная реакция

Метод полимеразной цепной реакции (ПЦР), предложенный в 1983 г. Карри Муллисом (Нобелевская премия, 1993 г.), явился эпохальным

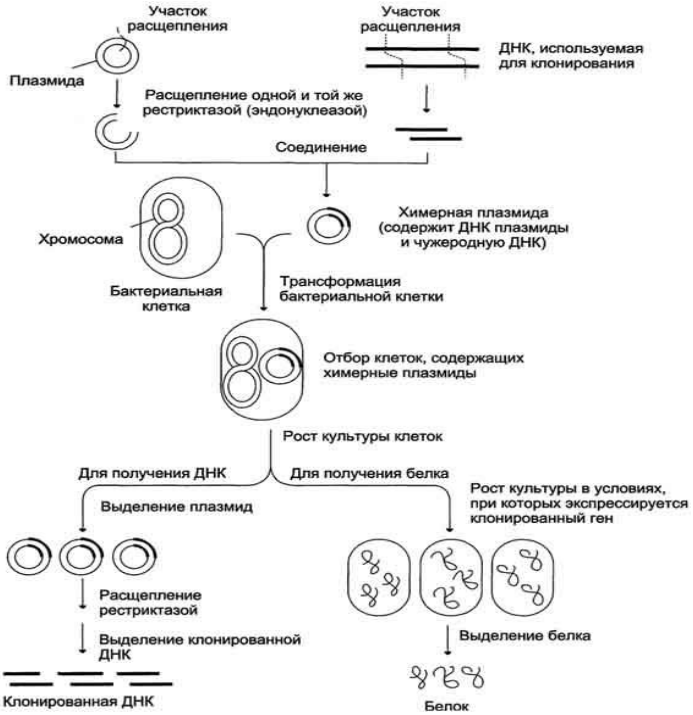


Рис. 4-66. Схема клонирования ДНК в бактериальных клетках.

открытием XX века в области молекулярной биологии. Он позволяет подвергать специфичной амплификации в условиях *in vitro* (в пробирке) участки ДНК длиной от нескольких десятков до нескольких сотен пар нуклеотидов, используя в качестве матрицы любые образцы ДНК. Необходимое условие для проведения ПЦР - знание нуклеотидной последовательности амплифицируемой области. Участок исследуемой ДНК гибридизуют с двумя искусственно синтезированными праймерами - олигодезоксирибонуклеотидными последовательностями длиной от 15 до 30 пар нуклеотидов, которые комплементарны 3'-концам амплифицируемого участка на кодирующей и некодирующей нитях ДНК. Расстояние между праймерами определяет длину синтезируемых молекул. В качестве матрицы для синтеза продуктов ПЦР используют любой тип ДНК: геномную ДНК человека, различных видов про- и эукариотов, ДНК, выделенную из культур клеток, "библиотек" генов и других источников. Метод не требует больших количеств исследуемой ДНК, в принципе, достаточно даже одной молекулы, содержащейся в одном волосе на голове, одной капле крови или спермы.

Успех в разработке метода в значительной степени обусловлен использованием в качестве фермента термофильной ДНК-полимеразы, выделенной из бактерий, живущих в горячих источниках, и потому устойчивой к действию высоких температур.

Реакционная смесь для получения интересующей нас ДНК содержит исследуемую ДНК, субстраты реакции - 4 дНТФ, 2 праймера, термостабильную, или Taq-полимеразу и буфер, содержащий ионы Mg^{2+}.

Один цикл полимеризации включает 3 этапа (рис. 4-67):

- **плавление:** на этой стадии реакционную смесь нагревают до температуры 90-97 °С. Исследуемая двуцепочечная ДНК денатурирует и переходит в однонитевую форму;
- **гибридизация или отжиг ДНК с праймерами.** В результате снижения температуры до 50-60 °*С* происходит комплементарное связывание праймеров с цепями матричной ДНК и образование двухцепочечного участка на каждой из нитей ДНК;
- **элонгация,** удлинение нитей ДНК, комплементарных матричной ДНК, катализирует Taq-полимераза в направлении от 5'- к 3'-концу.

Затем снова наступает этап плавления, когда за счёт повышения температуры синтез ДНК прекращается, и двунитевой участок между матричными и вновь синтезированными молекулами ДНК денатурирует. Во втором и последующих циклах праймеры гибридизируются с исходной матричной ДНК и с вновь синтезированными молекулами ДНК, количество которых нарастает в геометрической прогрессии. В последнем случае синтез ДНК заканчивается не из-за изменения температурного режима, а по достижении ДНК-полиМеразой границы амплифицированного участка, что определяет строго определённый размер продукта с точностью до одного нуклеотида.

Каждый из этапов цикла имеет продолжительность от десятков секунд до 1-3 мин, в результате полный цикл длится от одной до нескольких минут.

Описанную процедуру амплификации ДНК проводят в автоматическом режиме в приборе - циклизаторе, или термоциклере, амплификаторе ДНК. Такой прибор позволяет задавать нужное количество

циклов и выбирать оптимальные временные и температурные параметры. За 25-30 циклов число синтезированных копий ДНК достигает нескольких миллионов.

С помощью ПЦР можно получить достаточное количество копий участков ДНК, в которых предполагаются присутствие мутаций, полиморфизм сайтов, можно проводить ДНК-диагностику инфицированности пациентов вирусными, бактериальными и грибковыми возбудителями болезней.

Д. ДНК-диагностика заболеваний

Используя технику рекомбинантных ДНК, удаётся исследовать варианты генов, ответственных за развитие многих заболеваний. Этим способом идентифицированы точечные мутации, вызванные заменой одного азотистого основания, делениями или вставками, приводящими к появлению аллелей, кодирующих функционально неактивные белки. Дефектные "полиморфы" возникают как за счёт изменений в кодирующих участках гена, так и в результате мутаций в некодирующих; областях, тесно примыкающих к генам и вызьшающих нарушение их работы.

Разработанные технологии позволяют вести целенаправленное картирование генов человека в рамках международного проекта "Геном человека". Официально эта научная программа с участием ведущих молекулярно-генетических лабораторий США, стран Западной Европы, а также России и Японии оформилась в 1990 г. В ходе работы над проектом картированы 923 гена, вызывающих развитие моногенных заболеваний, более 100 из них полностью секве-нированы. К концу 2001 г. работами лабораторий США, Великобритании, Японии и ряда европейских стран с точностью до 90% завершена расшифровка генома. Ожидается, что в течение ближайших 2-3 лет будут изучены все гены, ответственные за развитие патологических процессов у человека. Это позволит вывести диагностику и лечение многих болезней на новый уровень.

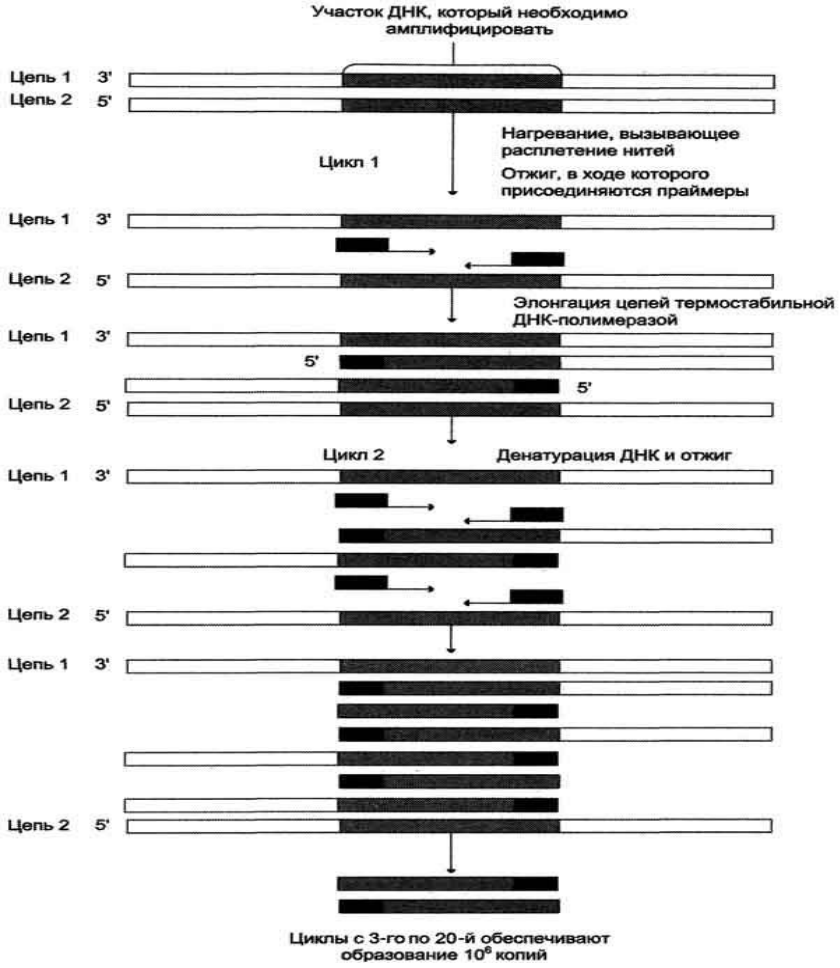


Рис. 4-67. Полимеразная цепная реакция.

Остановимся на некоторых методах, широко используемых для идентификации моногенных болезней.

1. Полиморфизм длины рестрикционных фрагментов (ПДРФ)

Мутации, возникающие в участках узнавания определённых рестриктаз, делают эти участки ДНК нечувствительными к действию ферментов. Это может быть легко обнаружено по изменению длины рестрикционных фрагментов ДНК. ПДРФ-анализ включает следующие этапы: выделение геномной ДНК, её рестрикцию специфической эндонуклеазой, электрофоретическое разделение образующихся фрагментов

ДНК и идентификацию этих фрагментов путём блот-гибридизации по Саузерну. На электрофореграммах при отсутствии рестрикции в исследуемой ДНК выявляют один крупный фрагмент, соответствующий по длине последовательности ДНК между двумя соседними участками рестрикции для той же эндонуклеазы. При наличии рестрикции в полиморфном участке на электрофореграмме будет присутствовать меньший по размерам фрагмент, равный расстоянию между полиморфным участком рестрикции и одним из ближайших постоянных участков рестрикции (рис. 4-68).

ПДРФ-анализ может быть значительно упрощён в том случае, если возможна специфическая амплификация участка ДНК, содержащего полиморфный сайт рестрикции. Тестирование состояния этого локуса возможно путём проведения ПЦР и рестрикции амгошфицированного фрагмента. При отсутствии сайта узнавания в исследуемой области ДНК размеры амплифицированного фрагмента не изменятся после его обработки рестриктазой. Если участок узнавания не изменён, обработка ферментом приведёт к образованию 2 маленьких фрагментов с той же суммарной длиной, что и исходный фрагмент.

При обследовании пациентов и членов их семей на носительство патологических генов широко используют этот метод, с помощью которого:

- идентифицируют делеции в гене дистрофина, на долю которых приходится около 60% всех мутаций, вызывающих миодистрофию Дюшенна;
- диагностируют гемофилию А, некоторые талассемии, ретинобластому и гранулематоз;
- контролируют здоровье детей в семьях, в которых родители являются гетерозиготами по гену серповидно-клеточной анемии и другим дефектным генам.

2. Определение мутаций с помощью аллельспецифических проб

Многие мутации, вызывающие возникновение генных болезней, не попадают в участки, ответственные за узнавание ферментов рестрикции. В этом случае, если последовательность оснований в области мутации известна, то её обнаруживают с помощью аллельспецифических олигонуклеотидов. Для этого синтезируют короткие олигонуклеотидные зонды, содержащие обычно около 19 нуклеотидов, комплементарные участку нормального и мутантного аллеля в ДНК. Область генома, содержащую исследуемый ген, амплифицируют с помощью ПЦР, и образцы полученной ДНК переносят на нитроцеллюлозные фильтры (дот- или слот-блоттинг). Пробы выдерживают с 32Р~зондами для выявления нормальной или мутантной последовательности. У гомозигот по исследуемой мутации ДНК будет гибридизоваться только с зондом, комплементарным мутантной последовательности. ДНК нормального гомозиготного индивидуума свяжется с зондом, соответствующим неизменённой нуклеотидной последовательности, тогда как с ДНК гетерозигот будут гибридизоваться оба зонда. На рисунке 4-69 представлены результаты генного зондирования 7 пациентов на носительство наиболее часто встречающейся делеции 3 нуклеотидов (ΔF508) в гене, ответственном за развитие муковисци-доза.

Олигонуклеотиды, аллельспецифичные по определённым мутациям, можно использовать в качестве праймеров в ПЦР при клиническом тестировании населения на наличие патологического гена. Если ДНК, полученная от пациента, амплифицирует с мутантным олигонулеотидом, то, следовательно, пациент является носителем мутации. Если нуклеотидная последовательность в исследуемом гене не изменена, то олигонуклеотид, содержащий мутацию, не свяжется с ДНК-матрицей, и ПЦР не пойдёт.

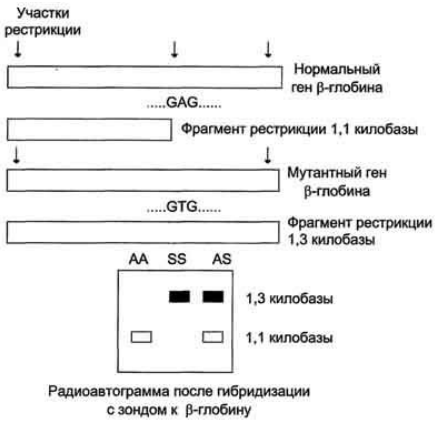


Рис. 4-68. Рестрикционный анализ ДНК гемоглобина человека, больного серповидно-клеточной анемией (HbS). Мис-сенс-мутация, ответственная за возникновение серповидно-клеточной анемии, связана с заменой в гене β-цепи глобина триплета GAG на GTG. При этом утрачивается участок рестрикции фермента Mstll, узнающего последовательность CCTNAGG, где N может быть любым основанием. При наличии мутации генный зонд гибридизуется с более крупным фрагментом ДНК размером 1,3 килобазы, имеющим при электрофорезе меньшую подвижность, чем продукт рестрикции нормального гена, длина которого равна 1,1 килобазы.

Рис. 4-69. Генное зондирование на носительство муко-висцидоза. С помощью ПЦР амплифицируют геномную ДНК, и продукт переносят на 2 нейлоновых фильтра, один из которых гибридизуют с Р32Р-зондом на нормальный аллель, а второй с 32Р-зондом на мутантный аллель ΔF508. Образование гибридов обнаруживают радиоавтографически. Пробы 1-3 служили контролями: первая содержала продукты ПЦР ДНК от гомозигот по нормальному гену; вторая - от гетерозиготного носителя мутации ΔF508; третья - от больного муковисцидозом, гомозиготного по мутации ΔF 508. Пробы 4-10 получены при обследовании 7 пациентов на носительство ΔF 508: 4, 5, 6 и 9 оказались гомозиготами по нормальному гену, а 7, 8 и 10 - гетерозиготными носителями мутантного гена.

Е. Использование ДНК-технологий для получения лекарственных препаратов и лечения различных болезней

Вакцины - очищенные белки, антигенные детерминанты ряда возбудителей вирусных и бактериальных инфекций. В последнее время их получают, пользуясь техникой рекомбинантных ДНК. Первой вакциной, синтезированной этим способом, была вакцина против вируса гепатита В.

Белки, имеющие терапевтическое значение, получают с использованием этой технологии во многих странах мира. Так, одним из первых синтезирован инсулин человека (рис. 4-70). В клетках *E. coli,* трансформированных гогазмидами, содержащими ДНК, которая кодировала А- и В-цепи инсулина, нарабатывают белковые продукты А- и В-цепей. После очистки их подвергают фолдингу и окислению, которое обеспечивает образование соответствующих дисульфидных мостиков.

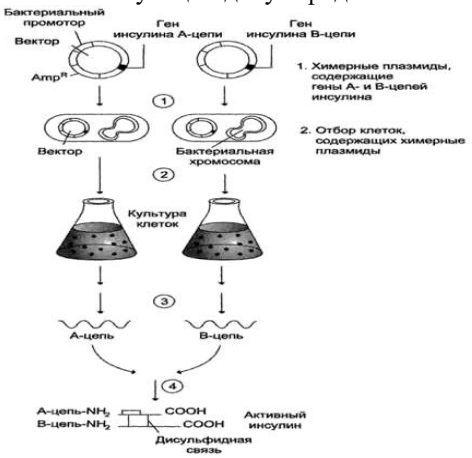


Рис. 4-70. Получение инсулина человека в клетках *E. coli.* 1 - трансформация клеток *E. coli* плазмидами, которые содержат гены, кодирующие структуру А- и В-цепей инсулина; 2 - синтез А- и В-цепей инсулина в процессе выращивания культуры трансформированных клеток *E. coli*; 3 - выделение и очистка А- и В-цепей инсулина; 4 - пространственная укладка А- и В-цепей (лнсулина и окисление остатков цистеина.

Аналогичным способом получен гормон роста, используемый для лечения детей с недостаточностью этого гормона. Более сложные белки получены в культуре клеток млекопитающих. Так, дефекты в гене фактора VIII, кодирующего один из белков - участников свёртывающей системы крови, ответственны за возникновение гемофилии. До того, как фактор VIII был получен методами генной инженерии, большое количество больных погибало от СПИДа или гепатита, которыми они заражались в результате введения выделенного из крови фактора VIII или переливания крови от доноров, являвшихся носителями этих болезней.

Тканевый активатор плазминогена (ТАЛ) - протеаза, участвующая в процессе фибриноли-за и предотвращающая образование тромбов в кровеносном русле; получена с помощью рекомбинантных ДНК. ТАП назначают больным с ишемической болезнью сердца для ускорения растворения тромбов, которые могут вызвать закупорку коронарных артерий и нарушить поступление кислорода в миокард.

Осуществлено получение рекомбинантных факторов роста, обеспечивающих восстановление гемостаза: эритропоэтина, интерлейкинов, колоний-стимулирующих факторов. Эти препараты используют в лечении больных анемией, после трансплантации костного мозга или химиотерапии, чтобы стимулировать образование клеток крови и снизить риск иммунодефицита. Разработаны методы получения белков человека

с использованием трансгенных животных; эти белки получают в результате искусственного введения чужеродного гена в оплодотворённую яйцеклетку или в ранние зародыши млекопитающих (рис. 4-71). Генноинженерные мероприятия можно провести таким образом, чтобы интересующий нас белок человека секретировался с белками молока.

Генная терапия - лечение наследственных, многофакторных и инфекционных заболеваний путём введения в соматические клетки пациентов генов, которые обеспечивают исправление генных дефектов или придают клеткам новые функции.

Первый клинический опыт применения генной терапии был осуществлён в 1990 г. в Бетесде (США) на четырёхлетней девочке, страдавшей наследственным иммунодефицитом, вызванным мутацией в гене аденозиндезаминазы (*ADA.*) Ребёнку были введены её собственные лимфоциты, предварительно трансформированные вне организма генной конструкцией, включающей ген *ADA* +ген *neo* + ретровирусный вектор. Лечебный эффект наблюдался в течение нескольких месяцев, после чего процедуру введения гена повторяли многократно без видимых неблагоприятных эффектов.

Для успешной генотерапии необходимо:

- обеспечить эффективную доставку чужеродного гена в клетки-мишени;
- создать условия для длительной экспрессии гена в этих клетках.

К настоящему времени разработаны химические, физические и биологические методы доставки чужеродного гена в клетки-мишени. Однако пока только вирусные векторы или генетические конструкции, включающие вирусные последовательности, способны к эффективной доставке необходимого гена и его последующей длительной экспрессии. В результате из более чем 175 уже одобренных протоколов клинических испытаний по генотерапии более 120 основаны на применении ретровирусных векторов.

В геном пациента чужеродная ДНК может вводиться либо в культуре клеток (*ex vivo*), либо непосредственно в организм больного (*in vivo*). При осуществлении первого способа выделяют и культивируют специфический тип клеток пациента, вводят в него чужеродный ген, отбирают трансформированные клетки и реинфузируют их тому же больному (рис. 4-72).

Генная терапия *in vivo* основана на прямом введении в специализированные ткани больного клонированных и определённым образом упакованных последовательностей ДНК, поступающих с помощью рецепторов в определённые типы клеток. В этом способе гены вводят, как правило, в виде аэрозольных и инъецируемых форм. Наиболее часто аэрозольную генотерапию используют при лечении болезней лёгких (например, раке лёгких) и муковисцидоза.

Наряду с развитием исследований, касающихся лечения наследственных дефектов, генотерапию всё чаще используют для лечения ненаследственных, главным образом, инфекционных и онкологических болезней (см. раздел 16).

Единственное и непременное ограничение таких работ состоит в том, чтобы все генотерапевтические мероприятия были направлены на конкретного больного и затрагивали только его соматические клетки.

Современный уровень знаний не позволяет проводить коррекцию генных дефектов на уровне половых клеток и клеток ранних доимплантационных зародышей человека в связи с реальной опасностью засорения генофонда нежелательными генными конструкциями и внесения мутаций с непредсказуемыми результатами.

Ген человека встраивают в вектор таким образом, чтобы он был под контролем β-лактоглобинового промотора, который активен только в клетках молочной железы. Присутствие у трансгенного потомства гена человека контролировали с помощью метода ПЦР, в которой использовали праймеры к гену человека. При фракционировании белков молока получают белковый продукт экспрессии гена человека.

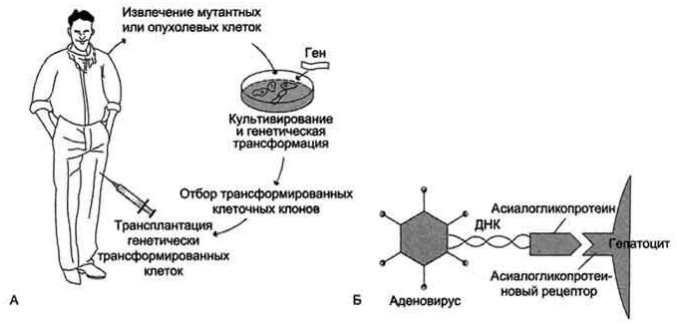


Рис. 4-72. Введение чужеродного гена *ex vivo* (А) и *in vivo* (Б). А. Введение чужеродного "лечебного" гена в организм больного в составе клеток, содержащих этот ген. Б. Введение "лечебного" гена в составе конструкции, содержащей: ДНК, включающую этот ген; белок (например, асиалогликопротеин), взаимодействующий с соответствующим рецептором на мембране клеток; вирусный вектор (аденовирус), обеспечивающий длительную экспрессию "лечебного" гена.

В целях предотвращения распространения дефектных генов в популяции людей и рождения детей с наследственными патологиями во многих странах мира работают генетические консультанты, а также

проводят пренатальную диагностику, позволяющую оценить здоровье плода с использованием анализа ДНК на самых ранних стадиях развития.

I Перечень вопросов для проверки конечного уровня знаний:

1. Методы выделений ДНК
2. Расщепление ДНК с помощью рестриктаз
3. Идентификация специфических последовательностей
4. Установление первичной структуры ДНК-фрагментов (секвенирование ДНК)
5. Получение рекомбинантных ДНК и их амплификация
6. Получение рекомбинантных ДНК и их амплификация
7. ДНК-диагностика заболеваний

II Самостоятельная работа обучающихся:

Составить ментальную карту по теме: «Использование ДНК-технологий для диагностики некоторых заболеваний и получения лекарственных препаратов».

III Список используемой литературы:

Обязательная:

1.Е.С. Северин «Биохимия», Москва 2004;
2.Е.С. Северин «Биохимия с упражнениями и задачами», Москва 2008;

Дополнительная:

1.Интернет ресурсы
2.Материал конспектов занятия

Тема: Роль печени в сохранении постоянной концентрации глюкозы в крови. Диагностические критерии сахарного диабета разных типов. Типы сахарного диабета.

Одним из интегральных показателей внутренней среды, отражающим обмен в организме углеводов, белков и жиров, является концентрация в крови глюкозы. Она является не только источником энергии для синтеза жиров и белков, но и субстратом для их синтеза. В печени происходит новообразование углеводов из жирных кислот и аминокислот. Нормальное функционирование клеток нервной системы, поперечнополосатых и гладких мышц, для которых глюкоза является важнейшим энергосубстратом, возможно при условии, что приток к ним глюкозы обеспечит их энергетические потребности. Это достигается при содержании в литре крови у человека в среднем 1 г (0,8—1,2 г) глюкозы (рис. 12.2). Из схемы на этом рисунке следует, что при нормальном уровне содержания глюкозы в крови происходит образование гликогена в печени и мышцах, синтез жиров, ее потребление клетками мозга, мышцами и другими тканями. В условиях гипергликемии избыточное количество глюкозы удаляется из крови через почки, увеличивается синтез гликогена. При гипогликемии усиливается гликогенолиз под влиянием адреналина и глюкагона. Сдвиги в концентрации глюкозы в крови от «заданного» (константного) значения воспринимаются глюкорецепторами гипоталамуса, который реализует свои регулирующие влияния на клетки через симпатический и парасимпатические отделы вегетативной нервной системы. Эти влияния обусловливают срочное повышение или снижение выработки инсулина, глюкагона и адреналина эндокринным аппаратом поджелудочной железы и надпочечников. Более медленный эффект гипоталамических влияний осуществляется через гормоны гипофиза. Для поддержания константного уровня концентрации глюкозы существует и более короткая петля обратной связи — влияние глюкозы, циркулирующей в крови, непосредственно на бета-клетки островков Лангерганса поджелудочной железы, вырабатывающих гормон инсулин. При снижении содержания глюкозы в литре крови до уровня менее 0,5 г, вызванном голоданием, передозировкой инсулина, имеет место недостаточность снабжения энергией клеток мозга. Нарушение их функций проявляется учащением сердцебиения, слабостью и тремором мышц, головокружением, усилением потоотделения, ощущением голода. При дальнейшем снижении концентрации глюкозы в крови указанное состояние, именуемое гипогликемией, может перейти в гипогликемическую кому, характеризующуюся угнетением функций мозга вплоть до потери сознания. Введение в кровь глюкозы, прием сахарозы, инъекция глюкагона предупреждают или ослабляют эти проявления гипогликемии. Кратковременное повышение уровня глюкозы в крови (гипергликемия) не представляет угрозы для здоровья человека. В крови организма человека обычно содержится около 5 г глюкозы. При среднесуточном потреблении с пищей взрослым человеком, занимающимся физическим трудом, 430 г углеводов в условиях относительного покоя, тканями ежеминутно потребляется около 0,3 г глюкозы. При этом запасов глюкозы в циркулирующей крови достаточно для питания тканей на 3—5 мин и без ее восполнения неминуема гипогликемия. Потребление глюкозы возрастает при физической и психоэмоциональной нагрузках. Так как периодический (несколько раз в день) прием углеводов с пищей не обеспечивает постоянного и равномерного притока глюкозы из кишечника в кровь, в организме существуют механизмы, восполняющие убыль глюкозы из крови в количествах, эквивалентных ее потреблению тканями. При достаточном уровне концентрации глюкозы в крови она частично превращается в запасаемую форму — гликоген. При уровне более 1,8 г в литре крови происходит выведение ее из организма с мочой. Избыток глюкозы, поступившей из кишечника в кровь воротной вены, поглощается гепатоцитами. При повышении в них концентрации глюкозы активируются ферменты углеводного обмена печени, превращающие глюкозу в гликоген. В ответ на повышение уровня сахара в крови, протекающей через поджелудочную железу, возрастает секреторная активность бета-клеток островков Лангерганса. В кровь выделяется большее количество инсулина — единственного гормона, обладающего резким понижающим концентрацию сахара в крови действием. Под влиянием инсулина повышается проницаемость для глюкозы плазматических мембран клеток мышечной и жировой тканей. Инсулин активирует в печени и мышцах процессы превращения глюкозы в гликоген, улучшает ее поглощение и усвоение скелетными, гладкими и сердечной мышцами. Под влиянием инсулина в клетках жировой ткани из глюкозы синтезируются жиры. Одновременно выделяющийся в больших количествах инсулин тормозит распад гликогена печени и глюконеогенез. Содержание глюкозы в крови оценивается глюкорецепторами переднего гипоталамуса, а также его полисенсорными нейронами. В ответ на повышение уровня глюкозы в крови выше «заданного значения» (>1,2 г/л) возрастает активность нейронов гипоталамуса, которые посредством влияния парасимпатической нервной системы на поджелудочную железу усиливают секрецию инсулина. При понижении уровня глюкозы в крови уменьшается ее поглощение гепатоцитами. В поджелудочной железе снижается секреторная активность бета-клеток, уменьшается секреция инсулина. Тормозятся процессы

превращения глюкозы в гликоген в печени и мышцах, уменьшается поглощение и усвоение глюкозы скелетными и гладкими мышцами, жировыми клетками. При участии этих механизмов замедляется или предотвращается дальнейшее понижение уровня глюкозы в крови, которое могло бы привести к развитию гипогликемии. При уменьшении концентрации глюкозы в крови имеет место повышение тонуса симпатической нервной системы. Под ее влиянием усиливается секреция в мозговом веществе надпочечников адреналина и норадреналина. Адреналин, стимулируя распад гликогена в печени и мышцах, вызывает повышение концентрации сахара в крови. Норадреналин обладает слабовыраженной способностью повышать уровень глюкозы в крови. Под влиянием симпатической нервной системы стимулируется выработка альфа-клетками поджелудочной железы глюкагона, который активирует распад гликогена печени, стимулирует глюконеогенез и приводит к повышению уровня глюкозы в крови. Понижение в крови концентрации глюкозы, являющейся для организма одним из наиболее важных энергетических субстратов, вызывает развитие стресса. В ответ на снижение уровня сахара крови глюкорецепторные нейроны гипоталамуса через рилизинг-гормоны стимулируют секрецию гипофизом в кровь гормона роста и адренокортикотропного гормона. Под влиянием гормона роста уменьшается проницаемость клеточных мембран для глюкозы, усиливается глюконеогенез, активируется секреция глюкагона, в результате чего уровень сахара в крови увеличивается. Секретируемые под действием адренокортикотропного гормона в коре надпочечников глюкокортикоиды активируют ферменты глюконеогенеза и этим способствуют увеличению содержания сахара в крови. Регуляция обмена веществ и энергии в организме находится под контролем нервной системы и ее высших отделов. Об этом свидетельствуют факты условно-рефлекторного изменения интенсивности метаболизма у спортсменов в предстартовом состоянии, у рабочих перед началом выполнения тяжелой физической работы, у водолазов перед их погружением в воду. В этих случаях увеличивается скорость потребления организмом кислорода, возрастает минутный объем дыхания, минутный объем кровотока, усиливается энергообмен. Развивающееся при снижении в крови содержания глюкозы, свободных жирных кислот, аминокислот чувство голода обусловливает поведенческую реакцию, направленную на поиск и прием пищи и восполнение в организме питательных веществ.

Сахарный диабет (СД) – полиэтиологическое заболевание, связанное:

- со снижением количества β клеток островков Лангерганса,
- с нарушениями на уровне синтеза инсулина,
- с мутациями, приводящими к молекулярному дефекту гормона,
- со снижением числа рецепторов к инсулину и их аффинности в клетках-мишенях,
- с нарушениями внутриклеточной передачи гормонального сигнала.

Выделяют **два основных типа** сахарного диабета:

1. Инсулинзависимый сахарный диабет (ИЗСД, диабет I типа) – диабет детей и подростков (ювенильный), его доля составляет около 20% от всех случаев СД.

2. Инсулиннезависимый сахарный диабет (ИНЗСД, диабет II типа) – диабет взрослых, его доля – около 80%.

Подразделение типов СД на взрослый и ювенильный не всегда корректно, так как встречаются случаи развития ИНЗСД в раннем возрасте, также ИНЗСД может переходить в инсулинзависимую форму.

Причины сахарного диабета

Развитие **ИЗСД** обусловлено **недостаточным синтезом инсулина** в β-клетках островков Лангерганса поджелудочной железы. Среди причин этого в настоящее время на первый план выдвигаются аутоиммунные поражения и инфицирование β-тропными вирусами (вирусы Коксаки, Эпштейна-Бар, эпидемического паротита).

Причины инсулинзависимого сахарного диабета

Для **ИНЗСД** ведущей причиной является **инсулинорезистентность** из-за снижения чувствительности клеток-мишеней к гормону

Причины инсулинорезистентности

Рецепторные механизмы

Функциональные нарушения рецепторов - замедляют связывание инсулина и ответ на него:

- увеличение **диаметра** и **площади поверхности** жировых клеток (ожирение) - снижение скорости образования рецепторных микроагрегатов,
- повышенная **вязкость** мембран (снижение доли ненасыщенных жирных кислот в фосфолипидах, увеличение содержания холестерина),
- блокирование инсулиновых рецепторов **антителами**,
- нарушение мембран в результате активации **процесов ПОЛ**.

Структурные нарушения рецепторов - не позволяют связываться с гормоном или отвечать на его сигнал.

- изменение конформации рецепторов инсулина под влиянием продуктов **окислительного стресса**,

Пострецепторные механизмы

Пострецепторные механизмы сопровождаются ослаблением проведения сигнала через ФИ-3-киназный путь:

1. Дефекты трансмембранных переносчиков глюкозы (ГлюТ4),

2. Нарушение активации белков сигнального пути.

В настоящее время **главной** причиной инсулинорезистентности считают ослабление проведения сигнала через IRS-ФИ-3-киназный путь.

Предложено два механизма возникновения резистентности к инсулину:

- фосфорилирование серина (но не тирозина) в составе IRS уменьшает его способность связываться с ФИ-3-киназой и ослабляет ее активирование. Данный процесс катализируется множеством серин-треониновых киназ, активность которых повышается при воспалении, стрессе, гиперлипидемиях, ожирении, переедании, дисфункции митохондрий.
- нарушение баланса между количеством субъединиц ФИ-3-киназы (p85 и p110), т.к. эти субъединицы могут конкурировать за одни и те же участки связывания с белком IRS. Этот дисбаланс меняет активность фермента и снижает передачу сигнала. Причиной патологического повышения отношения p85/p110 предполагают высококалорийное питание.

Причины развития инсулиннезависимого сахарного диабета

Сравнительная характеристика типов сахарного диабета

	Инсулинзависимый СД	**Инсулиннезависимый СД**
Возраст (чаще всего)	Дети, подростки	Средний, пожилой
Проявление симптомокомплекса	Острое (несколько дней)	Постепенное (годы)
Внешний вид (до лечения)	Худощавое	У 80% ожирение
Снижение массы тела (до лечения)	Обычно есть	Не характерно

Концентрация инсулина в крови	Снижена в 2-10 раз	В норме или повышена
Концентрация С-пептида	Резко снижена или отсутствует	В норме или повышена
Семейный анамнез	Отягощен редко	Часто отягощен
Зависимость от инсулина	Полная	Только у 20%
Склонность к кетоацидозу	Есть	Нет

Диагностика

Диагноз инсулинзависимого сахарного диабета ставится если:

1. Имеются классические симптомы (полиурия, полидипсия, снижение массы тела) и концентрация глюкозы натощак в нескольких повторных анализах капиллярной крови более 6,1 ммоль/л.

2. В сомнительных (и только!) случаях – отсутствие симптомов в сочетании неоднозначностью результатов анализов – рекомендуется нагрузочная проба с глюкозой. Она заключается в приеме испытуемым глюкозы из расчета 1,5-2,0 г на кг массы тела. Пробы крови отбирают непосредственно перед приемом глюкозы (нулевая минута, "тощаковый" уровень) и далее через 30, 60, 90 и 120 минут, при необходимости на 180 минуте.

В норме в относительных единицах повышение концентрации глюкозы составляет 50-75% к 60 минуте исследования и снижается до исходных величин к 90-120 минутам. В **абсолютных единицах** по рекомендации ВОЗ подъем уровня глюкозы должен быть не более 7,5 ммоль/л при исходном 4,0-5,5 ммоль/л.

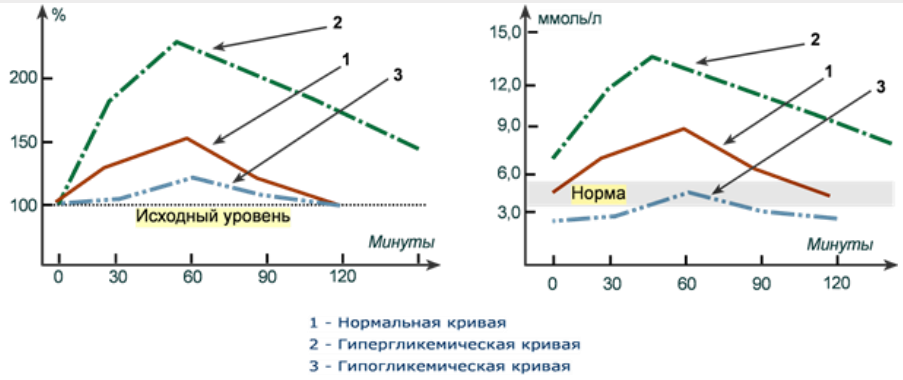
Иногда пробы берут только на 0 и 120 минутах, однако это нежелательно, так как упускается дополнительная информация о состоянии организма. Например, по крутизне восходящей части кривой можно судить **об активности n.vagus**, отвечающего за секрецию инсулина, о всасывающей функции **кишечника**, о способности **печени** усваивать глюкозу. К примеру, "голодная" печень с истощенными запасами гликогена более активно потребляет глюкозу из крови воротной вены по сравнению с "сытой", и подъем кривой более плавный. Аналогичная кривая наблюдается при ухудшении всасывания глюкозы вследствие заболевания слизистой кишечника. При циррозе печени отмечается обратная картина.

Довольно часто у взрослых вместо глюкозной нагрузки используется обычный завтрак, и кровь отбирают через 1, 2 или 2,5 часа после него. Если уровень глюкозы в указанное время не возвращается к норме, то подтверждается диагноз сахарного диабета.

Гипергликемические кривые проявляются повышенным в 2-3 раза уровнем глюкозы крови после нагрузки, что свидетельствует о нарушении гормональных взаимодействий.

Нормализация показателей происходит крайне медленно и завершается не ранее 150-180 минут. Наиболее частой причиной таких кривых является скрытый сахарный диабет 1 и 2 типа или повреждение паренхимы печени. Избыток катехоламинов при феохромоцитоме и трийодтиронина при гиперфункции щитовидной железы, гиперкортицизм, заболевания ги-поталамуса и гипофиза также проявляются в виде гипергликемической кривой.

При измерении уровня глюкозы после еды у больных с хорошо контролируемым сахарным диабетом результаты должны укладываться в диапазон 7,6-9,0 ммоль/л. Величины большие 9,0 ммоль/л означают, что дозировка инсулина неправильна и диабет не компенсирован.



Типы гликемических кривых после нагрузки глюкозой

Гипогликемические кривые – повышение концентрации глюкозы не более, чем на 25% с быстрым возвращением к исходным значениям. Наблюдаются при аденоме островков Лангерганса, гипотиреозе, гипофункции коры надпочечников, заболеваниях кишечника и дисбактериозе, гельминтозе.

Осложнения сахарного диабета

Быстрые последствия

Быстрые последствия, как правило, характерны для ИЗСД.

1. **Высокая гипергликемия** – так как практически отсутствует влияние эндогенного инсулина и превалирует влияние глюкагона, адреналина, кортизола, гормона роста.

2. **Глюкозурия** – в результате превышения почечного порога для глюкозы, т.е. концентрации глюкозы в крови, при которой она появляется в моче (около 10,0 ммоль/л). В норме в моче уровень глюкозы 0,8 ммоль/л и до 2,78 ммоль/сут, в других единицах около 0,5 г/сут, при СД количество теряемой глюкозы составляет до 100 г/сут и более.

3. **Преобладание катаболизма** белков над анаболизмом ведет к накоплению продуктов азотистого обмена, в первую очередь, мочевины и ее повышенному выведению. Углеродный скелет аминокислот уходит в глюконеогенез.

4. Глюкоза и мочевина осмотически удерживают воду в просвете почечного канальца и возникает **полиурия**, объем мочи возрастает в 2-3 раза. Активируется центр жажды и начинается полидипсия.

5. Повышенный распад ТАГ в жировой ткани и печени обусловливает аномально высокое окисление жирных кислот и накопление их недоокисленных продуктов – **кетоновых тел**. Это приводит к кетонемии, кетонурии и кетоацидозу. При сахарном диабете концентрация кетоновых тел возрастает в 100-200 раз и достигает 350 мг% (норма 2 мг% или 0,1-0,6 ммоль/л).

6. При полиурии с мочой теряются ионы **натрия** и **калия**, и ионы **бикарбоната**, что усугубляет ацидоз.

7. В результате п.п.4,5,6 возникает **дегидратация** (в тяжелых случаях до 5 л) организма, которая заключается в падении объема крови, приводит к обезвоживанию клеток и их сморщиванию (дряблая кожа, запавшие глаза, мягкие глазные яблоки, сухость слизистых), уменьшению артериального давления. Ацидоз вызывает одышку (дыхание Куссмауля, *Kussmaul*) и дополнительную дегидратацию.

8. Дегидратация неминуемо приводит к **недостаточности кровообращения** в тканях – активируется анаэробный гликолиз, накапливается лактат и в дополнение к кетоацидозу возникает лактоацидоз.

10. Закисление среды ухудшает взаимодействие инсулина с рецепторами, клетки становятся нечувствительными к инсулину – развивается **инсулинорезистентность**.

11. Ацидоз крови уменьшает концентрацию 2,3-дифосфоглицерата в эритроцитах. Это, повышая сродство гемоглобина к кислороду, создает **тканевую гипоксию** и усугубляет лактоацидоз.

Быстрые осложнения инсулинзависимого сахарного диабета

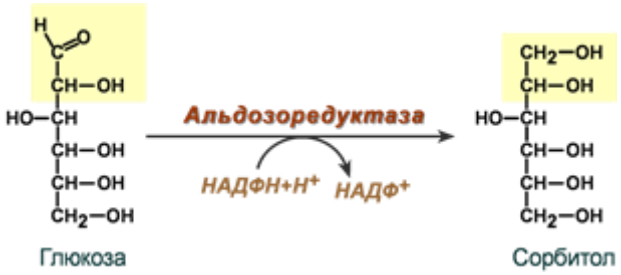
Отдаленные последствия

Характерны для обоих типов СД.

Гипергликемия резко повышает потребление глюкозы инсулиннезависимыми тканями (в частности, клетки артериальных стенок, эндотелий, клетки Шванна, эритроциты, хрусталик и сетчатка глаза, семенники и гломерулярные клетки почек), в них вынужденно активируются особые пути метаболизма глюкозы. Интенсивность последних определяется только доступностью глюкозы:

1. Превращение глюкозы в **сорбитол**.

Сорбитол плохо проникает через клеточные мембраны, его накопление в цитозоле приводит к осмотическому набуханию клеток и нарушению их функций. Например, возникновение катаракты хрусталика, развитие нейропатий (нарушение осязания) из-за нарушений в клетках Шванна.



Реакция превращения глюкозы в сорбитол

2. Неферментативное **гликозилирование** различных белков, изменение их свойств и активация их синтеза за счет избытка энергии:

- увеличивается синтез гликопротеинов базальной мембраны почечных клубочков, что приводит к окклюзии капилляров и нарушению фильтрации,
- увеличивается синтез гликопротеинов в стекловидном теле и сетчатке глаза, что вызывает отек сетчатки и кровоизлияния,
- гликозилированные белки хрусталика объединяются в крупные агрегаты, рассеивающие свет, что вызывает помутнение хрусталика и **катаракту**,
- гликозилирование гемоглобина в эритроцитах, образование гликозилированного гемоглобина **HbA1C**,
- гликозилирование белков свертывающей системы, что увеличивает **вязкость крови**,
- гликозилирование белков ЛПНП уменьшает их связывание с рецепторами и повышает концентрацию ХС в крови, что вызывает **макроангиопатии** и развитие **атеросклероза**сосудов мозга, сердца, почек, конечностей.
- гликозилирование белков ЛПВП, что усиливает их сродство к рецепторам и быструю элиминацию из кровотока,
- в конечном итоге возникают макроангиопатии, развивается **атеросклероз** сосудов мозга, сердца, почек, конечностей. Характерно в основном для ИНЗСД.

Диагностические критерии сахарного диабета

Выявление сахарного диабета базируется на показателях содержания глюкозы в крови натощак и после нагрузки глюкозой. Нормальное содержание глюкозы в крови натощак составляет 3,3 - 5,5 ммоль/л. **Содержание глюкозы в крови** натощак более 7,8 ммоль/л при повторном определении может служить основанием для установления диагноза сахарного диабета. Согласно исследованиям последних лет, с возрастом содержание глюкозы в крови увеличивается, поэтому пациентам после 60 лет необходимо проводить коррекцию показателей нормы, прибавляя 0,056 ммоль/л за каждый последующий год. У практически здоровых людей престарелого возраста гликемия натощак может варьировать от 4,4 до 8,0 ммоль/л. [2), стр.9]

При повышении уровня глюкозы в крови выше 8,8 ммоль/л появляется **глюкозурия**, которая редко возникает при нормогликемии как следствие снижения порога проходимости почечных канальцев для глюкозы (почечный диабет). Такая глюкозурия может быть первичной (идеопатическая) или вторичной (при заболевании почек). Она отмечается так же у беременных и при синдроме Де Тони - Фанкони - Дебре (ферментная тубулопатия, при которой нарушается реабсорбция глюкозы, аминокислот, фосфатов и бикарбонатов в почечных канальцах).

Когда сахарный диабет сочетается с нефросклерозом, при высокой гликемии, наоборот, выявляется минимальная глюкозурия или её нет вовсе. С возрастом повышается почечный порог для глюкозы, поэтому у больных сахарным диабетом 2 типа компенсацию углеводного обмена лучше контролировать по содержанию глюкозы в крови (гликемия), а не по её экскреции с мочой.

В том случае, если уровень глюкозы в крови натощак ниже 6,7 ммоль/л и клинические проявления отсутствуют, необходимо провести глюкозотолерантный тест (ГТТ).

Условия проведения нагрузки:

Последние 3 дня перед исследованием можно придерживаться свободной диеты с содержанием углеводов более чем 150 г в день и обычной физической активности. Пробу проводят натощак, и перед ней пациент не принимает пищу в течение 8 - 14 часов, пьёт умеренное количество жидкости.

После взятия образцов крови он в течение 5 минут принимает 75 г глюкозы, растворённой в 250 - 300 мл воды. Для детей доза глюкозы - 1,75 г на 1 кг массы тела. Через 2 часа кровь берут повторно.

О нарушенной толерантности к глюкозе по новым рекомендациям свидетельствует повышение содержания глюкозы *натощак* - в плазме венозной или капиллярной крови - не менее 7,8 ммоль/л; в цельной венозной или капиллярной крови - не менее 6,7 ммоль/л.

Через 2 часа после приёма 75 г глюкозы содержание глюкозы - в плазме венозной крови составляет - 8,9 - 12,2 ммоль/л; - в цельной капиллярной крови - 7,8 - 11,1 ммоль/л [4), стр.128]

Кроме того, как считают эксперты ВОЗ, «нарушенную толерантность к глюкозе» следует считать стадией «нарушенной регуляции глюкозы». Поэтому введено новое понятие «нарушенная гликемия натощак», которая характеризуется уровнем глюкозы в плазменной крови - равен или более 7,8 ммоль/л и через 2 часа не менее 8,9 ммоль/л.

Диагноз сахарного диабета может выть подтверждён определением содержания **гликозилированного (НвА1с) гемоглобина** в крови. В эритроцитах больных диабетом содержится большой процент минорного компонента гемоглобина, в котором содержится глюкоза. Этот неферментативный процесс происходит в течение всей жизни эритроцита (120 дней). НвА1с прямо коррелирует с уровнем глюкозы в крови, составляя 4 - 6 % от общего гемоглобина в крови у практически здоровых лиц, тогда как у страдающих сахарным диабетом уровень этого белка повышен 2 - 3 раза. У больных с первично диагностированным заболеванием содержание НвА1с достигает порой 11,4_ 2,5 %, а после назначения соответствующей диеты и инсулинотерапии снижается до 5,8_1,2 %. Этот критерий служит для скрининга населения при выявлении нарушений углеводного обмена и для контроля лечения больных диабетом.

Критерии сахарного диабета:

- гликемия выше 11, 1 ммоль/л приналичии клинических симптомов диабета;

- гликемия натощак выше 7,8 ммоль/л, выявляемая не менее 2 раз, или повышенный уровень гликозилированного гемоглобина в крови;

- гликемия натощак 7,8 ммоль/л или ниже, а через 2 часа после нагрузки глюкозой выше 11,1 ммоль/л. Глюкозотолерантный тест не требуется проводить если уровень глюкозы натощак превышает 7,8 ммоль/л.

Для диагностики **кетоацидоза** необходимо определение кетоновых тел в крови и моче. При наличии у больного кетоацидоза (при отсутствии указаний в анамнезе на сахарный диабет) проводится дифференциальный диагноз с лактоацидозом, уремией, алкогольным кетоацидозом и некоторыми отравлениями. Если кетоновые тела в моче отсутствуют, уровень глюкозы в крови ниже 8 ммоль/л, то причина ацидоза не связана с диабетом. Для диагностики поздних осложнений сахарного диабета используют различные методы инструментальной диагностики.

Для выявления **диабетической микроангиопатии** используют методы прижизненной биопсии кожи, мышц, желудка, кишечника, почек. Световая микроскопия позволяет обнаружить пролиферацию эндотелия, дистрофические изменения стенок артериол, венул и капилляров. **Диабетическая нейропатия** основывается на данных обследования больного невропатологом с привлечением при

необходимости инструментальных методов, включая электромиографию. Для **диагностики патологии органа зрения** используют определение остроты и поля зрения, исследование глазного дна с определением степени выраженности диабетической ретинопатии. Ранняя диагностика **диабетической нефропатии** достигается путём выявления микроальбуминурии и пункционной биопсии почек.

I Перечень вопросов для проверки конечного уровня знаний:

1. Роль печени в сохранении постоянной концентрации глюкозы в крови.

2. . Диагностические критерии сахарного диабета разных типов.

3. Типы сахарного диабета.

4. Причины сахарного диабета

5. Критерии сахарного диабета.

6.Глюкозотолерантный тест.

II Самостоятельная работа обучающихся:

Составить ментальную карту по теме: «Роль печени в сохранении постоянной концентрации глюкозы в крови. Диагностические критерии сахарного диабета разных типов. Типы сахарного диабета».

III Список используемой литературы:

Обязательная:

1.Е.С. Северин «Биохимия», Москва 2004;
2.Е.С. Северин «Биохимия с упражнениями и задачами», Москва 2008;

Дополнительная:

1.Интернет ресурсы
2.Материал конспектов занятия

Тема: Наследственные нарушения обмена углеводов (обмен гликогена, фруктозы, галактозы). Гликогенозы: виды, симптомы, лечение

Гликогенозы – это группа достаточно редких наследственных заболеваний, связанных с дефектами различных ферментов, необходимых для синтеза и распада гликогена. При этом происходит накопление нормального или «неправильного» гликогена в органах и тканях человека, что и вызывает клинические проявления заболевания. Преимущественное накопление гликогена может происходить в печени, мышцах, почках. Всего описано 12 форм гликогенозов, отличие которых состоит в характере ферментной недостаточности. Прогноз у каждого вида гликогеноза свой: некоторые имеют благоприятное течение, и больные доживают до старости, другие – заканчиваются летально еще в детском возрасте. Заболевания относят к категории неизлечимых, специфическая терапия на данный момент отсутствует. Основная роль в лечении отводится диетотерапии с высоким содержанием углеводов. В этой статье мы поговорим обо всех известных медицине разновидностях гликогенозов, их симптомах и возможностях лечения.

Что такое гликоген и для чего он нужен?

Гликоген является сложным углеводом, который синтезируется путем соединения между собой молекул глюкозы, которая поступает с пищей. Он представляет собой стратегический запас глюкозы в клетках. Хранится преимущественно в печени и мышцах с той особенностью, что гликоген из печени при своем расщеплении обеспечивает глюкозой весь организм человека, а гликоген из мышц – только лишь сами мышцы. Гликоген в печени может составлять 8% от ее веса, а в мышцах – всего 1%. Но при этом за счет того, что общая мышечная масса в организме значительно больше, чем масса печени, мышечный запас превышает печеночный. Небольшое количество гликогена содержится в почках.

Как только человек приступает к какому-то роду деятельности (физическому или умственному), ему требуется энергия, которую он черпает при расщеплении гликогена и глюкозы. Поначалу расщепляется глюкоза, содержащаяся в крови, однако когда ее запасы исчерпываются (а поступления извне нет), в расход идет гликоген. Израсходованный запас гликогена затем вновь пополняется (при поступлении пищи).

Таким образом, гликоген позволяет человеку вести активную деятельность при относительно больших перерывах в еде, а не быть «привязанным к тарелке».

Этапы превращения глюкозы в гликоген и его расщепление в обратном направлении осуществляются с помощью различных ферментов, причем в печени и мышцах они различные. Нарушения деятельности таких ферментов и приводят к развитию гликогенозов.

Гликогенозы встречаются, в среднем, с частотой 1 случай на 40-68 000 населения. Они всегда носят наследственный характер, то есть возникают тогда, когда в результате генных нарушений изменяется количество или активность одного из ферментов, необходимых для биохимических процессов создания и расщепления гликогена. Тип наследования, в основном, аутосомно-рецессивный (не связан с полом, и для его появления необходимо совпадение патологических генов, полученных от отца и от матери). Из всех 12 разновидностей гликогенозов, известных на сегодняшний день, 9 являются печеночными формами, 2 – мышечными, 1 – либо мышечной, либо генерализованной (с поражением практически всего организма). У каждой из разновидностей гликогенозов имеются свои отличительные особенности.

Виды гликогенозов

Гликогеноз 0 типа (агликогеноз)

При гликогенозе часто развиваются гипогликемические состояния, требующие введения глюкозы.

Этот вид гликогеноза возникает при дефекте фермента, задействованного в создании гликогена из глюкозы, в результате чего гликоген просто не образуется в достаточном количестве. То есть возникает дефицит гликогена, поэтому этот гликогеноз стоит под нулевым номером, как бы обособленно от остальных.

При агликогенозе как только весь сахар, имеющийся в крови, израсходуется, развивается гипогликемический синдром с утратой сознания вплоть до комы. Заболевание проявляет себя практически с первых дней жизни, особенно при отсутствии у матери достаточного количества молока при грудном вскармливании. Большие перерывы между кормлениями, ночной промежуток становятся причинами развития коматозного состояния.

Кома развивается в результате отсутствия достаточного энергетического обеспечения мозга. Весьма велика вероятность смертельного исхода в раннем детском возрасте. Если же им удается выжить, то развитие таких детей, как умственное, так и физическое значительно отличается от сверстников в худшую сторону. Введение глюкозы внутривенно выводит таких больных из коматозного состояния, однако при этом довольно долго сохраняется гипергликемия (поскольку не синтезируется гликоген).

Гликогеноз I типа (болезнь Гирке)

У таких детей может без видимой причины повышаться температура тела.

Источником этой разновидности является дефицит глюкозо-6-фосфатазы. Последствием становится избыточное аккумулирование гликогена в печени и почках. В крови наблюдается низкое содержание глюкозы (гипогликемия). Возникает своеобразный парадокс: гликогена избыток, но расщепить его нечем, поэтому возникает дефицит глюкозы. Больные требуют очень частых приемов пищи, чтобы концентрация глюкозы в крови была достаточной для обеспечения энергетических нужд.

Болезнь проявляет себя в первые годы жизни. У таких деток нет аппетита, возникают частые рвоты. Наблюдаются проблемы с дыханием из-за обменных нарушений: одышка, кашель. Гипогликемии могут приводить к развитию ком с судорогами. Часто повышается температура без инфекционных причин.

Откладывание гликогена в печени и почках приводит к увеличению этих органов с нарушением их функции. Из-за поражения печени развивается геморрагический синдром (склонность к спонтанным кровотечениям), нарушение фильтрационной функции почек приводит к накоплению мочевой кислоты. Если смертельный исход не настигает больных в раннем возрасте, то в последующем они отстают в физическом развитии, имеют непропорциональное тело (большая голова с «кукольным» выражением лица). Умственное развитие не страдает. Характерна гипотония и гипотрофия мышц. Половое созревание наступает значительно позже, чем у сверстников. У некоторых больных наблюдается снижение количества нейтрофилов в крови. Часто присоединяются вторичные бактериальные инфекции. Больных, которым удалось выжить и повзрослеть, настигают подагрическая нефропатия и аденомы печени. Поражение почек становится причиной потери

белка с мочой и повышения артериального давления. Может возникать почечная недостаточность. Аденомы печени могут перерождаться в рак.

Гликогеноз II типа (болезнь Помпе)

Эта разновидность может быть представлена в виде двух форм: генерализованной (недостаток фермента наблюдается в печени, почках, мышцах) и мышечной (дефицит фермента только в мышцах).

Генерализованная форма дает о себе знать в первые полгода жизни. Связана с дефицитом α-глюкозидазы. Плохой аппетит, беспокойство, вялость, низкий мышечный тонус, задержка развития, нарушения дыхания становятся первыми симптомами. Постепенно увеличиваются в размерах сердце, печень, почки, селезенка. Со стороны дыхательной системы развиваются частые бронхиты и пневмонии. Развивается сердечная недостаточность. Поражение нервной системы проявляется параличами, нарушением глотания. Прогноз для жизни при генерализованной форме неблагоприятный.

Мышечная форма имеет более благоприятное течение. Является результатом дефицита кислой α-1,4-глюкозидазы только в мышцах. Заявляет о себе позже: приблизительно в 15-25 лет. Основным проявлением мышечной формы являются слабость и снижение тонуса мышц. Помимо мышечных проблем, возникают нарушения осанки (сколиотическая деформация грудного отдела позвоночника), явления незначительной сердечной недостаточности. Больные с этой формой заболевания доживают до старости.

Гликогеноз III типа (болезнь Кори, болезнь Форбса, лимитдекстриноз)

Это самый распространенный гликогеноз. Его причиной становится недостаточность амило-1,6-глюкозидазы, в результате чего синтезируется неправильный гликоген. Неправильный гликоген депонируется в печени, сердце и мышцах. Начальные признаки заболевания выявляются еще у младенцев. У таких детей частые рвоты, задержка в физическом развитии, «кукольное» лицо. Гипогликемии могут приводить к утрате сознания. Мышечный тонус снижается, наряду с этим наблюдается утолщение мышц, связанное с накоплением гликогена. По этой же причине утолщается сердечная мышца (гипертрофия миокарда), из-за чего нарушается сердечная проводимость и ритм сердца.

Иногда после периода полового созревания болезнь протекает менее агрессивно. При этом нарушения печени отходят на второй план, а доминирующей симптоматикой становится мышечная слабость и истончение мышц (преимущественно икроножных).

Гликогеноз IV типа (болезнь Андерсена, диффузный гликогеноз с циррозом печени, амилопектиноз)

Становится результатом дефицита амило-(1,4-1,6) -трансглюкозидазы. Это приводит к образованию неправильного гликогена. Эта разновидность гликогеноза может наследоваться сцепленно с полом, а не только аутосомно. С первых дней жизни начинается отложение неправильного гликогена в печени. Это быстро приводит к нарушению деятельности клеток печени, застою желчи, развитию гепатита, а затем и цирроза печени. Желтуха, повышенная кровоточивость, увеличение живота в размерах с накоплением жидкости в брюшной полости (асцит), кожный зуд, интоксикация организма, – все это следствия развившегося цирроза печени. Развиваются генерализованная мышечная гипотрофия и тяжелая кардиомиопатия. Часто присоединяются бактериальные инфекции. Смертельный исход наступает на 3-5 году жизни.

Гликогеноз V типа (болезнь Мак-Ардла, миофосфорилазная недостаточность)

Это исключительно мышечный гликогеноз, потому что в основе лежит изъян такого фермента, как мышечная фосфорилаза. В мышечной ткани происходит отложение нерасщепленного гликогена, из-за чего мышцы уплотняются и утолщаются, однако при этом становятся очень слабыми, быстро утомляющимися. Возникают болезненные мышечные спазмы при физической нагрузке, которые могут сопровождаться повышенной потливостью и бледностью кожных покровов, тахикардией. С мочой может выделяться мышечный белок. Все эти проявления возникают до подросткового периода и постепенно нарастают. Возможно формирование контрактур крупных суставов. По сравнению с другими разновидностями гликогенозов, гликогеноз V типа является доброкачественным заболеванием.

Гликогеноз VI типа (болезнь Герса, гепатофосфорилазная недостаточность)

В основе такого гликогеноза лежат проблемы с фосфорилазой печени. В результате гликоген накапливается в печени. Уже у младенцев наблюдается увеличение размеров печени, отмечается отставание ребенка в развитии, дети слабо набирают вес. Вместе с другими обменными нарушениями в крови выявляют повышенное содержание жира. Отмечается увеличенное содержание гликогена в красных кровяных тельцах (эритроцитах).

Гликогеноз VII типа (болезнь Таруи, миофосфофруктокиназная недостаточность)

Заболевание связано с дефицитом миофосфофруктокиназы мышц, из-за чего в них возникает отложение гликогена. По своим клиническим признакам гликогеноз VII типа практически не отличается от гликогеноза V типа и также имеет относительно доброкачественное течение.

Гликогеноз VIII типа (болезнь Томсона)

При этом гликогенозе не известна точная генетическая причина, а изъян фермента обнаружен в печени и головном мозге. На первое место выходят нарушения в нервной системе. Характерным является нистагм (непроизвольные дрожательные движения глазных яблок), что называют «танцующими глазами» в данном случае, дискоординация мышечных сокращений, что проявляется неточностью движений. Постепенно развиваются нарушение мышечного тонуса, парезы, судорожные подергивания. Неврологические расстройства неуклонно прогрессируют. Печень увеличивается в размерах, нарастают проявления печеночной недостаточности. У таких больных нет перспектив дожить до среднего возраста, заболевание заканчивается смертью в детстве.

Гликогеноз IX типа (болезнь Хага)

Это разновидность гликогеноза передается с половой хромосомой. Источником является дефицит фермента в печени. Накопление гликогена приводит к печеночной недостаточности.

Гликогеноз X типа

Эта разновидность описана всего лишь единственный раз во всем мире. Тип наследования установить не удалось. Заболевание протекало с увеличением печени, сопровождалось болью и напряжением мышц при вовлечении их в работу.

Гликогеноз XI типа (болезнь Фанкони-Бикеля)

Гликогеноз с неустановленным механизмом передачи. Ферментные дефекты обнаружены в печени и почках. Этой разновидности гликогенозов свойственно увеличение размеров и уплотнение печени, отставание в росте. Отличием от других разновидностей гликогенозов является уменьшение количества фосфатов в крови и развитие в связи с этим рахита. По достижении периода полового созревания наблюдается тенденция к некоторому улучшению состояния: печень уменьшается в размерах, содержание фосфора нормализуется, дети начинают расти.

Кукурузный крахмал обеспечивает ребенка глюкозой на несколько часов, это помогает избежать гипогликемии в ночное время.

Гликогенозы, как и практически все генетические заболевания, являются неизлечимой патологией. Все меры медицинской помощи, по существу, являются симптоматическими. Тем не менее, поскольку ряд гликогенозов имеет благоприятный прогноз для жизни при соблюдении ряда условий (в частности мышечная форма II типа, III, V, VI, VII, IX, XI тип), то лечебные мероприятия способствуют уменьшению ряда симптомов и улучшению состояния здоровья пациента.

В основу лечения при гликогенозах положена диетотерапия, позволяющая избежать гипогликемии и второстепенных нарушений метаболических процессов в организме. Суть диеты заключается в изучении гликемического профиля больного и подборе такого режима приема пищи, который позволит избежать прогрессирования биохимических нарушений (нарушений метаболизма жиров, молочной кислоты) и

обеспечит достаточный уровень глюкозы в крови. Частые, в том числе ночные, кормления у маленьких детей помогают избежать гипогликемии. Обычно назначается пища, содержащая много белков и углеводов, а жиры ограничиваются. Процентное соотношение приблизительно следующее: углеводы — 70%, белки – 10%, жиры – 20%.

Для того чтобы не приходилось кормить ребенка несколько раз за ночь, может использоваться сырой кукурузный крахмал (назначается детям старше 1 года), который разводят водой в соотношении 1:2. Начинают введение с дозы 0,25 мг/кг, затем ее постепенно увеличивают настолько, чтобы введенной дозы крахмала хватало для обеспечения организма глюкозой на 6-8 часов, то есть на всю ночь. Таким образом, прием крахмала на ночь позволяет отказаться от ночных кормлений, что обеспечивает детям полноценный сон без перерывов.

В тех случаях, когда маленькие дети страдают от частых приступов гипогликемии, и повлиять на это только соблюдением диеты не удается, назначается дополнительное введение чистой глюкозы или смеси, обогащенной мальтодекстрином.

При гликогенозе I типа требуется значительно ограничить продукты, содержащие галактозу и фруктозу (молоко, большинство фруктов). При III типе гликогеноза таких ограничений нет. При VII типе нужно ограничить поступление сахарозы.

В ряде случаев (особенно при возникновении других, интеркуррентных заболеваний у таких детей) одного энтерального питания становится недостаточно, поскольку потребность организма в энергии повышается. Тогда прибегают к кормлению через назогастральный зонд и внутривенным инфузиям в условиях стационара.

Те разновидности гликогенозов, при которых дефекты ферментов локализованы только в мышцах, требуют употребления фруктозы внутрь по 50-100 г в день, комплекса витаминов, аденозинтрифосфорной кислоты.

Из медикаментозных препаратов при гликогенозе I типа используют препараты кальция, витамин Д и В1, аллопуринол (для предотвращения подагры и отложения уратов в почках), никотиновую кислоту (для снижения риска калькулезного холецистита и предотвращения панкреатита). Если с почками начинает выводиться белок, тогда назначают ингибиторы ангиотензинпревращающего фермента (Лизиноприл, Эналаприл и другие).

Для гликогеноза II типа разработана специфическая ферментная терапия (заместительная). Препарат Миозим вводится по 20 мг/кг каждые две недели. Миозим представляет собой созданный с помощью генной инженерии искусственный человеческий фермент α-глюкозидазу. Естественно, эффект тем больше, чем раньше начато лечение. Но пока что препарат разрешен к применению только в некоторых странах Европы, в Японии и США. Генная инженерия продолжает разработки в этом направлении, пытаясь синтезировать и другие ферменты, необходимые для нормального синтеза и расщепления гликогена, чтобы помочь больным с остальными формами гликогенозов.

Некоторым больным помогает введение глюкокортикоидов, анаболических гормонов и глюкагона. Препараты стимулируют некоторые биохимические процессы (например, глюконеогенез, то есть процесс синтеза глюкозы из неуглеводных веществ), тем самым уменьшая проявления заболевания.

Из хирургических методов лечения при некоторых формах гликогенозов используют наложение портокавального анастомоза или трансплантацию печени. Портокавальный анастомоз накладывают больным с тяжелой формой гликогеноза I и III типов. Он позволяет уменьшить обменные нарушения, способствует регрессу размеров печени, улучшает переносимость гипогликемии. Пересадка печени от донора осуществляется при I, III, IV типах гликогенозов. При гликогенозе I типа операция проводится только при неэффективности мероприятий диетотерапии, при гликогенозе III типа – когда печень больного уже не спасти.

Таким образом, гликогенозы – это довольно обширная группа болезней обмена веществ с генетическими истоками. На сегодняшний день, медицина не располагает 100%- ми методами эффективного лечения сего недуга, перспективы в этом направлении принадлежат генной инженерии.

Фруктоземия встречается крайне редко. Имеет наследственную природу и связано с нарушением расщепления молекул некоторых сахаров, содержащихся в фруктах. Основными поражаемыми органами являются печень и почки. Нередко они даже полностью разрушаются.

Несмотря на то что ребенок болен с рождения, первые признаки заболевания появляются только после введения в рацион фруктов. Чаще всего они возникают после того, как ребенку первый раз в жизни дается фруктовый сок. После этого возникает рвота, иногда понос, ребенок отказывается от дальнейшего приема пищи. Если вызвавшие такую реакцию продукты не исключены из рациона и ребенок продолжает их получать, то он начинает терять в весе. В дальнейшем ребенок становится вялым, сонливым, часто падает в обморок, развиваются судороги, во время которых ребенок сильно потеет. Все эти проявления обусловлены низким содержанием в крови глюкозы. При дальнейшем прогрессировании заболевания увеличивается в размерах печень, появляется желтушность кожи, признаки нарушения работы почек. Значительно позже и реже возникают нарушения со стороны нервной системы. Зачастую родители сами замечают, какие продукты приводят к ухудшению состояния ребенка и исключают их из его рациона. Поэтому тяжелые последствия заболевания возникают достаточно редко.

Основными методами, при помощи которых можно правильно поставить диагноз в больнице, являются различные лабораторные исследования.

Лечение фруктоземии в основном состоит в назначении диеты с исключением из рациона ребенка «вредных» продуктов питания. Подобные диетические рекомендации должны выполняться не менее трех последующих лет. Как правило, в дальнейшем переносимость фруктов улучшается, поэтому постепенно их можно добавлять в рацион. Однако существует ряд «особо опасных» продуктов, употребление которых нежелательно. Сюда относят тростниковый сахар, сахарную свеклу, мед, яблоки, груши, сливу, апельсины, арбуз, клубнику, вишню, фруктовые джемы, повидло, морковь, репу, какао.

Прогноз всегда хороший, но лишь при условии строгого соблюдения диеты. галактоземия фруктоземия углевод лечение

Большое значение для выявления наследственных болезней обмена углеводов имеют методы качественного и количественного определения углеводов в биологических жидкостях организма, основной из которых является кровь. С целью быстрого определения содержания глюкозы в моче используются специальные индикаторные полоски бумаги. Однако данный метод является только лишь относительно точным в связи с тем, что он определяет только наличие глюкозы и ее приблизительное количество. Эти данные получают при изменении цвета индикаторной полоски после помещения ее в мочу исследуемого.

Для выявления болезней депонирования гликогена большое значение имеет нагрузочный тест. В этом случае исследуемому предлагается выпить раствор галактозы с определенным ее количеством, после чего определяют содержание глюкозы в крови. В ряде случаев для уточнения типа болезни необходимо изучение активности ферментов, принимающих участие в обмене глюкозы. Данные ферменты содержатся в мышцах, печени и некоторых других органах. Исследование проводится на кусочках ткани органа, которые берутся при проведении специального метода под названием биопсия.

Галактоземия - наследственная ферментопатия, характеризующаяся нарушением нормального процесса углеводного обмена, а именно – метаболизма галактозы. Признаками галактоземии являются непереносимость грудного молока и молочных смесей, рвота, анорексия, гипотрофия, желтуха, цирроз печени, спленомегалия, отеки, катаракта, задержка психомоторного развития. Скрининг на галактоземию проводится всем новорожденным; дополнительное обследование включает определение уровня галактозы в крови и моче, проведение нагрузочных проб с галактозой и глюкозой, генетическое тестирование, УЗИ брюшной полости, ЭЭГ и др. Основу терапии галактоземии составляет безлактозная диета, назначаемая с первых дней жизни ребенка.

Галактоземия – наследственная патология обмена веществ, обусловленная недостаточностью активности ферментов, принимающих участие в метаболизме галактозы. Неспособность организма утилизировать галактозу приводит к тяжелым поражениям пищеварительной, зрительной и нервной системы детей в самом раннем возрасте. В педиатрии и генетике галактоземия относится к редким генетическим заболеваниям, встречающимся с частотой один случай на 10 000 - 50 000 новорожденных.

Впервые клиника галактоземии была описана в 1908 году у ребенка, страдавшего сильным истощением, гепато- и спленомегалией, галактозурией; при этом заболевание исчезло сразу после отмены молочного питания. Позднее, в 1956 г. ученый Герман Келкер определил, что в основе заболевания лежит нарушение метаболизма галактозы.

Причины галактоземии

Галактоземия является врожденной патологией, наследуемой по аутосомно-рецессивному типу, т. е. заболевание проявляется только в том случае, если ребенок наследует две копии дефектного гена от каждого из родителей. Лица, гетерозиготные по мутантному гену, являются носителями заболевания, однако у них тоже могут развиваться отдельные признаки галактоземии в легкой степени.

Превращение галактозы в глюкозу (метаболический путь Лелуара) происходит при участии 3-х ферментов: галактоза-1-фосфатуридилтрансферазы (GALT), галактокиназы (GALK) и уридиндифосфат-галактозо-4-эпимеразы (GALE). В соответствии с дефицитом этих ферментов различают 1 (классический вариант), 2 и 3 тип галактоземии.

Выделение трех типов галактоземии не совпадает с порядком действия ферментов в процессе метаболического пути Лелуара. Галактоза поступает в организм с пищей, а также образуется в кишечнике в процессе гидролиза дисахарида лактозы. Путь метаболизма галактозы начинается с ее превращения под действием фермента GALK в галактозо-1-фосфат. Затем при участии фермента GALT галактозо-1-фосфат преобразуется в УДФ-галактозу (уридилдифосфогалактозу). После этого с помощью GALE метаболит превращается в УДФ – глюкозу (уридилдифосфоглюкозу).

При недостаточности одного из названных ферментов (GALK, GALT или GALE) концентрация галактозы в крови значительно повышается, в организме накапливаются промежуточные метаболиты галактозы, которые вызывают токсическое поражение различных органов: ЦНС, печени, почек, селезенки, кишечника, глаз и др. Нарушение метаболизма галактозы и составляет суть галактоземии. Наиболее часто в клинической практике встречается классический (1 тип) галактоземии, обусловленный дефектом фермента GALT и нарушением его активности. Ген, кодирующий синтез галактоза-1-фосфатуридилтрансферазы, находится в околоцентромерном участке 2-ой хромосомы.

Симптомы галактоземии

По тяжести клинического течения выделяют тяжелую, среднюю и легкую степени галактоземии.

Первые клинические признаки галактоземии тяжелой степени развиваются очень рано, в первые дни жизни ребенка. Вскоре после кормления новорожденного грудным молоком или молочной смесью возникает рвота и расстройство стула (водянистый понос), нарастает интоксикация. Ребенок становится вялым, отказывается от груди или бутылочки; у него быстро прогрессируют гипотрофия и кахексия. Ребенка могут беспокоить метеоризм, кишечные колики, обильное отхождение газов.

В процессе обследования ребенка с галактоземией неонатологом выявляется угасание рефлексов периода новорожденности. При галактоземии рано появляется стойкая желтуха различной степени выраженности и гепатомегалия, прогрессирует печеночная недостаточность. К 2-3 месяцу жизни возникают спленомегалия, цирроз печени, асцит.

Нарушения процессов свертывания крови приводит к появлению кровоизлияний на коже и слизистых оболочках. Дети рано начинают отставать в психомоторном развитии, однако степень интеллектуальных нарушений при галактоземии не достигает такой тяжести, как при фенилкетонурии. К 1-2 месяцам у детей с галактоземией выявляется двусторонняя катаракта. Поражение почек при галактоземии сопровождается глюкозурией, протеинурией, гипераминоацидурией. В терминальной фазе галактоземии ребенок погибает от глубокого истощения, тяжелой печеночной недостаточности и наслоения вторичных инфекций.

При галактоземии средней тяжести также отмечается рвота, желтуха, анемия, отставание в психомоторном развитии, гепатомегалия, катаракта, гипотрофия. Галактоземия легкой степени характеризуется отказом от груди, рвотой после приема молока, задержкой речевого развития, отставанием ребенка в массе и росте. Однако даже при легком течении галактоземии продукты обмена галактозы токсическим образом воздействуют на печень, приводя к ее хроническим заболеваниям.

Галактоземия может протекать в моносимптомной форме, при которой обнаруживается только поражение ЦНС, катаракта или диспепсические расстройства. Описан вариант бессимптомной (асимптоматической) галактоземии Дюарте, при которой недостаточность ферментов выявляется только при биохимическом исследовании крови.

Осложнения галактоземии включают цирроз печени, сепсис, кровоизлияния в стекловидное тело, первичную аменорею, синдром истощения яичников. При галактоземии у 50% детей дошкольного возраста выявляется моторная алалия, характеризующаяся трудностью организации и координации речевых движений, бедностью словарного запаса, обилием парафазий и персевераций при сохранном понимании обращенной речи.

Диагностика галактоземии

Для снижения риска развития осложнений при галактоземии необходимо как можно более раннее выявление патологии. Возможна пренатальная диагностика галактоземии, включающая проведение биопсии хориона, амниоцентеза с последующим исследованием ворсин и амниотической жидкости. В России, согласно современным стандартам, осуществляется скрининг новорожденных на следующие наследственные заболевания: фенилкетонурию, врожденный гипотиреоз, галактоземию, адрено-генитальный синдром и муковисцидоз. Неонатальный скрининг проводится на 3-5 сутки у доношенных детей и 7-10 сутки – у недоношенных. С этой целью производится забор капиллярной крови, которая переносится на фильтровальную бумагу и виде высушенных пятен отправляется в генетическую лабораторию.

Если при неонатальном скрининге у ребенка выявляется подозрение на галактоземию, проводится повторное решающее тестирование. В случае повторного обнаружения высокого уровня галактозы в крови или низкого уровня исследуемого фермента, ребенку устанавливается диагноз галактоземии. Сведения о таком ребенке сообщаются участковому педиатру, а семья новорожденного приглашается на консультацию генетика в медико-генетическую консультацию. Врач-генетик проводит подробный анализ родословной,

выполняет генетическое тестирование для выявления мутантного гена, объясняет специфику питания ребенка с галактоземией.

Иногда для диагностики галактоземии прибегают к определению уровня галактозы в моче, проведению нагрузочных проб с галактозой и глюкозой. Мониторинг биохимических показателей крови и общего анализа крови и мочи при галактоземии позволяет определить степень повреждения внутренних органов (почек, печени и др.).

Дети с галактоземией нуждаются в консультации детского невролога, детского офтальмолога, проведении электроэнцефалографии, УЗИ органов брюшной полости, биомикроскопии глаза. В некоторых случаях показана пункционная биопсия печени. Галактоземию следует дифференцировать от других гликогенозов, сахарного диабета I типа, врожденной атрезии желчных протоков, гепатита, гемолитической болезни новорожденных.

Лечение галактоземии

Основная роль в лечении галактоземии принадлежит диетотерапии. Особенность питания при галактоземии заключается в пожизненном исключении из рациона продуктов, содержащих лактозу и галактозу: любого молока (женского, коровьего, козьего, детских молочных смесей, низколактозных смесей и пр.), всех молочных продуктов, хлеба, выпечки, колбас, конфет, маргаринов и др. При галактоземии запрещается употребление растительных и животных продуктов, содержащих потенциальные источники галактозы - галактозиды (бобовые, соя) и нуклеопротеины (почки, печень, яйца и др.).

Дети, страдающие галактоземией, обеспечиваются специальными смесями на основе изолята соевого белка, гидролизата казеина, синтетических аминокислот, а также безлактозными казеинпредоминантными молочными смесями. С 4-х месячного возраста вводятся фруктовые и ягодные соки; с 4,5 месяцев - фруктовое пюре; с 5 месяцев – овощное пюре; с 5,5 месяцев – безмолочные каши из кукурузной, гречневой или рисовой муки в разведении специализированной смесью; с 6 месяцев - мясной прикорм на основе мяса кролика, цыпленка, индейки, говядины; с 8 месяцев – рыба. Альтернативным источником углеводов для пациентов с галактоземией служат продукты на основе фруктозы.

Для улучшения метаболических процессов назначаются поливитамины, кокарбоксилазу, АТФ, оротат калия. Лицам с галактоземией противопоказан прием спиртовых настоек и гомеопатических препаратов, поскольку последние содержат лактозу. Дети с речевыми нарушениями нуждаются в консультации логопеда и целенаправленной работе по коррекции ОНР.

Прогноз и профилактика галактоземии

Лечение галактоземии, начатое с первых дней жизни позволяет избежать развития цирроза, катаракты, олигофрении. Если лечение начато в более поздние сроки, когда уже произошло поражение печени и ЦНС, с помощью рациональной диетотерапии прогрессирование заболевания можно замедлить. При тяжелых формах галактоземии может быть летальный исход. Диспансерное наблюдение ребенка с галактоземией осуществляется педиатром, генетиком, диетологом, детским окулистом и детским неврологом. Детям с галактоземией присваивается инвалидность.

Учитывая наследственную обусловленность галактоземии, медико-генетическое консультирование рекомендуется пройти будущим родителям, в чьих семьях есть родственники или дети с данным заболеванием. Беременным с высоким риском рождения ребенка с галактоземией, следует ограничить употребление молочных продуктов.

I Перечень вопросов для проверки конечного уровня знаний:

1. Гликогенозы: виды, симптомы, лечение.
2. Что такое гликоген и для чего он нужен?
3. Виды гликогенозов, их характеристика.
4. Фруктоземия.
5. Галактоземия.

II Самостоятельная работа обучающихся: составить ментальную карту по теме: «Наследственные нарушения обмена углеводов (обмен гликогена, фруктозы, галактозы)».

III Список используемой литературы:

Обязательная:

1.Е.С. Северин «Биохимия», Москва 2004;
2.Е.С. Северин «Биохимия с упражнениями и задачами», Москва 2008;

Дополнительная:

1.Интернет ресурсы
2.Материал конспектов занятия

Тема: Биохимические основы развития желчекаменной болезни.

Желчнокаменная болезнь - патологический процесс, при котором в жёлчном пузыре образуются камни, основу которых составляет холестерол.

Желчнокаменная болезнь связана с образованием камней в желчном пузыре и (или) желчных протоках. Чаще страдают женщины, так как у них вырабатываются специфические гормоны - эстрогены. Они-то как раз и могут обусловливать нарушения опорожнения желчного пузыря. Из-за этого желчь застаивается, в ней повышается концентрация холестерина, начинают выпадать холестериновые кристаллы, а вокруг них в дальнейшем образуются камни.

В возникновении желчнокаменной болезни велика роль чрезмерного питания и малоподвижного образа жизни, способствующего застою желчи. Застой желчи может быть связан с анатомическими изменениями желчного пузыря и желчных протоков в результате их воспаления (рубцы, спайки), а также с нарушениями их двигательной функции из-за нерегулярного питания (большие перерывы между едой), переедания, хронических запоров. Определенную роль играет наследственное предрасположение (заболевание встречается у членов одной семьи в разных поколениях). В результате застоя желчи или нарушения обмена веществ снижается содержание в ней желчных кислот, основные ее компоненты - холестерин и билирубин (красящее вещество желчи) выпадают в осадок и в конечном итоге образуются камни.

Основная функция желчи – участие в переваривании и всасывании липидов. Эту функцию выполняют желчные кислоты, эмульгирующие жиры и таким образом обеспечивающие гидролиз жиров панкреатической липазой. Секреция желчи является также основным путем выведения избытка холестерина из организма. Он выводится как в виде желчных кислот, которые образуются в печени из холестерина, так и в свободном виде. Холестерин – гидрофобное вещество, поэтому в растворенном состоянии в виде мицелл желчи его удерживают желчные кислоты. Соотношение желчных кислот и холестерина должно быть приблизительно 12:1. при уменьшении образования желчи или увеличении количества в желчи холестерина последний выпадает в осадок. Этот густой маслянистый осадок пропитывается солями кальция, желчными пигментами и со временем превращается в камни.

Избыточная секреция холестерина с желчью – один из механизмов камнеобразования в желчном пузыре. Это может иметь место при ожирении, высокалорийной диете, приеме некоторых препаратов, в чатности клофибрата, и, по-видимому, обусловлено повышением активности ГМК-КоА-редуктазы, участвующей в синтезе холестерина в печени.

Пониженная секреция желчных кислот и фосфолипидов – еще одна причина камнеобразования – наблюдается при врожденных нарушениях обмена веществ (сухожильно-мозговой ксантоматоз, другие редкие болезни) и нарушении кишечно-печеночного кругооборота (длительное парентеральное питание, резекция подвздошной кишки). Кроме того, у большинства больных с желчными камнями понижена активность холестерин-7-альфа-гидроксилазы (этот фермент принимает участие в синтезе первичных желчных кислот).

Фосфолипиды играют важную роль в литогенезе. Здесь имеется в виду образование дефектных везикул. Обычно холестерин и фосфолипиды секретируются в желчь в виде двухслойных везикул, которые отличаются нестабильностью и превращаются вместе с желчными кислотами в другие агрегаты, в частности в мицеллы. Для образования смешанных мицелл в большей степени используются фосфолипиды, чем холестерин. В результате нестабильные везикулы, богатые холестерином, объединяются в более крупные многослойные везикулы, из которых образуются кристаллы холестерина.

У большинства людей с пересыщенной желчью камни не образуются, так как желчь покидает желчный пузырь раньше, чем успевают образоваться зародыши кристаллизации холестерина. Полагают, что пересыщению желчи холестерином способствуют два дополнительных фактора: 1) уменьшение резерва желчных кислот; 2) усиленное превращение холевой кислоты в дезоксихолевую.

Первое может быть следствием ускоренного прохождения первичных желчных кислот из тонкой кишки в толстую, второе – усиленного дегидроксилирования холевой кислоты и ускоренного всасывания образующейся при этом дезоксихолевой кислоты.

В литогенной желчи ускорено образования так называемых зародышей кристаллизации (мелких кристалликов моногидрата холестерина). Именно этой особенностью литогенная желчь отличается от нормальной. К предрасполагающим этому факторам можно отнести гликозаминогликаны. Препятствующим факторам образованию зародышей кристаллизации относят апопротеины А1 и А 2 и некоторые гликопротеиды; их недостаток также стимулирует камнеобразование.

Полагают, что образование и рост кристаллов моногидрата холестерина происходит в муциновом геле на поверхности слизистой. Слияние везикул приводит к образованию жидких кристаллов, которые, в свою очередь, превращаются затем в твердые кристаллы моногидрата холестерина. Дальнейший рост кристаллов происходит в результате осаждения молекул холестерина изх пересыщенных им простых и многослойных везикул.

Выделение холестерола в жёлчь должно сопровождаться пропорциональным выделением жёлчных кислот и фосфолипидов, удерживающих гидрофобные молекулы холестерола в жёлчи в мицеллярном состоянии У большинства больных желчнокаменной болезнью активность ГМГ-КоА-редуктазы повышена, следовательно увеличен синтез холестерола, а активность 7-α-гидроксилазы, участвующей в синтезе жёлчных кислот, снижена. В результате синтез холестерола увеличен, а синтез жёлчных кислот из него замедлен, что приводит к диспропорции количества холестерола и жёлчных кислот," секретируемых в жёлчь.

Если эти пропорции нарушены, то холестерол начинает осаждаться в жёлчном пузыре, образуя вначале вязкий осадок, который постепенно становится более твёрдым. Иногда он пропитывается билирубином - продуктом распада тема, белками и солями кальция. Камни, образующиеся в жёлчном пузыре, могут состоять только из холестерола (холестериновые камни) или из смеси холестерола, билирубина, белков и кальция. Холестериновые камни обычно белого цвета, а смешанные камни - коричневого цвета разных оттенков. Причин, приводящих к изменению соотношения жёлчных кислот и холестерола, в жёлчи много: пища, богатая холестеролом, гиперкалорийное питание, застой жёлчи в жёлчном пузыре, нарушение энтерогепатической циркуляции, нарушения синтеза жёлчных кислот, инфекции жёлчного пузыря. Если камни начинают перемещаться из жёлчного пузыря в жёлчные протоки, то они вызывают спазм жёлчного пузыря и протоков, что больной ощущает как приступ сильной боли. Если камень перекрывает проток некоторое время, то нарушается поступление жёлчи в кишечник, жёлчные пигменты проходят через мембраны гепатоцитов в сторону синусоидов и попадают в кровь, что приводит к развитию об-турационной (подпечёночной желтухи). Одним из следствий нарушения баланса **ХОЛ (пищ) + ХОЛ (синт) = ХОЛ (экскр) = Желч.кисл (экскр)**является гиперхолестеренемия и желчекаменная болезнь. При ЖКБ в желчном пузыре и его протоках образуются камни в результате осаждения и кристаллизации компонентов желчи – холестерина и билирубина. Обычно это холестерин. Образование холестериновых камней происходит вследствие увеличения кол-ва холестерина в составе желчи и уменьшение синтеза жирных к-т. Осаждению холестерина в желчном пузыре способствует застой желчи, воспалительные заболевания желчного пузыря и его протоков. Центрами кристаллизации холестерина могут служить конгломераты белка или слущивающиеся клетки эпителия.

Представление о биосинтезе и катаболизме фосфолипидов и гликолипидов. Синтез фосфолипидов: Диацилглицерин используется и для синтеза фосфолипидов,

Например, лецитина:

CH_2-O-OC-R ЦМФ CH_2-O-OC-R

| ЦДФ-холин |

⋯⋯▶ CH-O-OC-R` CH-O-OC-R`

| трансфераза |

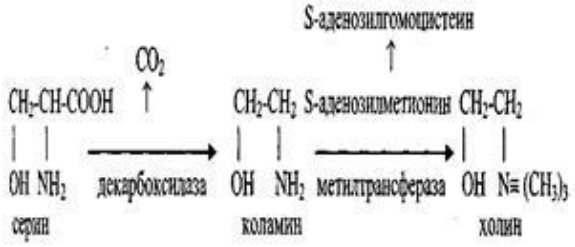
CH_2-OH CH_2-O-PO-OH CH_3

диацилглицерин | |

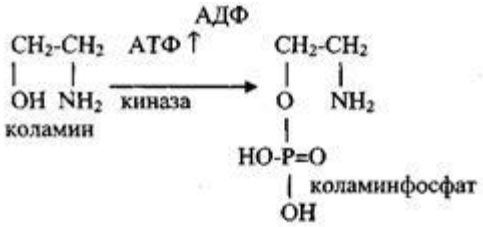
O-CH_2-CH_2--N-CH_3

лецитин CH_3

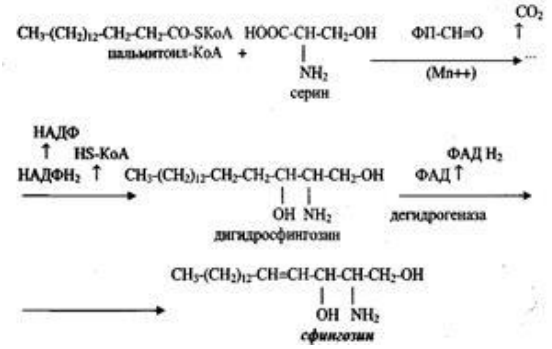
Для синтеза фосфолипидов и гликолипидов - главных структурных компонентов мембран клетки, кроме типичных компонентов липидов (глицерофосфат и жирные кислоты) необходимы сфингозин, холин или коламин, сиаловые кислоты и другие производные углеводы. *Коламин и холин*синтезируются из аминокислоты серин. Донатором метильных групп при синтезе холина служит метионин, присутствующий в клетках в форме *S-аденозилметионина:*



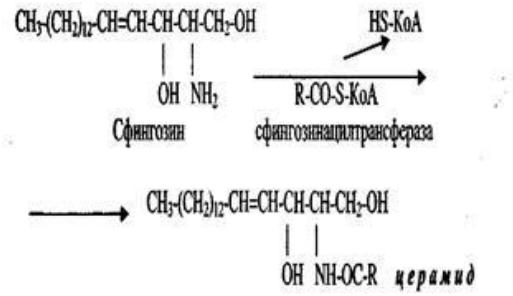
Коламин под воздействием коламин фосфокиназы активируется образуя ***коламин фосфат***



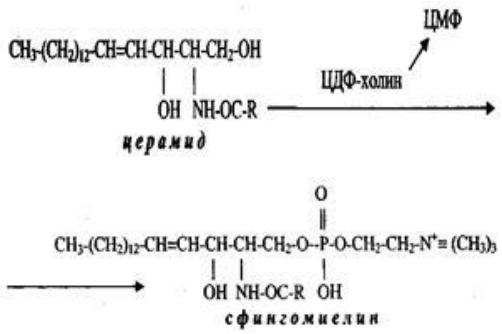
Синтез гликолипидов: Синтез гликолипидов идет на мембранах эндоплазматического ретикулума, Образовавшиеся гликолипиды размещаются на поверхности мембраны, выстилающей цистерны эндоплазматического ретикулума. Отсюда они транспортируются в аппарат Гольджи и, включаясь в состав наружной поверхности плазматическиой мембраны, выходят из клетки. Синтез сфингозина, главного структурного компонента сфингофосфатидов и гликолипидов, также в основном идет в печени. Источником служит аминокислота серин и пальмитоил-КоА.



Под воздействием фермента сфингозин-ацилтрансферазы к сфингозину пептидной связью присоединяется жирная кислота образуется церамид:



Далее к церамиду присоединяется фосфохолин образуется сфингозинфосфатид **сфингомиелин:**



Понятие о сфинголипидозах. Катаболизм гликолипидов обеспечивается группой специфических ферментов находящихся в лизосомах. Это сфингомиелиназа, бета-глюктозидаза, бета-галактозилгидролаза, альфа-галактозидаза, гексозамидиназа А и В и другие. Существует около десятка специфических лизосомных болезней накопления - сфинголипидозов (гликолипидозов). Одним из сфинголипидозов является болень Гоше (Gaucher), наследуемая по аутосомно-рецессивному типу. При этом заболевании происходит накопление в клетках печени селезенки, легких и др. глюкозилцерамида (цереброзида) вследствие повреждения фермента бета-глюкозидазы, разрушающего этот гликолипид на глюкозу и церамид. Это приводит к увеличению печени и селезенки в 4-5 раз по сравнении с нормой. Развивается анемия, задерживается умственное развитие, нередки явления геморрагического диатеза, остеопороз. В связи с инфильтрацией легких клетками Гоше появляются признаки дыхательной недостаточности. Рентгенологические изменения в легких напоминают милиарный туберкулез. Прогноз не благоприятен.

Лечение желчнокаменной болезни. В начальной стадии образования камней можно применять в качестве лекарства хенодезоксихолевую кислоту. Попадая в жёлчный пузырь, эта жёлчная кислота постепенно растворяет осадок холестерола (холестериновые камни), однако это медленный процесс, требующий нескольких месяцев.

I Перечень вопросов для проверки конечного уровня знаний:

1. Желчнокаменная болезнь определение.
2. Этиология данной патологии.
3. Клиническая картина.
4. Биохимические показатели при желчнокаменной болезни.

II Самостоятельная работа обучающихся:

Составить ментальную карту по теме: «Биохимические основы развития желчекаменной болезни».

III Список используемой литературы:

Обязательная:

1. Е.С. Северин «Биохимия», Москва 2004;
2. Е.С. Северин «Биохимия с упражнениями и задачами», Москва 2008.

Дополнительная:

1. Интернет ресурсы
2. Материал конспектов занятия

Тема: Биохимические аспекты развития атеросклероза. Роль атерогенных (ЛПОНП, ЛПНП) липопротеидов в развитии этой патологии.

Атеросклероз - отложение холестерина в стенках сосудов (хо- лестериноз) наблюдается в любом возрасте, даже в детском. Как правило, атеросклероз возникает при сочетанном действии факторов двух типов:

1. Тех, которые ведут к повреждению стенок сосудов;
2. Тех, которые вызывают нарушения в обмене холестерина и других фракций липидов.

К первому типу относятся так называемые «факторы риска»: курение, гиподинамия, загрязнение окружающей среды, ведущее к попаданию в организм ксенобиотиков (фториды, CO, H2S, сви¬нец, бензол, соединения ртути), стресс, артериальная гипертен¬зия и т.д. В стенках сосудов эти факторы усиливают перекисное окисление липидов и, как следствие, возникает повышение сосу¬дистой проницаемости.

Вторая группа причин - нарушение соотношения различных транспортных форм холестерина. Соотношение обычно оцени¬вают методом вычисления коэффициента атерогенности крови (КаК):

$$\text{КаК} = \frac{\text{ÕÑî áùèé} - \text{ÕÑËÂÏ}}{\text{ÕÑËÂÏ}}$$

Он показывает соотношение ХС в ЛНП, которые его достав¬ляют к тканям, к ХС в ЛВП, которые совершают обратный про¬цесс. В норме КаК < 3. У больных атеросклерозом он > 5.

У новорожденных уровень общего холестерина (свободного и эстерифицированного) в сыворотке крови снижен по сравнению с взрослыми в 3-4 раза. Снижение скорости эстерификации холестерина может быть обусловлено низкой активностью ЛХАТ и изменением состава ЛВП. Среди жирных кислот в составе эфи¬ров холестерина преобладают олеиновая, пальмитиновая, арахи¬доновая. У годовалых детей содержание общего холестерина уве¬личивается в 1,5-2 раза в основном за счет эстерифицированного холестерина, причем доля линолевой кислоты в них возрастает. Коэффициент эстерификации увеличивается, но еще ниже, чем у взрослых. К 12 годам уровень холестерина повышается за счет увеличения свободного и эстерифицированного холестерина и достигает величины, свойственной взрослым.

Липиды не растворяются в водных фазах организма, поэтому их транспорт кровью и лимфой осуществляется в виде комплек¬сов с белками и фосфолипидами, которые называются липопротеинами (транспортные формы липидов).

Методом ультрацентрифугирования различают транспорт¬ные формы в зависимости от плотности: хиломикроны (ХМ), липопротеины очень низкой плотности (ЛПОНП), липопротеины низкой плотности (ЛПНП), липопротеины высокой плотности (ЛПВП), липопротеины очень высокой плотности.

Существуют также промежуточные формы в метаболизме липопротеинов: остаточные хиломикроны (ХМ-ост) и липопротеины промежуточной (средней) плотности (ЛППП).

По электрофоретической подвижности по отношению к глобулинам липопротеины различаются: а, в, пре-в-липопротеины. Хиломикроны остаются на старте, подобно у-глобулинам. Липопротеины имеют двойное обозначение ЛПОНП – пре в липопротеины, ЛПНП - в-липопротеины, ЛПВП - а-липопротеины.

Липопротеины - сложные комплексные соединения, имею¬щие характерное строение: внутри липопротеиновой частицы находится жировая капля (ядро), содержащая неполярные липи¬ды (триглицериды, эстерифицированный холестерин); они окру¬жены оболочкой, в состав которой входят фосфолипиды, белок, свободный холестерин. Фосфолипиды и неэстерифицированный холестерин расположены в наружной оболочке таким образом, что полярные группы фиксированы наружу, а гидрофобные жир¬но-кислотные «хвосты» - внутрь частицы, и какая-то их часть даже погружена в липидное ядро. Кроме фосфолипидов на по¬верхности находятся белки - апопротеины, которые синтезиру¬ются в процессе формирования структуры липопротеина и могут

передаваться от одного типа липопротеинов к другим, определяя дальнейшее превращение и выполняя разнообразные функции:

1. Помогают солюбилизировать эфиры холестерина и триглицериды, взаимодействуя с фосфолипидами.

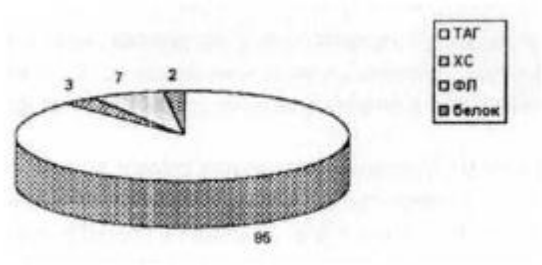
2. Регулируют реакции липидов, липопротеинов с фермен¬тами, такими как ЛХАТ (лецитинхолестеринацилтрансфераза), липопротеинлипаза, печеночная липаза.

3. Связываются с рецепторами на поверхности клеток, опре¬деляя место захвата и скорость деградации компонентов липопротеинов, в частности холестерина

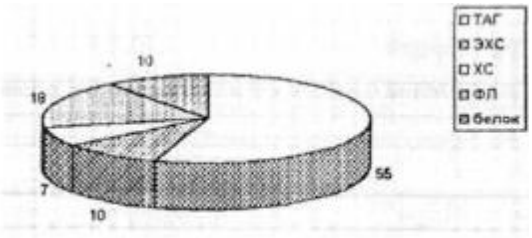
Различают: апопротеины AI, АИ, В - В100 и В48, С - CI, С II, С

III. Б. Они отличаются по молекулярной массе, строению, выполняемым функциям

Хиломикроны образуются в эпителии тонкого кишечника, транспортируют ТАГ экзогенного происхождения из кишечника в ткани. Это самые крупные (d - более 120 нм), но самые легкие частицы - их плотность колеблется от 0,92 до 0,98 г/мл. Белковая часть представлена apoB48, Сп, Е. Концентрация в плазме - 0,8-1,5
г/л

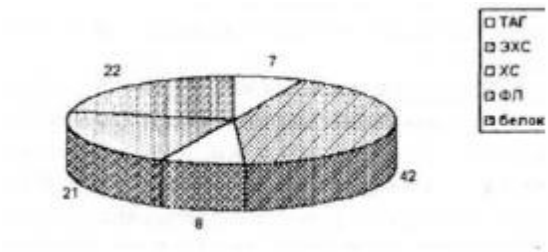


ЛПОНП синтезируются и клетках печени и транспортируют эндогенные ТАГ. Белковая часть представлена apoB100, Сп, Е (следы), d= 30-100 нм, плотность 0,96 - 1,006 г/мл.

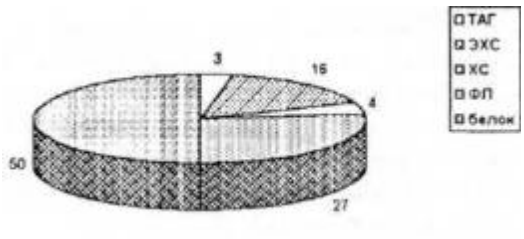


ЛППП - образуются в крови из ЛПОНП (промежуточная фор¬ма превращения ЛПОНП в ЛПНП). Плотность 1,006-1,019. Со¬держат 2 5% ТАГ, 30% ЭХС, 8% ХС, 23% ФЛ, 11% белка.

ЛП1НП - синтезируются в плазме крови из ЛПОНП, являются транспо тной формой холестерина в ткани. Белок представлен apoB100, d= >1-100 нм, удельный вес 1,019 - 1,063 г/мл. Концентрация в плазме - 3,2-4,5 г/л.



ЛПВП образуются в гепатоцитах. Белок, представлен apoA, Сп. Е. d их колеблется от 7 до 15 нм (это самые маленькие, но самые тяжелые липопротеины), удельный вес 1,063-1.21. Син- тезируютс как предшественники в печени, обогащаются холес¬терином в крови, возвращают избыточный холестерин в печень и поставл ют апопротеины в другие ЛП. (Например, apoСп, Е в хило-микроны). Концентрация в плазме - 1,3-4,2 г/л.



ЛПОВП - d - 5-30 нм удельный вес - выше 1,210. Содержат связанные с альбумином жирные кислоты, которые представляют собой транспортную форму липидов, мобилизованных из жиро¬вых депо при участии чувствительной к действию гормонов ли¬пазы жировой ткани (жирные кислоты в крови адсорбированы на поверхности сывороточного альбумина).

Метаболизм липопротеинов.

Ресинтезированные в эпителиальных клетках кишечника триглицериды и фосфолипиды, а также поступивший в эти клетки холестерин (здесь он частично этерифицируется), соединяются с основным белком хиломикронов аро В48, который синтезируется в энтероцитах и образуются незрелые хиломикроны. Они из-за своих больших размеров не способны проникать в кровеносные капилляры и диффундируют в лимфатическую систему, а затем в кровоток. В крови незрелые ХМ получают от ЛПВП апопро- теины Сп. Е, превращаясь в зрелые. Аро Сп, входящий в состав ХМ, взаимодействует с липопротеинлипазой, локализующейся на поверхности эндотелия сосудов, активирует ее и гидролизу- ет ТАГ в составе ХМ до глицерина и свободных жирных кислот. Глицерин переносится в печень, СЖК окисляются в тканях или депонируются в виде ТАГ. Остаточные хиломикроны (структуры, образовавшиеся из ХМ после удаления основной части ТАГ) за¬хватываются печенью через рецепторы, связывающие апоЕ. В ге- патоцитах они подвергаются гидролитическому действию лизо- сомальных ферментов, в результате освобождаются холестерин, жирные кислоты, аминокислоты.

В печени холестерин, синтезированный гепатоцитами и поступивший из остаточных ХМ, вместе с другими липидами, включается в ЛПОНП, которые образуются с участием аро В100 (синтезируется в печени). В эндоплазматическом ретикулуме и ап¬парате Гольджи липопротеины упаковываются в покрытые мем¬браной пузырьки и выводятся с помощью экзоцитоза. В кровь секретируются незрелые ЛПОНП, и получая от ЛПВП аро Сп и аро Е, становятся зрелыми, способными взаимодействовать с ли- попротеинлипазой. Липопротеинли-паза способствует гидролизу ТАГ, в липопротеинах возрастает относительное содержание холестерина и его эфиров, увеличивается плотность и уменьшаются линейные размеры. В результате ЛПОНП превращаются в ЛППП, а затем в ЛПНП.

Именно ЛПНП и ЛПОНП распознаются рецепторами клеток

-«ЛПНП-рецепторами», которые связываются с апоЕ и апоВ100 и обеспечивают эндоци-тоз. Клетки способны регулировать поступление холестерина путем увеличения, либо уменьшения количества свободных рецепторов. В норме взаимоотношение рецепторов эндотелиальных клеток с ЛПНП осуществляется по при¬нципу обратной связи: активность рецепторов и, как следствие, количество холестерина, поступающего, обратно пропорциональ¬но его концентрации в клетках. Внутри клетки ЛПНП сливаются с лизосомой с образованием вторичных лизосом. Белки, ТАГ, ФЛ и ЭХ (компоненты ЛПНП и ЛПОНП) расщепляются, а продукты распада используются для нужд клетки.

Холестерин может накапливаться в цитозоле клеток в виде капель эфиров холестерина (этерификацию холестерина катализи¬рует фермент ацетилхолесте-ринацилтрансфераза), он откладыва¬ется на мембране клетки, принимая участие в ее формировании, является ингибитором ключевого фермента синтеза холестерина

- ОМГ-КоА-редуктазы. Из-за большого содержания холестерина ЛПНП могут участвовать в формировании атеросклеротического повреждения артерий, потому они названы «атерогенными».

В печени происходит синтез ЛПВП, который начинается преимущественно в аппарате Гольджи клеток, где образуются дискообразные насцентные формы. В кровотоке они частично перераспределяются апопротеинами с другими транспортным формами липидов и поступают в различные органы. ЛПВП, имеющие примерно в 10 раз меньшую молекулярную массу, чем ЛПНП, лег¬ко проходят между клетками эндотелия и через стенку сосудов и активно «захватывают

холестерин» (снимают его с поверхности клетки). ХС ЛПВП подвергается действию лецитинхолестери- нацилтрансферазы (ЛХАТ), активируемой апоА; и происходит его этерификация. ЛХАТ катализирует перенос остатков жирных кислот с лецитина, присутствующего в ЛПВП, на холестерин. Фосфатидилхолин + холестерин ^ лизофосфатидилхолин + эфир
ЛХАТ холестерина
Образовавшиеся эфиры холестерина накапливаются в ядре частиц и ЛПВП превращаются в зрелые. С ЛПВП эфиры холестерина переносятся на ЛПОНП, ЛПНП с помощью особого бел¬ка-переносчика (белка, богатого аргинином). В их составе эфиры холестерина транспортируются в печень, где происходит ката¬болизм холестерина (используется на синтез желчных кислот). Таким образом, ЛПВП, освобождая ткани и кровь от избытка холестерина, оказывают антиатерогенное действие и получили название «антиатерогенные». Антиатерогенность ЛПВП связана также с высоким содержанием в них ФЛ, которые работают как антиоксиданты.
В норме концентрация общего холестерина = 3,9-6,5 ммоль/л ХС ЛПНП - 3,5-4,0 ммоль/л ХС ЛПВП у мужчин - 0,9-1,8 ммоль/л у женщин - 1,0-2,1 ммоль/л Повышение концентрации липопротеинов в плазме крови приводит к развитию гиперлипопротеидемии (ГЛП). В 1970 г экспертами ВОЗ была предложена классификация ГЛП, разрабо¬танная Frederickson et al.

Тип	Нарушения липопротеинов	Холестерин плазмы	Триглицериды плазмы
I – гиперхиломикро-немия	Избыток хиломикронов	повышен	повышены
II гипер-β-липопротеидемия IIа IIб	избыток ЛПНП избыток ЛПНП и ЛПОНП	повышен или в норме повышен	в норме повышены
III тип – флотирую-щая гиперлипопроте-идемия Или дис β-липопротеидемия	избыток ремнантов хиломикронов и ЛПНП	повышен	повышены
IV тип – гипер пре β-липопротеидемия	избыток хиломикронов и ЛПОНП	повышен или в норме	повышены
V тип – гипер пре β-липопротеидемия и хиломикронемия	избыток хиломикронов и ЛПОНП	повышен	повышены

Нарушение обмена холестерина приводит к атеросклерозу. В развитии данной патологии играет роль не только гиперлипопро- теинемия, но и изменение соотношения ЛПНП и ЛПВП.

Существует несколько теорий развития атеросклероза:

* Плазменная липидная концепция происхождения атеросклероза: повышение концентрации атерогенных липопротеинов (ЛПНП и их предшественников ЛПОНП) в плазме крови приво¬дит к развитию заболевания. Сформулирована английским уче¬ным Myant и отечественным биохимиком Климовым А.Н.

* Аутоиммунная теория: мЛПНП (модифицированные ЛПНП) приобретают антигенные свойства (выступают в качестве антиге¬на), на них вырабатываются антитела, образуется комплекс анти¬ген (ЛПНП) - антитело, который повреждает сосудистую стенку.

Таким образом, при повышении концентрации ЛПНП и ЛПОНП, при модификации ЛПНП (мЛПНП - в них гликопроте¬ины подвергаются десиалирова-нию, белок - гликозилированию, жирные кислоты - перекисному окислению липидов, происходит частичный протеолиз, агрегация или другие изменения), при об¬разовании комплексов мЛПНП с антителами, они фагоцитиру¬ются моноцитами крови и с помощью «скавенджер» рецепторов поступают в интиму сосудов. Здесь они разрушаются, освобож¬дая холестерин, который накапливается в цитозоле в виде капель эфиров холестерина, приводя к образованию «пенистых клеток». Нарушается функция клетки и субклеточных органелл, и она гибнет. «Пенистые» клетки, погибая, освобождают холестерин в межклеточное пространство и формируются атеросклеретические (липидные) пятна, а затем бляшки. Позже на их месте образуют¬ся фиброзные. Параллельно происходит агрегация тромбоцитов с образованием тромба, что ведет к сужению сосудов. В результате нарушается кровоснабжение органов, способствующих развитию различных осложнений: инсультов, инфарктов. Следовательно, в развитии атеросклероза ведущую роль играет повышение концентрации «атерогенных» липопротеинов (ЛПНП, ЛПОНП) и снижение «антиатерогенных» (ЛПВП).

II. **Цель деятельности студентов на занятии:**

Студент должен знать:

1. Роль нарушения обмена холестерина для понимания патогенеза заболеваний.
2. Какие транспортные формы липидов существуют; разновидности липопротеинов и их липидный состав.
3. Липопротеины, транспортирующие холестерин - атерогенные и антиатерогенные.
4. Содержание холестерина в плазме крови в ЛПНП, ЛПВП в норме, гиперлипопротеинемии.
5. Теории развития атеросклероза.

Студент должен уметь:

1. Оценить изменение качественного и количественного со¬става липопротеинов в норме и при атеросклерозе.

III. **Содержание обучения.**

Основные вопросы:

1. Нормальные величины концентрации холестерина в плазме крови
2. Нарушение обмена холестерина (гиперхолестеринемии, холестериноз) - атеросклероз.
3. Липопротеины, как транспортные формы липидов. Основ¬ные классы липопротеинов.
4. Характеристика отдельных классов липопротеинов.
5. Метаболизм липопротеинов.
6. Типы гиперлипопротеинемий.
7. Изменение липопротеинового спектра плазмы крови при атеросклерозе. Теории развития атеросклероза.

VI. Перечень вопросов для проверки конечного уровня знаний.

1. Особенности распределения холестерина в животном организме.
2. Локализация холестерина в клетке, соотношение свободно¬го (НЭХС) и эстерифицированного (ЭХС).
3. Источники холестерина в организме человека (понятие об экзогенном и эндогенном холестерине).
4. Основные источники эндогенного холестерина.
5. В каких органах и тканях синтезируется холестерин?
6. Основные этапы биосинтеза холестерина.
7. Условия, необходимые для биосинтеза холестерина.
8. Мевалоновая кислота, ее роль в холестериногенезе.
9. ГМГ-КоА-редуктаза и регуляция синтеза холестерина.
10. Механизм действия лекарственных препаратов, подавляющих синтез холестерина.
11. Транспортные формы холестерина.
12. Пути катаболизма холестерина. Окисление холестерина в желчные кислоты и роль фермента 7 а-гидроксилазы в этом процессе.

13. Нарушения обмена холестерина, их причины.
14. Коэффициент атерогенности крови (КаК), его значение в норме и при атеросклерозе.
15. Методы определения холестерина в плазме крови.
16. Транспортные формы экзогенных липидов - хиломикроны, роль лимфы.
17. Транспортные формы липидов крови.
18. Липопротеины, их строение.
19. Характеристика апопротеинов.
20. Охарактеризуйте ЛПОНП, как основную транспортную форму ТАГ эндогенного происхождения.
21. Охарактеризуйте ЛПНП, как основную транспортную фор¬му холестерина.
22. Атерогенные липопротеины, их характеристика.
23. Антиатерогенные липопротеины, их характеристика.
24. Какова концентрация холестерина в плазме крови и в ЛПНП и ЛПВП в норме?
25. Назовите типы гиперлипопротеинемий.
26. Понятие о коэффициенте атерогенности.
27. Назовите факторы риска развития атеросклероза.
28. Какие теории возникновения атеросклероза вы знаете.

Тестовые задачи:

1. Атерогенными липопротеинами являются:
1) хиломикроны
2) ЛПОНП
3) ЛПНП
4) ЛПВП
5) 2,3
2. Антиатерогенными липопротеинами являются:
1) хиломикроны
2) ЛПОНП
3) ЛПНП
4) ЛПВП
5) 2,3
3. Хиломикроны являются основной транспортной формой :
1) ТАГ экзогенного происхождения
2) ТАГ эндогенного происхождения
3) холестерина
4) фосфолипидов
5) белка
6)
4. Какие из перечисленных функций выполняют ЛПВП:
1) холестеринакцепторная
2) задерживают пероксидацию ЛПНП
3) транспорт холестерина в клетку
4) транспорт ТАГ
5) всё вышеизложенное не верно
6) верно 3,4
5. Какие из перечисленных рецепторов участвуют в ката¬болизме ЛПНП:
1) Apo - CIII - рецепторы
2) Apo - AI - рецепторы
3) Apo - B100 - рецепторы
4) Apo - B48 - рецепторы
5) Apo - E - рецепторы
6) Apo - B100 E - рецепторы
6. Какое соединение тормозит синтез этих рецепторов?
1) холевая кислота;
2) холестерин;

3) жирные кислоты;
4) триацилглицерины;
5) все перечисленное выше не верно.

16. Холестерин синтезируется:
1) из бутирил КоА
2) из малонил КоА
3) из сукцинил КоА
4) из ацетил КоА
17. Синтез холестерина регулируется на уровне:
1) ГМГ КоА-синтетазы
2) ГМГ КоА-лиазы
3) ГМГ КоА-редуктазы
4) 7 а-гидроксилазы
18. Активность ГМГ КоА редуктазы регулируется:
1) Аллостерически по механизму ретроингибирования холестерином, поступающим в цитозоль клетки в составе ЛНП.
2) Фосфо- и дефосфорилированием.
3) Изменением количества ферментов.
4) Ассоциацией-диссоциацией субъединиц.
19. Холестерин является:
1) Компонентом клеточных мембран.
2) Предшественником витамина Д3
3) Предшественником желчных кислот.
4) Предшественником стероидных гормонов (половых и коры надпочечников).

Задача

Какой из путей использования холестерина будет усилен у пациентов, получающих препараты, уменьшающие всасывание желчных кислот из кишечника, а также у облученных животных в период восстановления?

Вопросы для педиатрического факультета:

1. Особенности обмена холестерина у новорожденных детей.

IX. Самостоятельная работа студента:

Класс	Липидный компонент в %				Белок в%	Основные белки
	ФЛ	ХС	ЭХС	ТАГ		
Хиломикроны ЛПОНП (пре- Р-ЛП) ЛПНП (Р-ЛП) ЛПВП (а-ЛП)						

X. **Список использованной литературы:**

Основная:

1. Т.Т. Березов, Б.Ф. Коровкин «Биологическая химия», Москва, 2007
2. Е.С. Северин «Биохимия», Москва 2003
3. Е.С. Северин «Биохимия с упражнениями и задачами», Москва 2010, «ГЭОТАР - медия»
4. Ф.С. Дзугкоева, Э.А. Каряева, А.Е. Гурина, Н.М. Амбарцумянц, С.Г.Дзугкоев «Биохимия основных процессов обмена веществ и гормональная регуляция» тестовые задания по курсу биологической химии, Владикавказ 2007
5. Ф.С. Дзугкоева, Э.А. Каряева, А.Е. Гурина, Н.М. Амбарцумянц, И.В. Можаева, С.Г. Дзугкоев, Е.А.Такоева «Руководство к практическим занятиям по биологической химии», в 4 т., Владикавказ 2008

Дополнительная:

1. Е.А.Строев. Биологическая химия, Москва 1986
2. Ленинджер Л. «Биохимия» Москва, 1976
3. Ленинджер Л. «Биохимия».1986
4. Е.С. Северин, Т.Л. Алейникова, Е.В. Осипов «Биохимия», Москва 2000
5. Гринстейн Б., Гринстейн А. Наглядная биохимия, Москва 2000
6. Элиот В., Элиот Д., Биохимия и молекулярная биология, Москва 2000, стр. 23-36
7. под ред. Д.М. Зубаирова, «Биохимия» тестовые вопросы, «ГЭОТАР - медия», 2008
8. У. Мак-Мюррей «Основы учения о взаимодействии биохимии с физиологией и патологией», 1980
9. Страйер Л. Биохимия. В 3-х томах. 1984 год
10. Досон и др. Справочник биохимика, 1991
11. Мусил Я., Новикова О., Кунц К. Современная биохимия в схемах, 2-е изд. 1984 год
12. Марри Р., Греннер Д., Мейес П. Биохимия человека
13. Николаев А. Я. Биологическая химия

Тема: Простагландины и лейкотриены, их структура, функции, патогенетическая роль.

I Научно-методическое обоснование темы:

Эйкозаноиды – это группа сигнальных молекул местного действия, которые синтезируются практически во всех дифференцированных клеток из полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК) с 20-ти углеродными атомами. Обладают коротким полупериодом жизни и действуют по аутокринному и паракринному механизму действия. ПНЖК включаются в состав фосфолипидов клеточных мембран, а далее под действием фосфолипазы A_2 и фосфолипазы С, которые активируются при поступлении сигнала на рецептор мембраны, высвобождается и идет на синтез эйкозаноидов.

В разных тканях арахидоновая и другие эйкозановые кислоты могут использоваться по трем основным направлениям:

1. Циклооксигеназный путь ведет и образованию тромбоксанов и тромбоксанов;
2. Липооксигеназа превращает арахидоновая кислота лейкотриены, липоксины и гидроксиэйкозатетраенофты (ГЭТЕ);
3. Система окисления с участием P_{450} ответственная за систез эпоксидов;

Классификация эйкозаноидов:

1. простагландины;
2. тромбоксаны;
3. лейкотриены и ряд других веществ, - высокоактивные регуляторы клеточных функций.

Функции эйкозаноидов:

1. регулируют тонус ГМК (влияние на АД);
2. регулируют состояние бронхов, кишечника, матки;
3. регулируют секрецию воды и натрия почками;
4. оказывают влияние на образование тромбов;
5. участвуют в развитии воспалительного процесса, происходящего после повреждения тканей или инфекции;
6. обуславливают развитие таких признаков воспаления, как боль, отёк, лихорадка;

Избыточная секреция эйкозаноидов приводит к ряду заболеваний, например, бронхиальной астме и аллергическим реакциям.

А. Субстраты для синтеза эйкозаноидов

Главный субстрат для синтеза эйкозаноидов у человека - арахидоновая кислота (20:4, ω-6), в меньшем количестве используются эйкозапентаеновая (20:5, ω-3) и эйкозатриеновая (20:3, ω-6) жирные кислоты. Полиеновые кислоты (ПНЖК) с 20 атомами углерода поступают в организм человека с пищей или образуются из незаменимых (эссенциальных) жирных кислот с 18 атомами углерода, также поступающими с пищей (рис. 1).

Эйкозаноиды действуют на клетки мишени через специфические мембранные рецепторы. Их присоединению к рецептору и включению аденилатциклазы или инозитолфосфатную систему, систему передачи сигнала, вызывают повышение внутриклеточной концентрации– цАМФ, цГМФ, $ИФ_3$,Ca^{2+}.

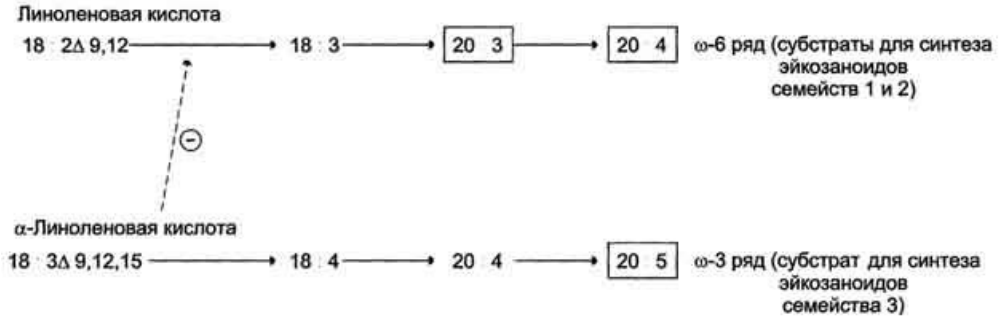


Рис.1.Синтез ПНЖК с 20 углеродными атомами в организме человека.

Простагландины впервые были выделены из предстательной железы, откуда и получили свое название. Позже было показано, что и другие ткани организма синтезируют простагландины и другие эйкозаноиды.

Б. Структура, номенклатура и биосинтез простагландинов и тромбоксанов

Номенклатура простагландинов в (рис.2.) включает следующие обозначения: PG и заглавные буквы А, Е, Д и т.д. указывает на характер заместителей в 5-членном кольце, а нижний индекс – число двойных связей в боковых радикалах.

Эйкозатриеновая кислота образует семейство PG с одной двойной связью между $C_{13} – C_{14}$ (PG E_1).

Арахидоновая – семейство простогландинов с двумя двойными связями в положениях C_5-C_6, C_{13}-C_{14} (PG E_2), а эйкозапентаеновая– семейство с тремя двойными связями (C_5-C_6, C_{13}-C_{14}, C_{17}-C_{18}) боковой цепи (PG E_3).

Основным общим представителем простогландинов и тромбоксанов из семейства арахидоновой кислоты является PG H_2, который синтезируется во всех тканях.

PG I - простациклины. Имеют 2 кольца в своей структуре: одно пятичленное, как и другие простагландины, а другое - с участием атома кислорода. Их также подразделяют в зависимости от количества двойных связей в радикалах (PG I_2, PG I_3).

Тромбоксаны. В отличие от простагландинов, тромбоксаны синтезируются только в тромбоцитах, откуда и происходит их название, и стимулируют их агрегацию при образовании тромба. Тромбоксаны имеют шестичленное кольцо, включающее атом кислорода (рис.3.). Так же, как и другие эйкозаноиды, тромбоксаны могут содержать различное число двойных связей в боковых цепях, образуя ТХ A_2, или ТХ A_3, отличающиеся по активности. ТХ B_2 - продукт катаболизма ТХ A_2 и активностью не обладает.

Циклооксигеназный путь: синтез простагландинов и тромбоксанов

Активация фосфолипаз. Синтез простагландинов начинается только после отделения полиеновых кислот от фосфолипида мембраны под действием ферментов (рис.4). Активация фосфолипаз, ассоциированных с мембранами, происходит под действием многих факторов: гормонов, гистамина, цитокинов, механического воздействия.

Связывание стимулирующего агента с рецептором может активировать или фосфолипазу A_2 или фосфолипазу С. Это зависит от типа клетки и типа рецепторов.

После отделения арахидоновой кислоты от фосфолипида она выходит в цитозоль и в различных типах клеток превращается в разные эйкозаноиды. В клетках имеется 2 основных пути превращения арахидоновой кислоты (рис.5.).

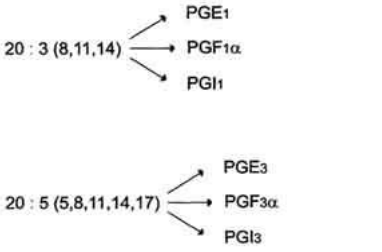


РИС. 2. СЕМЕЙСТВА ПРОСТАГЛАНДИНОВ.

РИС.3. СТРУКТУРА ТРОМБОКСАНОВ. **ТХ A_2 СИНТЕЗИРУЕТСЯ ИЗ АРАХИДОНОВОИ КИСЛОТЫ; ТХ A_3 СИНТЕЗИРУЕТСЯ ИЗ ЭЙКОЗАПЕНТАЁНОВ ОЙ КИСЛОТЫ.**

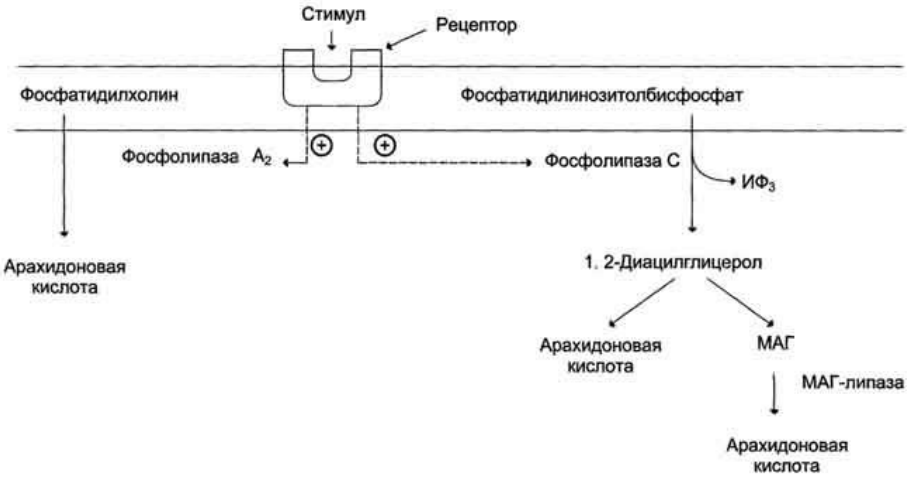


Рис.4. Отделение арахидоновои кислоты от глицерофосфолипидов. МАГ- моноацилглицерол; ИФ3- инозитолтри-фосфат.

Синтез простагландинов. Фермент, катализирующий первый этап синтеза простагландинов, называется PG H_2 синтазой и имеет 2 каталитических центра: циклооксигеназный, другой - пероксидазой; димер гликопротеинов, состоящий из идентичных полипептидных цепей; имеет гидрофобный домен, погружённый в липидный слой мембран ЭР, и каталитический домен, обращённый в полость ЭР. В а.ц. ЦОГ находится тирозин (385), в активном центре пероксидазы - простетическая группа - гем. В организме

имеются 2 типа ЦОГ (PG H_2 синтаз). Циклооксигеназа 1 - конститутивный фермент, синтезирующийся с постоянной скоростью. Синтез циклооксигеназы 2 увеличивается при воспалении и индуцируется соответствующими медиаторами - цитокинами.

Оба типа циклооксигеназ катализируют включение 4 атомов кислорода в арахидоновую кислоту и формирование пятичленного кольца. В результате образуется нестабильное гидропероксидпроизводное, называемое PG G_2. Гидропероксид у 15-го атома углерода быстро восстанавливается до гидроксильной группы пероксидазой с образованием PG H_2. До образования PG H_2 путь синтеза разных типов простагландинов одинаков. Дальнейшие превращения PG H_2 специфичны для каждого типа клеток.

Например, PG H_2 в клетках ГМК может быть восстановлен под действием PG E синтазы с образованием PG E_2 или под действием PG D синтазы с образованием PG D_2. В тромбоцитах содержится фермент тромбоксансинтаза, превращающий тот же исходный PG H_2 в ТХ A_2 обладающий сильным сосудосуживающим действием. В клетках эндотелия под действием фермента простациклинсинтазы из PG H_2 синтезируется PG I_2 (простациклин), имеющий сосудорасширяющее действие.

В. Структура и синтез лейкотриенов, ГЭТЕ, липоксинов

Лейкотриены участвуют в аллергических реакциях, липоксины вызывают хемотаксис и стимулируют продукцию супероксидных ионов в лейкоцитах, которые необходимы для разрушения частиц, попадающих в клетки в результате фагоцитоза.

Лейкотриены также образуются из эйкозаноевых кислот, однако в их структуре отсутствуют циклы, как у простагландинов, и они имеют 3 сопряжённые двойные связи, хотя общее число двойных связей в молекуле больше (рис.5). Лейкотриены C_4, D_4 и E_4 имеют заместители в виде трипептида глутатиона, дипептида глицилцистеина или цистеина, соответственно.

Липоксигеназный путь синтеза, приводящий к образованию большого количества разных эйкозаноидов, начинается с присоединения O_2 к одному из атомов углерода у двойной связи, с образованием гидропероксидов - гидропероксидэйкозатетраеноатов (ГПЭ-ТЕ). Далее гидропероксиды превращаются в соответствующие гидроксиэйкозатетроеноаты (ГЭТЕ).

Синтез лейкотриенов идёт по пути, отличному от пути синтеза простагландинов, и начинается с образования гидроксипероксидов - гидропероксидэйкозатетраеноатов (ГПЭТЕ). Эти вещества или восстанавливаются с образованием гидроксиэйкозатетроеноатов (ГЭТЕ) или превращаются в лейкотриены или липоксины. ГЭТЕ отличаются по положению гидроксильной группы у 5-го, 12-го или 15-го атома углерода, например: 5-ГЭТЕ, 12-ГЭТЕ.

LTC_4, $LTД_4$, LTE_4 – находятся в лейкоцитах, макрофагах, вызывают расширение сосудов увеличение их проинцаемостиявляеются компонентами «медленно реакгирующей» субстанции анафилаксии.Липоксигеназы действуют в 5-й, 12-й или 15-й позиции арахидоновой кислоты в зависимости от типа ткани. Например, в ПЯЛ содержится в основном 5-липоксигеназа, в тромбоцитах - 12-липоксигеназа, в эозинофилах - 15-липоксигеназа. В лейкоцитах и тучных клетках 5-ГПЭТЕ превращается в эпоксидлейкотриен А4 (LT A4), где нижний индекс 4 обозначает общее количество=связей. Наличие 3 сопряжённых =связей обусловливает название "лейкотриен".

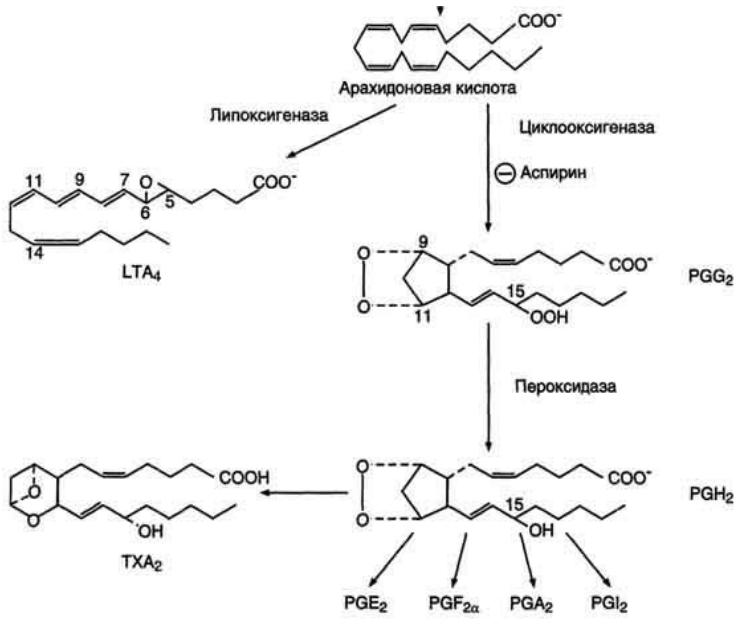
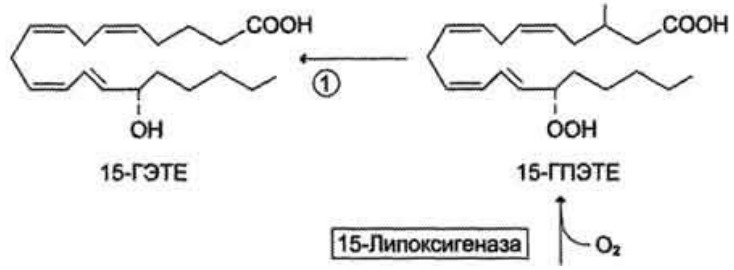


Рис. 5. Синтез эйкозаноидов из арахидоновои кислоты. Глюкокортикоиды ингибируют синтез всех типов эйкозаноидов, так как ингибируют фосфолипазу A_2, и таким образом уменьшают количество субстрата для их синтеза. Аспирин и другие противовоспалительные препараты нестероидного действия ингибируют только циклооксигеназный путь.

Другие типы лейкотриенов образуются из LT A_4. LT B_4 образуется под действием эпоксидгидролазы в лейкоцитах и клетках эпителия сосудов. Другой путь приводит к образованию группы лейкотриенов: LT C_4, LT D_4, LT E_4. Их синтез начинается с присоединения трипепти-да глутатиона к 6-му атому углерода с образованием LT C_4 в реакции, катализируемой глутатион-8-трансферазой. В следующей реакции удаляется глутамат, и LT D_4 содержит дипептид глицилцистеин. На последней стадии отщепляется глицин, и LT E_4 содержит только цистеин.

Липоксины (например, основной липоксин A_4) включают 4 сопряжённых двойных связи и 3 гидроксильных группы.

Синтез липоксинов начинается с действия на арахидоновую кислоту 15-липоксигеназы, затем происходит ряд реакций, приводящих к образованию липоксина A_4 (рис. 6.).



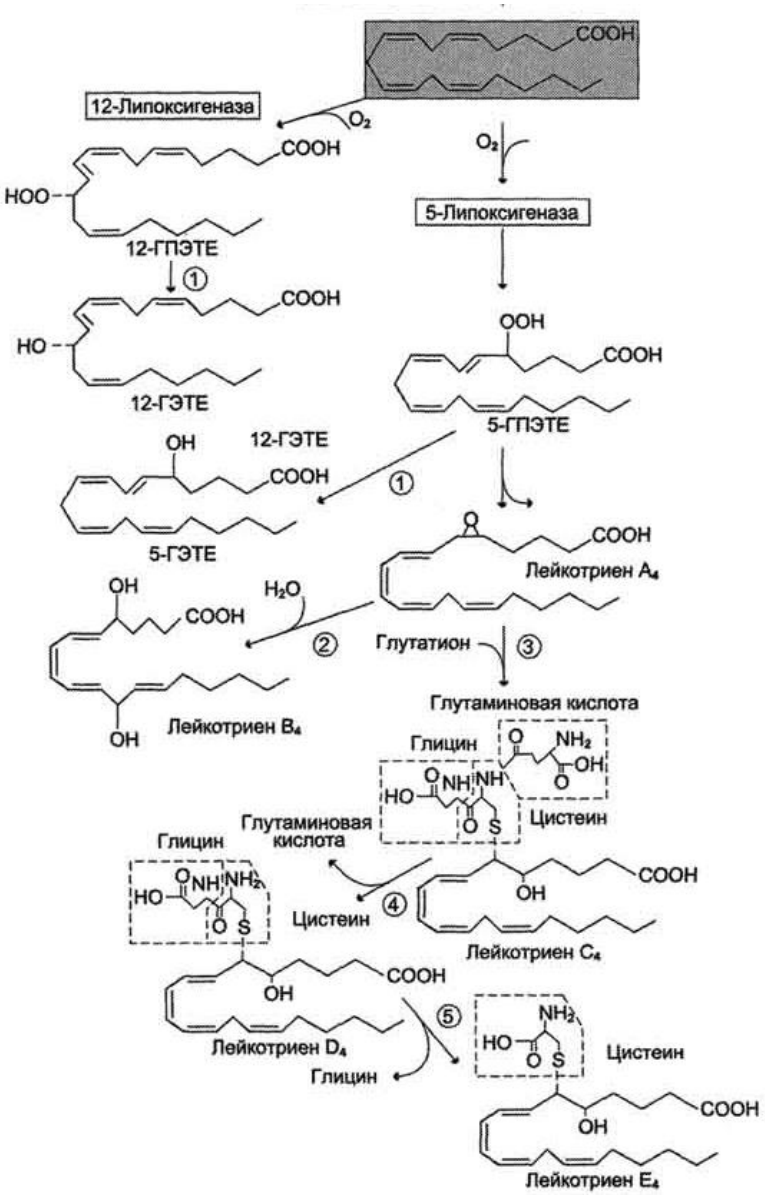


Рис. 8-49. Липоксигеназный путь синтеза эйкозаноидов.

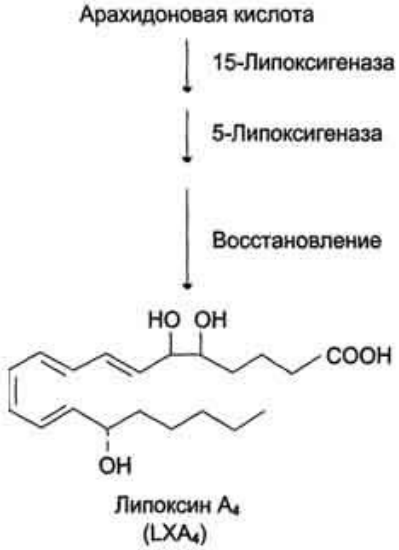


РИС. 6. СТРОЕНИЕ И СИНТЕЗ ЛИПОКСИНА A_4.

Эйкозаноиды - гормоны местного действия по ряду признаков:

- образуются в различных тканях и органах, а не только в эндокринных железах;
- действуют по аутокринному или паракринному механизмам;

- концентрация эйкозаноидов в крови меньше, чем необходимо, чтобы вызвать ответ в клетках-мишенях.

Только при некоторых патологических состояниях эйкозаноиды могут оказывать системное действие, если их концентрация в крови увеличивается до количеств, когда они могут оказать действие на ГМК всего органа, например, кишечника, лёгких, кровеносных сосудов.

Механизмы действия эйкозаноидов

Один и тот же тип эйкозаноида может действовать по паракринному и по аутокринному механизму. Например, ТХ A_2, продуцируемый тромбоцитами при их активации, действует на сами тромбоциты, увеличивая их способность к агрегации, ив то же время действует на окружающие ГМК кровеносных сосудов, способствуя их сокращению. Таким образом создаются условия для образования тромба и предотвращения кровотечения в области повреждения сосудов.

Эйкозаноиды действуют на клетки через специальные рецепторы. Некоторые рецепторы эйкозаноидов связаны с аденилатциклазной системой и протеинкиназой А - это рецепторы PGE, PG D, PC I. PG $F_2\alpha$, ТХ A_2 эндоперекиси (ГПЭТЕ) и лейкотриены действуют через механизмы, увеличивающие уровень кальция в цитозоле клеток-мишеней. Во многих клетках эйкозаноиды влияют на степень активации аденилатциклазной системы в ответ на действие других факторов, например, гормонов. В этих случаях эйкозаноиды влияют на конформацию G-белков в плазматической мембране клеток. Если эйкозаноид связывается со стимулирующими G_s-белками, то эффект основного стимулирующего агента увеличивается; если с G_i-ингибирующими - эффект снижается. Эйкозаноиды действуют на клетки почти всех тканей организма. Избыточная продукция эйкозаноидов наблюдается при многих заболеваниях.

Роль эйкозаноидов в развитии воспаления

Воспаление - реакция организма на повреждение или инфекцию, направленная на уничтожение инфекционного агента и восстановление повреждённых тканей. Продукция медиаторов воспаления - эйкозаноидов, гистамина, кининов (пептидных гормонов местного действия) - активируется каскадами реакций, запускающимися при внедрении инфекционных агентов или повреждении тканей. Фактором, лимитирующим скорость синтеза эйкозаноидов, служит освобождение жирной кислоты под действием фосфо-липазы A_2. Фосфолипаза A_2 связана с мембранами клеток и активируется многими факторами: гистамином, кининами, механическим воздействием на клетку, контактом комплекса антиген-антитело с поверхностью клетки. Активация фосфолипазы A_2 приводит к увеличению синтеза эйкозаноидов.

Многие эйкозаноиды выполняют функцию медиаторов воспаления и действуют на всех этапах воспаления. В результате увеличивается проницаемость капилляров, транссудат и лейкоциты проходят через сосудистую стенку. Лейкотриен B_4 и липоксин A_4 являются мощными факторами хемотаксиса; взаимодействуя с рецепторами, стимулируют движение лейкоцитов в область воспаления и секрецию ими лизосомальных ферментов и фагоцитоз чужеродных частиц.

Симптомы воспаления - покраснение, жар, отёк и боль. Покраснение и жар вызываются факторами, увеличивающими приток крови к месту повреждения. Отёк - результат увеличения притока жидкости из капилляров и движения клеток белой крови в область воспаления. Боль вызывается химическими компонентами (продуктами распада тканей, протонами) и сдавлением нервных окончаний. В развитии этих признаков воспаления участвуют разные типы эйкозаноидов (табл. 1).

Роль эйкозаноидов в тромбообразовании

Свёртывание крови можно рассматривать как процесс, который поддерживается в состоянии равновесия противодействующими системами: свёртывания и противосвёртывания. В условиях патологии или при действии фармакологических средств это равновесие может смещаться в ту или другую сторону. В норме клетки эндотелия сосудов продуцируют простациклин I_2, который препятствует агрегации тромбоцитов и сужению сосудов (рис. 7.).

Таблица 1. Характеристика биологического действия основных типов эйкозаноидов

Эйкозаноид	**Основное место синтеза**	**Основное биологическое действие**
PG E_2	Большинство тканей, особенно почки	Расслабляет гладкую мускулатуру, расширяет сосуды, инициирует родовую активность, подавляет миграцию лимфоцитов, пролиферацию Т-клеток.
PG $F_{2\alpha}$	Большинство тканей	Сокращает гладкую мускулатуру, суживает сосуды, бронхи, стимулирует сокращения матки.
PG D_3	Клетки гладкой мускулатуры	Вызывает расширение сосудов, снижает агрегацию тромбоцитов и лейкоцитов.

PG I_2	Сердце, клетки эндотелия сосудов	Уменьшает агрегацию тромбоцитов, расширяет сосуды. В клетках-мишенях увеличивает образование цАМФ.
ТХ A_2	Тромбоциты	Стимулирует агрегацию тромбоцитов, суживает сосуды и бронхи, в клетках уменьшает образование цАМФ.
ТХ A_3	Тромбоциты	Обладает функциями, одинаковыми с ТХ A_2, но значительно менее эффективен.
LT B_4	Клетки белой крови, клетки эпителия	Стимулирует хемотаксис и агрегацию лейкоцитов, освобождение лизосомальных ферментов лейкоцитов. Увеличивает проницаемость сосудов.
Группа лейкотриенов	Клетки белой крови, альвеолярные	Стимулируют расширение сосудов, увеличивают их проницаемость. Вызывают сокращение бронхов.
LTC_4→	макрофаги	Основные компоненты «медленно реагирующей
LT D_4→		субстанции» анафилаксии.
LTE_4→		
LXA_4	Лейкоциты	Активирует хемотаксис и стимулирует образование супероксид аниона в лейкоцитах.

При разрушении клеток эндотелия (например, в результате образования атеросклеротической бляшки) синтез PGI_2 снижается. Тромбоциты контактируют с повреждённой стенкой сосуда, в результате чего активируется фосфолипаза A_2. Это приводит к увеличению секреции ТХ A_2, стимулирующего агрегацию тромбоцитов и образование тромба в области повреждения сосуда (рис. 8), что часто приводит к развитию инфаркта.

При изучении факторов риска инфаркта миокарда было показано, что люди, потребляющие большое количество рыбьего жира, значительно меньше подвержены этому заболеванию, так как у них реже образуются тромбы в сосудах сердца. Оказалось, что на семейства эйкозаиоидов, синтезируемых в организме, влияет состав жирных кислот пищи (см. выше табл. 8-3). Если с пищей поступает больше эйкозапентаеновой кислоты (20:5, ю-3), в большом количестве содержащейся в рыбьем жире, то эта кислота включается преимущественно в фосфолипиды мембран (вместо арахидоновой) и после действия фосфодипазы A_2 служит основным субстратом для синтеза эйкозаноидов. Это имеет существенное влияние на свёртывание крови. При обычной диете с преобладанием арахидоновой кислоты (20:4, ω-6) над эйкозапентаеновой действие ТХ A_2 уравновешено действием PG I_2 (рис. 9.) и другими простагландинами. В случае диеты с преобладанием ω-3 кислот в клетках эндотелия образуются более сильные ингибиторы тромбообразования (PG I_3, PG E_3, PG D_3), что снижает риск образования тромба и развития инфаркта миокарда.

Инактивация эйкозаноидов

Все типы эйкозаноидов быстро инактивируются. $T_{1/2}$ эйкозаноидов составляет от нескольких секунд до нескольких минут. Простагландины инактивируются путём окисления гидроксильной группы в положении 15, важнейшей для их активности, до кетогруппы. Двойная связь в положении 13 восстанавливается. Затем происходит β-окисление боковой цепи, а после него - ω-окисление. Конечные продукты (дикарбоновые кислоты) выделяются с мочой. Активный ТХ A_2 быстро превращается в биологически неактивный IX B_2 путём разрыва кислородного мостика между 9-м и 11-м атомами углерода с образованием гидроксильных групп.

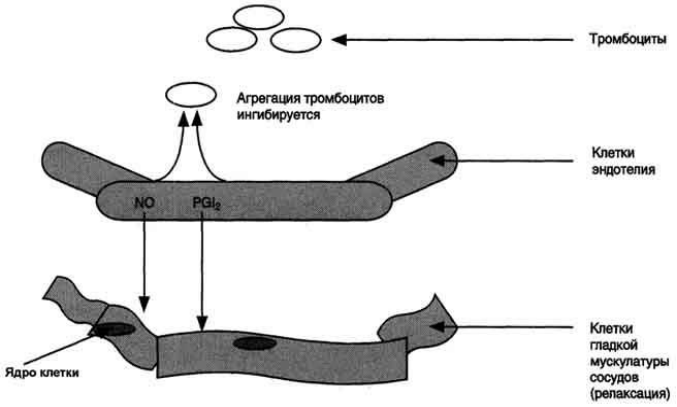


РИС. 7. РОЛЬ ПРОСТАЦИКЛИНОВ В РЕГУЛЯЦИИ ТОНУСА КЛЕТОК ГЛАДКОЙ МУСКУЛАТУРЫ СТЕНОК СОСУДОВ И АГРЕГАЦИИ ТРОМБОЦИТОВ. **В НОРМЕ КЛЕТКИ ЭНДОТЕЛИЯ ПРОДУЦИРУЮТ PG I_2, КОТОРЫЙ ВЫЗЫВАЕТ РЕЛАКСАЦИЮ ГМК И ИНГИБИРУЕТ АГРЕГАЦИЮ ТРОМБОЦИТОВ. ТРОМБОЦИТЫ В НЕАКТИВНОМ СОСТОЯНИИ НЕ ПРОДУЦИРУЮТ ТРОМБОКСАНЫ. NO (ОКСИД АЗОТА) - ВАЗОДИЛАТАТОР.**

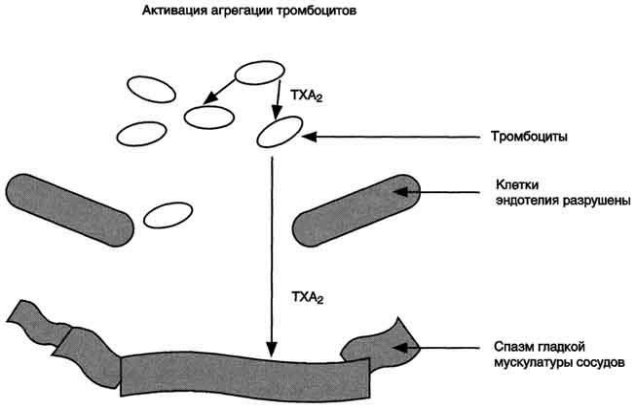


РИС. 8. НАРУШЕНИЕ СИНТЕЗА ЭЙКОЗАНОИДОВ В ОБЛАСТИ ПОВРЕЖДЕНИЯ ЭНДОТЕЛИЯ. **В ОБЛАСТИ ПОВРЕЖДЕНИЯ СТЕНКИ СОСУДА ПРЕОБЛАДАЕТ ДЕЙСТВИЕ ТХ A_2, СТИМУЛИРУЮЩЕГО АГРЕГАЦИЮ ТРОМБОЦИТОВ И СОКРАЩЕНИЕ СТЕНОК СОСУДА. В РЕЗУЛЬТАТЕ НА ПОВРЕЖДЁННОМ УЧАСТКЕ ОБРАЗУЕТСЯ ТРОМБ, ПРОИСХОДИТ РЕЗКОЕ СУЖЕНИЕ ПРОСВЕТА СОСУДА. В МИОКАРДЕ ЭТО МОЖЕТ ПРИВЕСТИ К РАЗВИТИЮ ИНФАРКТА МИОКАРДА.**

Лекарственные препараты -ингибиторы синтеза эйкозаноидов

Механизм действия аспирина и других противовоспалительных препаратов

Аспирин - препарат, подавляющий основные признаки воспаления. Механизм противовоспалительного действия аспирина стал понятен, когда обнаружили, что он ингибирует циклооксигеназу. Следовательно, он уменьшает синтез медиаторов воспаления и, таким образом, уменьшает воспалительную реакцию. Циклооксигеназа необратимо ингибируется путём ацетилирования серина в положении 530 в активном центре (рис. 10.). Однако эффект действия аспирина не очень продолжителен, так как экспрессия гена этого фермента не нарушается и продуцируются новые молекулы фермента. Другие нестероидные противовоспалительные препараты (например, ибупрофен и ацетаминофен) действуют по конкурентному механизму, связываясь в активном центре фермента, и также снижают синтез простагландинов.

Механизм действия стероидных противовоспалительных препаратов на синтез эйкозаноидов

Стероидные препараты обладают гораздо более сильным противовоспалительным действием, чем препараты нестероидного ряда. Механизм их действия заключается в индукции синтеза белков - липокортинов (или макрокортинов), которые ингибируют активность фосфолипазы A_2 и уменьшают синтез всех типов эйкозаноидов, так как препятствуют освобождению субстрата для синтеза эйкозаноидов - арахидоновой кислоты (или её аналога).

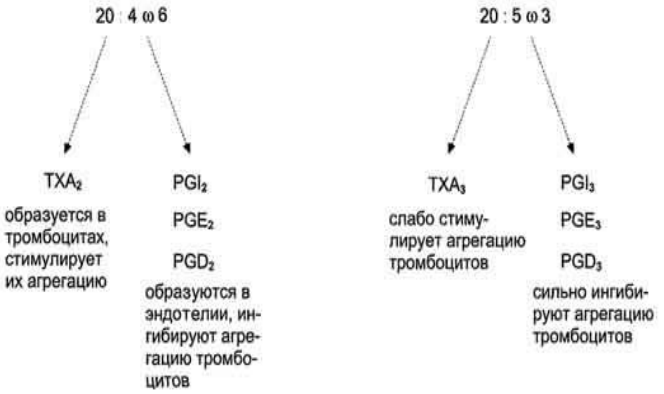


РИС. 9. СИНТЕЗ ТРОМБОКСАНОВ И ПРОСТАГЛАНДИНОВ ИЗ АРАХИДОНОВОЙ И ЭЙКОЗАПЕНТАЕНОВОЙ КИСЛОТ.

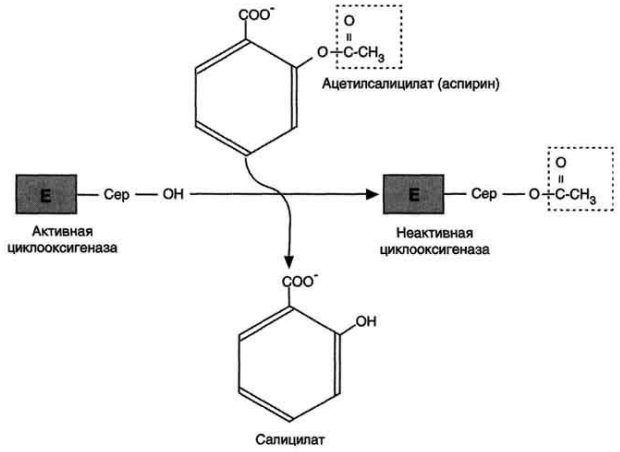


Рис. 10. Механизм инактивации циклооксигеназы аспирином. Ацетильный остаток переносится с молекулы асспприна на ОН-группу фермента и необратимо ингибирует его.

Использование стероидных противовоспалительных препаратов особенно важно для больных, страдающих бронхиальной астмой. Развитие симптомов этого заболевания (бронхоспазм и экссудация слизи в просвет бронхов) обусловлено, в частности, избыточной продукцией лейкотриенов тучными клетками, лейкоцитами и клетками эпителия бронхов. Приём аспирина у больных, имеющих изоформу липоксигеназы с высокой активностью, может вызвать приступ бронхиальной астмы. Причина "аспириновой" бронхиальной астмы заключается в том, что аспирин и другие нестероидные противовоспалительные препараты ингибируют только циклооксигеназный путь превращений арахидоновой кислоты и, таким образом, увеличивают доступность субстрата для действия липоксигеназы и, соответственно, синтеза лейкотриенов. Стероидные препараты ингибируют использование арахидоновой кислоты и по липоксигеназному и по циклооксигеназному пути, поэтому они не могут вызывать бронхоспазма.

Использование производных эйкозаноидов в качестве лекарств

Хотя действие всех типов эйкозаноидов до конца не изучено, имеются примеры успешного использования лекарств - аналогов эйкозаноидов для лечения различных заболеваний. Например, аналоги PG E_1 и PG E_2 подавляют секрецию соляной кислоты в желудке, блокируя гистаминовые рецепторы II типа в клетках слизистой оболочки желудка. Эти лекарства, известные как H_2-блокаторы, ускоряют заживление язв желудка и двенадцатиперстной кишки. Способность PG E_2 и PG $F_2\alpha$ стимулировать сокращение мускулатуры матки используют для стимуляции родовой деятельности.

II Цель деятельности студентов на занятии

Студент должен знать:

1. Определение эйкозаноидов;
2. В каких процессах участвуют эйкозаноиды;
3. Субстраты для синтеза эйкозаноидов;
4. Классификация эйкозаноидов;
5. Простогландины – особенности;
6. Тромбоксаны. Характеристика;
7. Циклооксигеназный путь синтеза (ЦОГ) простогландинов;
8. Липооксигеназный путь синтеза;
9. Механизм действия эйкозаноидов, основные эффекты;
10. Роль эйкозаноидов в развитии воспаления;
11. Роль эйкозаноидов в процессе тромбообразования;

12. Инактивация эйкозаноидов;
13. ЛС- ингибиторы синтеза эйкозаноидов;
14. Механизм действия НПВС и СПВС;
15. Использование производных эйкозаноидов в качестве ЛС.

Студент должен уметь:

1. написать структуры арахидоновой кислоты;
2. Написать синтез эйкозаноидов из арахидоновой кислоты.

IIIСодержание обучения:

Основные вопросы:

1. Эйкозаноиды, их функции, классификация;
2. Субстраты для синтеза эйкозаноидов;
3. Простогландины – особенности. Тромбоксаны. Характеристика;
4. Циклооксигеназный путь синтеза (ЦОГ) простогландинов и липооксигеназный путь синтеза;
5. Механизм действия эйкозаноидов, основные эффекты;
6. Роль эйкозаноидов в развитии воспаления и ромбообразования;
7. Инактивация эйкозаноидов;
8. ЛС- ингибиторы синтеза эйкозаноидов. Механизм действия НПВС и СПВС;
9. Использование производных эйкозаноидов в качестве ЛС;
10. Структуру арахидоновой кислоты. Синтез эйкозаноидов.

IV Перечень лабораторных работ, наглядных пособий и средств ТСО.

Наглядные пособия:

Таблицы названия

VI Перечень вопросов для проверки исходного уровня знаний:

1. Какие жирные кислоты бывают в природе;
2. Что мы называем ненасыщенными жирными кислотами, что насыщенными, а что полиненасыщенными (ПНЖК)?
3. Из каких жирных кислот осуществляется синтез эйкозаноидов: простогландинов, лейкотриенов и др.
4. Как выглядит структура жирных кислот;
5. В каких процессах участвуют жирные кислоты;
6. в состав, каких компонентов входят жирные кислоты в организме;
7. что значит эссенциальные жирные кислоты, что мы к ним относим?

VII Перечень вопросов для проверки конечного уровня знаний:

1. Определение эйкозаноидов;
2. В каких процессах участвуют эйкозаноиды;
3. Субстраты для ситеза эйкозаноидов;
4. Классификация эйкозаноидов;
5. Простогландины – особенности;
6. Тромбоксаны. Характеристика;
7. Циклооксигеназный путь синтеза (ЦОГ) простогландинов;
8. Липооксигеназный путь синтеза;
9. Механизм действия эйкозаноидов, основные эффекты;
10. Роль эйкозаноидов в развитии воспаления;
11. Роль эйкозаноидов в процессе тромбообразования;
12. Инактивация эйкозаноидов;
13. ЛС- ингибиторы синтеза эйкозаноидов;
14. Механизм действия НПВС и СПВС;
15. Использование производных эйкозаноидов в качестве ЛС.

IX Самостоятельная работа студентов:

Составить ментальную карту по теме: «Простагландины и лейкотриены, их структура, функции, патогенетическая роль»

Вопросы для самостоятельного обучения:

Составление тестов и кроссвордов по данной теме.

X Список используемой литературы:

Обязательная:

1. Е.С. Северин «Биохимия», Москва 2004, С.417-428;
2. Е.С. Северин «Биохимия с упражнениями и задачами», Москва 2008**;**

Дополнительная:

1. Конспект лекций;
2. Интернет ресурсы.

Тема: Детоксикационная функция печени. Биохимические методы определения ее функциональной недостаточности.

Печень является одним из важнейших органов человека. Печень – это фильтр, через который проходит практически вся кровь, которая имеется в нашем организме, а также настоящая фабрика, которая перерабатывает питательные и иные вещества, требуемые для нашей жизнедеятельности.

Функции печени человека

- Обезвреживание ксенобиотиков (чужеродных веществ), в частности ядов, токсинов, аллергенов, посредствам превращения их в менее токсичные, легко удаляемые и безвредные соединения.
- Обезвреживание и последующее удаление из организма избытка гормонов, витаминов, медиаторов, а также промежуточных и конечных токсичных продуктов обмена веществ. К примеру, фенола, аммиака, этанола, кетоновых кислот, ацетона.
- Участие в процессе пищеварения, а именно – обеспечение энергетических потребностей в глюкозе и конвертация разных источников энергии (аминокислоты, свободные жирные кислоты, глицерин, молочная кислота и т.д.) в глюкозу (глюконеогенез).
- Пополнение и сохранение энергетических быстро мобилизуемых резервов в виде депогликогена и контроль углеводного обмена.
- Пополнение и сохранение некоторых витаминов (в печени особенно велики запасы водорастворимого витамина B12 и жирорастворимых витаминов A и D), а также депокатионов некоторых микроэлементов – металлов, в частности катионов меди, кобальта и железа. Кроме того, печень принимает участие в метаболизме фолиевой кислоты и витаминов A, B, C, D, E, K, PP.
- Участие в процессе кроветворения (только у плода). В том числе синтез множества белков плазмы крови – альфа- и бетаглобулинов, альбуминов, транспортных белков для разных витаминов и гормонов, белков противосвёртывающей и свертывающей систем крови и множества других. Печень – один из важнейших органов гемопоэза в пренатальном развитии.
- Синтез эфиров холестерина и его самого, фосфолипидов и липидов, липопротеидов, контроль липидного обмена.
- Синтез билирубина и желчных кислот, секреция и продукция желчи.
- Печень является местом хранения большого объема крови, который выбрасывается в сосудистое русло в случае кровопотери или шоке из-за сужения сосудов, которые снабжают печень кровью.
- Синтез ферментов и гормонов, которые активно участвуют в преобразовании еды в 12-перстной кишке и других отделах тонкого кишечника.
- печень у плода выполняет кроветворные функции. У печени плода дезинтоксикационная функция незначительна, потому что ей занимается плацента.

Функция печени – очищение от токсинов

Через печень за час проходит порядка 100 литров крови. Печень производит белковый, углеводный, жировой обмен, запасает минералы и витамины впрок, синтез, расщепление гормонов, образование эритроцитов.

Детоксикационная функция печени

Основная функция печени – детоксикация. Печень выступает в роли губки, которая пропускает через себя все, что в наш организм попало. Она фильтрует эти вещества на вредные и полезные, после чего нейтрализует яды.

В последние годы атака токсинов на организм человека возросла в несколько раз, поэтому печень зачастую со своими обязанностями справиться не может. Поэтому сегодня заболевания печени – это не редкость.

Специалисты подсчитали, что взрослый человек ежегодно употребляет порядка 4 л пестицидов, которые содержаться сегодня во фруктах и овощах, а также более 5 кг консервантов, различных пищевых добавок, а также 2 кг твердых вредных веществ, которые нам приходится вдыхать через легкие. Это крайне тяжелый груз для печени, которой с каждым днем необходимо работать все больше и больше.

Анатомическое расположение печени на пути кровотока, который несет питательные и другие вещества из пищеварительного тракта, особенности кровоснабжения, строения, лимфообращения, специфика функций клеток печени определяют функции печени. Ранее была описана желчевыводящая функция, но она далеко не единственная.

Барьерная функция печени

Очень важна барьерная функция органа, которая состоит в обезвреживании ядов и токсинов, поступивших в организм с пищей или сформировавшихся в кишечнике из-за деятельности его микрофлоры, лекарственных препаратов, которые всосались в кровь и были принесены в печень. Химические вещества печень обезвреживает за счет их ферментного окисления, метилирования, восстановления, гидролиза (первая фаза),

ацетилирования и дальнейшей конъюгации с некоторыми веществами (уксусной, серной и глюкуроновой кислотами, таурином, глицином и другими) – вторая фаза. Но не все вещества обезвреживаются в 2 фазы: многие – только в одну или без каких-либо изменений выводятся в составе желчи и мочи, в особенности растворимые конъюгаты. Токсичный аммиак нейтрализуется с помощью образования креатинина и мочевины. Микроорганизмы могут быть обезврежены за счет их лизиса и фагоцитоза.

Печень участвует в инактивации некоторых гормонов (альдостерон, глюкокортикоиды, эстрогены, андрогены, глюкагон, гастроинтестинальные гормоны) и биогенных аминов (катехоламины, серотонин, гистамин).

Экскреторная функция выражается в выделении в составе желчи из крови большого количества веществ, которые обычно трансформируются в печени, что делает ее участником обеспечения гомеостаза.

Функции печени в пищеварении

Печень принимает участие в обмене белков: происходит синтез белков крови (85% глобулинов, 95% альбуминов, весь фибриноген), осуществляется переаминирование и дезаминирование аминокислот, образование креатина, мочевины, глутамина, факторов фибринолиза (антиплазмин, антитромбин, 1, II, V, VII, IX, X, XII, XIII) и свертывания крови. Желчные кислоты оказывают влияние на транспортные свойства кровяных белков.

Печень работает с обменом липидов: в их всасывании и гидролизе, синтезе триглицеридов, холестерина, фосфолипидов, желчных кислот, липопротеидов, ацетоновых тел, окислении триглицеридов. Роль печени велика в обмене углеводов: в этом случае происходят процессы гликогенолиза, гликогенеза, включение в обмен галактозы, фруктозы, глюкозы, продукция глюкуроновой кислоты.

Участвует печень и в эритрокинетике, в частности в разрушении эритроцитов с последующим образованием билирубина.

Роль печень очень важна в обмене витаминов (особенно жирорастворимых A, E, K, D), в кишечнике всасывание которых происходит при участии желчи. Некоторые витамины в печени депонируются и высвобождаются по мере их потребности (A, C, K, D, PP). В печени депонируются и микроэлементы (медь, железо, кобальт, молибден, марганец и т.п.) и электролиты. Орган участвует в иммунологических реакциях и иммунопоэзе.

Выше мы упоминали про кишечно-печеночную циркуляцию желчных кислот. Крайне важно их участие не только во всасывании липидов и гидролизе, но и иных процессах. Желчные кислоты – это регуляторы холереза и выделения холестерина в составе желчи, желчных пигментов, активности цитоферментов печени. Также они оказывают влияние на транспортную активность энтероцитов, ресинтез триглицеридов в них, контролируют пролиферацию, отторжение и передвижение энтероцитов с кишечных ворсинок.

Желчное регуляторное влияние распространяется на секрецию поджелудочной железы, желудка, тонкой кишки, эвакуаторную работу гастродуоденального комплекса, реактивность органов пищеварения в отношении к нейротрансмиттерам, регуляторным аминами и пептидам, моторику кишечника.

Желчные кислоты, циркулирующие с кровью, оказывают влияние на множество физиологических процессов: при увеличении концентрации в крови желчных кислот, будут угнетаться физиологические процессы – в этом и проявляется токсическое воздействие желчных кислот. Их нормальное содержание в крови стимулирует и поддерживает биохимические и физиологические процессы.

Биохимические исследования.

Биохимические исследования играют важную роль в диагностике и определении тяжести, прогноза и течения заболеваний печени. В большинстве случаев эта оценка становится возможной не по результатам отдельного теста, а на основании интерпретации данных, полученных при применении нескольких тестов. Для более удобной оценки целесообразно сгруппировать применяемые тесты в зависимости от исследуемой функции печени. С помощью биохимических тестов можно охарактеризовать:

- целостность гепатоцитов;
- экскрецию желчи;

● синтетическую функцию печени;

● другие специальные функции.

Оценка целостности гепатоцитов, нарушения которой в легких случаях проявляются повышенной проницаемостью клеточной мембраны, а в тяжелых случаях - некрозом клеток, проводится на основании обнаружения ферментов печеночных клеток в плазме крови. Чаще всего с этой целью используют определение активности трансаминаз - аспартатаминотрансферазы (АсАТ) и аланинаминотрансферазы (АлАТ). Чувствительность трансаминаз является высокой. Глутаматдегидрогеназа (ГЛДГ) содержится исключительно в митохондриях и характеризуется наибольшей активностью в перивенозных гепатоцитах ацинуса. Это объясняет, почему наибольший подъем активности данного фермента отмечается при венозном застое в печени и при шоке. Для оценки экскреции желчи применяется прежде всего определение активности щелочной фосфатазы (ЩФ) и гамма - глутамилтранспептидазы (ГГТП). Увеличение активности этих ферментов в плазме крови при холестазе объясняется их усиленным освобождением из каналикулярных мембран гепатоцитов и их повышенным синтезом. Повышение активности ГГТП не считается специфичным для холестаза, поскольку может встречаться также при нарушении целостности гепатоцитов. Этот фермент является в настоящее время наиболее чувствительным клинико-биохимическим маркером заболеваний гепатобилиарной системы; его повышение наступает сравнительно рано и бывает очень выраженным при алкогольном поражении печени.

Гипербилирубинемии как симптом холестаза характеризуются достаточно низкой чувствительностью и специфичностью. Однако определение фракций билирубина имеет важное дифференциально - диагностическое значение, поскольку позволяет разграничить конъюгированную и неконъюгированную гипербилирубинемию. Исследование уровня билирубина помогает также в оценке прогноза при некоторых хронических заболеваниях печени.

Для оценки синтетической функции печени применяется в первую очередь исследование уровня факторов свертывания крови, которые вырабатываются только в печени и имеют короткий период полураспада в плазме (например, фактор VII). Чаще всего определяется протромбиновое время по Квику, которое зависит от факторов свертывания I, II, V, VII и X, синтезируемых в печени. Поскольку для некоторых из этих факторов (II, VII и X) необходимо еще и присутствие витамина К, увеличение протромбинового времени может обусловливаться не только снижением синтетической функции печени, но и уменьшением всасывания витамина К вследствие холестаза. Активность холинэстеразы в сыворотке также отражает состояние синтетической функции печени. Этот фермент вырабатывается в печени, время его полураспада в крови составляет около 10 дней. Напротив, определение уровня альбумина в плазме как показателя, отражающего сниженную синтетическую функцию печени, характеризуется достаточно низкими чувствительностью и специфичностью. Хотя альбумин вырабатывается исключительно в печени, ее резервные способности в этом плане настолько высоки, что уровень альбумина в плазме начинает снижаться только при выраженном поражении паренхимы печени. Кроме того, снижение синтеза альбумина может компенсироваться уменьшением его распада. Другими причинами, приводящими к гипоальбуминемии, могут служить заболевания, сопровождающиеся синдромом мальабсорбции.

Клинико-биохимические методы оценки специальных функций печени применяются с целью диагностики определенных заболеваний. Так, поликлональная гипергаммаглобулинемия индуцируется при хронических заболеваниях печени антигенами желудочно-кишечного тракта, которые в результате сниженной функции печени или вследствие формирования портокавальных анастомозов недостаточно

удаляются из крови. Эти антигены стимулируют образование антител плазматическими клетками, происходящими из В-лимфоцитов.

Наличие фиброза можно установить, определив уровень в сыворотке пептида проколлагена типа III.

Таблица 2.

Биохимические показатели при заболеваниях печени

Показатель	**Референсные значения**	**Диагностическая ценность**
Общий билирубин	5-21 мкмоль/л*	Выявление желтухи, оценка тяжести
Связанный билирубин	0,0-5,1 мкмоль/л	Болезнь Жильбера, гемолиз
Щелочная фосфатаза	98-280 МЕ/л	Диагностика холестаза, инфильтрации печени
АсАТ	0-37 МЕ/л	Ранняя диагностика печёночно-клеточного поражения, контроль за динамикой заболевания
АлАТ	0-40 МЕ/л	При алкоголизме активность АлАТ ниже, чем активность АсАТ
ГГТП	10-61 МЕ/л	Диагностика алкогольного поражения и билиарного холестаза
Альбумин	35-50 г/л	Оценка тяжести поражения печени
γ-Глобулин	5-15 г/л	Диагностика хронического гепатита и цирроза, контроль за динамикой заболевания
Протромбиновое время	12-16 с	Оценка тяжести поражения печени

При холестазе повышается уровень общего и свободного ХС в сыворотке. Механизм этого повышения неизвестен. По-видимому, в повышении уровня холестерина в сыворотке участвуют 4 фактора: заброс ХС из жёлчи в кровоток, повышение образования ХС в печени, снижение активности ЛХАТ, регургитация содержащегося в жёлчи лецитина, что способствует переходу в плазму тканевого холестерина. В то время как при остром холестазе иногда отмечается незначительное (в 1,5-2 раза) повышение уровня ХС, при хронических заболеваниях, особенно при послеоперационных стриктурах и первичном билиарном циррозе, этот показатель достигает очень больших значений. Недостаточное питание приводит к снижению уровня ХС в сыворотке, что объясняет нормальное содержание ХС у части больных с механической обструкцией жёлчных путей злокачественной опухолью.

Содержание эфиров ХС при холестазе снижается вследствие дефицита ЛХАТ. Уровень ТАГ повышается. В сыворотке выявляется аномальный липопротеин, который содержит большое количество свободного ХС и лецитина. Изменения эритроцитов при холестазе связаны с нарушением содержания ХС и ЛП.

Гепато-целлюлярное поражение. При повреждении гепатоцитов уровень ТАГ в сыворотке повышается в связи с накоплением ЛПНП, которые богаты ТАГ. Концентрация эфиров ХС снижена вследствие низкой активности фермента ЛХАТ. При циррозе печени уровень общего ХС в сыворотке обычно нормальный. Его снижение свидетельствует о нарушении питания или декомпенсации цирроза. При жировой печени алкогольной этиологии наряду с увеличением содержания ТАГ повышается уровень ЛПОНП. При поражении печени гепатотоксичными препаратами нарушение синтеза апопротеинов приводит к нарушению выведения ТАГ с ЛПОНП и развитию в последующем жирового перерождения.

Основные синдромы при заболеваниях печени.

Различают следующие основные синдромы:

1. Цитолитический синдром (цитолиз) возникает вследствие нарушения структуры клеток печени, увеличения проницаемости мембран, как правило, за счет усиления процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) и выхода ферментов в кровь. При цитолитическом синдроме в кровь попадают как цитоплазматические, так и митохондриальные компонены ферментов, однако основной уровень активности

определяют цитоплазматические изоферменты. Цитолиз сопровождает, в основном, острые заболевания печени и увеличивается при обострении хронических. Выделяют следующие основные механизмы цитолиза:

1. токсический цитолиз (вирусный, алкогольный, лекарственный);
2. иммунный цитолиз, в т.ч. аутоиммунный;
3. гидростатический;
4. гипоксический (“шоковая печень” и др.);
5. опухолевый цитолиз;
6. цитолиз, связанный с недостатком питания и неполноценностью пищи.

Основными доступными маркерами цитолиза при остром гепатите являются аланиновая (АлАТ) и аспарагиновая (АсАТ) трансаминазы, гамма-глутамилтранспептидаза (ГГТП), лактатдегидрогеназа (ЛДГ).

Повышение активности АлАТ и АсАТ наблюдается у 88-97% пациентов в зависимости от вида гепатита. Максимум активности характерен для 2-3-ей недели заболевания, и возвращение к норме на 5-6 неделе. Превышение сроков нормализации активности является неблагоприятным фактором. Активность АлАТ > АсАТ, что связано с распределением АсАТ между цитоплазмой и митохондриями. Преимущественное повышение АсАТ связано с повреждением митохондрий и наблюдается при более тяжелых повреждениях печени, особенно алкогольных. Активность трансаминаз повышается умеренно (в 2-5 раз) при хронических заболеваниях печени, чаще в фазе обострения, и опухолях печени. Для циррозов печени повышение активности трансаминаз, как правило, не характерно.

АсАТ повышается при остром гепатите и других тяжелых поражениях гепатоцитов. Умеренное увеличение наблюдается при механической желтухе, у больных с метастазами в печень и циррозом. *Коэффициент де Ритиса*, то есть отношение АсАТ/АлАТ(в норме равен 1,33) при заболеваниях печени ниже этой величины, а при заболеваниях сердца - выше.

Уровень активности аланинаминтрансферазы (АлАТ) в норме 7-41 МЕ\л.

При заболеваниях печени в первую очередь и наиболее значительно по сравнению с АсАТ изменяется активность АлАТ. При остром гепатите, независимо от его этиологии, активность аминотрансфераз повышается у всех больных. Особенно изменяется активность АлАТ, содержащейся в цитоплазме, что способствует быстрому выходу ее из клетки и поступлению в кровяное русло, поэтому АлАТ является более чувствительным тестом ранней диагностики острого гепатита, чем АсАТ. Период полураспада около 20 часов, реагирует на более тяжелые повреждения гепатоцита. При остром вирусном гепатите АлАТ и АсАТ повышаются за 10-15 дней до появления желтухе при гепатите А, и за много недель при гепатите В, причем повышаются они одновременно, но АлАТ - значительно больше. При типичном течении вирусного гепатита активность АлАТ достигает максимума на 2-3 неделе заболевания. При благоприятном его течении активность АлАТ нормализуется через 30-40 суток, активность АсАТ - через 25-35 суток. Повторное или прогрессирующее повышение активности аминотрансфераз свидетельствует о новом некрозе или рецидиве болезни. Удлинение периода повышенной активности аминотрансфераз часто является неблагоприятным признаком, т.к. может свидетельствовать о переходе острого процесса в хронический.

Для хронических гепатитов характерна умеренная и средняя гиперферментемия.

При латентных формах цирроза печени активность фермента, как правило, не повышена. При активных формах стойкий, хотя и незначительный, подъем активности аминотрансфераз встречается в 74-77% случаев.

Повышение активности АлАТ и АсАТ может быть выявлено и у практически здоровых носителей поверхностного антигена гепатита В, что указывает на наличие внешне бессимптомных активных процессов в печени.

*Гамма-глутамилтранспептидаза (*ГГТ, ГГТП, γ-ГТ) содержится в цитоплазме (низкомолекулярная изоформа) и связана с мембранами билиарного полюса (высокомолекулярная изоформа). Повышение ее активности может быть связано с цитолизом, холестазом, интоксикацией алкоголем или лекарствами, опухолевым ростом, поэтому повышение активности ГГТП не является специфическим для того или иного заболевания, но в определенной мере универсальным или скрининговым для заболеваний печени, хотя предполагает дополнительные поиски причины заболевания. Фермент более чувствителен к нарушениям в клетках печени, АлАТ, АсАТ, щелочная фосфатаза, сукцинатдегидрогеназа, глютаматдегидрогназа и т.д.

Лактатдегидрогеназа (ЛДГ) повышается при многих заболеваниях. Диагностическое значение суммарной активности невелико и ограничивается определением для исключения опухолевого и гемолитического процессов, а также для дифференциальной диагностики синдрома Жильбера (нормальная) и хронического гемолиза (повышена). Для диагностики заболеваний печени более значима оценка печеночного изофермента ЛДГ - $ЛДГ_5$.

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 вследствие вторичных повреждений печени.

При карциномах печени или метастазах рака в печень может иметь место подъем активности ЛДГ.

2. Холестатический синдром (холестаз) характеризуется нарушением секреции желчи. Некоторые авторы выделяют редкую безжелтушную форму холестаза, связанную с изменением нормальных соотношений компонентов желчи (гормональные сдвиги, нарушения кишечно-печеночной циркуляции холестерина). Выделяют внутрипеченочной холестаз, связанный с нарушением секреции желчи гепатоцитом или нарушением формирования желчи в желчных ходах, и внепеченочный холестаз, обусловленный обтурацией желчных протоков камнем, опухолью, или введением лекарств, вызывающих холестаз. При холестазе в плазму крови попадают и накапливаются вещества, которые у здоровых людей выводятся с желчью, а также повышается активность так называемых индикаторных ферментов холестаза. Типичная желтушная форма холестаза характеризуется кожным зудом и желтухой.

При холестазе повышается содержание желчных кислот; билирубина с преимущественным увеличением конъюгированного, входящего в состав желчи (холебилирубина); холестерина и β - липопротеидов; активности ферментов ЩФ, ГГТП, 5-нуклеотидазы.

Щелочная фосфатаза (ЩФ) проявляет свою активность при pH 9-10, содержится в печени, кишечнике, костной ткани, однако главным выделительным органом является печень. В гепатоците ЩФ связана с мембранами билиарного полюса и микроворсинками эпителия желчных ходов. Причинами гиперферментемии являются задержка выведения фермента в желчь и индукция синтеза фермента, зависящая от блока кишечно-печеночной циркуляции. Повышение активности при заболеваниях печени чаще всего указывает на холестаз, при котором активность фермента повышается на 4-10 день до 3-х и более раз, а также на опухоли печени. При повышении активности ЩФ следует проводить

дифференциальную диагностику с заболеваниями костей.

5-нуклеотидаза относится к группе щелочных фосфатаз, изменяется параллельно с ними, но повышение ее активности связано исключительно с холестазом.

ГГТП также является мембраносвязанным ферментом и при холестазе повышается за счет активации синтеза. Исследование ГГТП при холестазе считается обязательным.

Нарушение экскреции желчи приводит к нарушению эмульгирования жиров и снижению всасывания жирорастворимых веществ в кишечнике, в том числе витамина К. Снижение содержания витамина К в организме приводит к уменьшению синтеза витамин-К-зависимых факторов свертывания крови и снижению протромбинового индекса **(ПТИ).**

3. Гепатодепрессивный синдром включает любые нарушения функции печени, не сопровождающиеся энцефалопатией. Синдром наблюдается при многих заболеваниях печени, но наиболее выражен при хронических процессах. Наименее устойчивой при заболеваниях печени является синтетическая функция, и в первую очередь снижается синтез тех веществ, которые образуются преимущественно в печени. Доступными и информативными индикаторами гепатодепресии могут быть следующие:

1. *Альбумин* практически полностью синтезируется печенью. Снижение его концентрации наблюдается у половины больных с острыми и у 80-90% больных с ХАГ и циррозом печени. Развивается гипоальбуминемия постепенно, результатом может быть снижение онкотического давления крови и отеки, а также снижение связывания гидрофобных и амфифильных соединений эндогенной и экзогенной природы (билирубина, свободных жирных кислот, лекарств и др.), что может вызвать явления интоксикации. Информативно параллельное определение альбумина и общего белка. Снижение альбумина до 30 г/л и менее свидетельствует о хронизации процесса.

2. *α1-Антитрипсин* - гликопротеид, составляющий 80-90% фракции α_1-глобулинов, белок острой фазы, синтезируется в печени, является чувствительным индикатором воспаления паренхиматозных клеток. Исключительное диагностическое значение связано с врожденной недостаточностью белка, приводящей к тяжелым формам поражения печени и других органов у детей.

3. *Холинэстераза (*псевдохолинэстераза, бутирилхолинэстераза - ХЭ, БХЭ) сыворотки крови, синтезируется печенью, относится к β_2-глобулинам. При хронических процессах, особенно циррозе печени, активность фермента снижается, причем степень снижения имеет прогностическое значение. Другая причина снижения активности - отравление фосфорорганическими соединениями.

4. *Фибриноген*, I фактор свертывания крови, белок острой фазы, относится к β_2-глобулинам. Уровень фибриногена закономерно снижается при тяжелых хронических и острых заболеваниях печени.

5. *ПТИ* снижается в связи с нарушением синтеза витамин К-зависимых факторов свертывания крови (II, VII, IX, X). В отличие от холестаза, уровень ПТИ не нормализуется при внутримышечном введении витамина К. ПТИ является маркером тяжести острой дисфункции печени.

6. *Холестерин* в крови снижается у больных с хроническим гепатитом и циррозом печени, чаще при подостром варианте течения. При жировой дистрофии печени уровень холестерина может повышаться.

Для хронических заболеваний печени в стадии компенсации нехарактерно повышение активности ферментов. Однако умеренное повышение (в 1,5 - 3 раза) активности трансаминаз с более высоким уровнем АсАТ свидетельствует о повреждении субклеточных структур, в частности, митохондрий.

4. Мезенхимально-воспалительный синдром обусловлен повреждением мезенхимы и стромы печени, является иммунным ответом на антигенную стимуляцию кишечного происхождения. Данный

синдром сопровождает как острые, так и хронические заболевания печени. Маркерами синдрома являются γ-глобулины, иммуноглобулины, тимоловая проба, антитела к клеточным элементам и др.

Определение *γ-глобулинов* относится к обязательным тестам для печени. Подъем γ-глобулинов, по сути являющихся иммуноглобулинами, характерен для большинства заболеваний печени, но наиболее выражен при ХАГ и циррозе печени. В последнее время показано, что γ-глобулины могут вырабатываться купферовскими клетками и плазматическими клетками воспалительных инфильтратов печени. При циррозах печени на фоне низкой концентрации альбумина из-за нарушения синтетической функции печени наблюдается значительный рост γ-глобулинов, при этом концентрация общего белка может оставаться нормальной или повышенной.

Иммуноглобулины (Ig) представляют собой белки, входящие во фракцию γ-глобулинов и обладающие свойствами антител. Известно 5 основных классов Ig: IgA, IgM, IgG, IgD, IgE, однако для диагностики используются первые три. При хронических заболеваниях печени увеличивается содержание всех классов Ig, однако наиболее выражен рост IgM. При алкогольных поражениях печени наблюдается повышение IgA.

Тимоловая проба - неспецифичный, но доступный метод исследования, результат которого зависит от содержания IgM, IgG и липопротеидов в сыворотке крови. Проба бывает положительной у 70-80% больных острым вирусным гепатитом в первые 5 дней желтушного периода, у 70-80% больных с ХАГ, у 60% - с циррозом печени. Проба нормальна при механической желтухе у 95% пациентов.

Антитела к тканевым и клеточным антигенам (нуклеарные, гладкомышечные, митохондриальные) позволяют выявить аутоиммунные компоненты при заболеваниях печени.

Таблица 7.

Синдромы при заболеваниях печени

Синдром	Биохимические показатели
1.Цитолиз некроз	АлАТ↑, АсАТ↑, ЛДГ↑, ГГТП↑ АСТ↑, ГлДГ↑, $ЛДГ_5$↑
2.Холестаз	желчные кислоты↑, ЩФ↑, ГГТП↑, билирубин ↑, холестерин ↑, ПТИ ↓
3.Гепатодепрессия	альбумин↓, холестерин↓, фибриноген ↓, ПТИ↓, ХЭ↓, (снижение синтетической функции), АсАТ>АлАТ
4.Мезенхимально-воспалительный	γ-глобулины (Ig)↑, тимоловая проба: отрицат., - холестаз (95%) + о.гепатит (80%), ХАГ (80%), цирроз (60%)
5.Печеночная недостаточность	NH_3↑, фенолы↑, циклические аминокислоты↑, жирные кислоты с короткой цепью↑(масляная, валериановая, капроновая), синтетическая функция снижена)

5. Печеночная недостаточность обусловлена нарушением основных функций печени, а также поступлением в кровяное русло, минуя печень, токсических веществ из кишечника с последующим развитием энцефалопатии. К индикаторам шунтирования печени относятся аммиак и его производные, фенолы, циклические аминокислоты, жирные кислоты с короткой цепью.

Аммиак образуется при дезаминировании аминокислот и является исключительно токсичным для мозга соединением. Нейтрализация аммиака осуществляется печенью путем его превращения в мочевину.

Фенолы, представляющие собой циклические гидрофобные соединения, токсичные для мозга, резко повышаются при печеночной коме.

Циклические аминокислоты (тирозин, фенилаланин, триптофан) повышаются при тяжелых поражениях печени. У здоровых людей общий уровень аминокислот, а также соотношение их различных видов, поддерживает печень. При отсутствии регулирующей функции печени количество аминокислот непропорционально меняется, и некоторые из них, находясь в избытке, могут оказывать токсический эффект.

К жирным кислотам с короткой цепью (ЖККЦ) относятся масляная (C_4), валериановая (C_5), капроновая (C_6), которые образуются в кишечнике и нейтрализуются печенью. В норме жирные кислоты, как и все токсичные и активные гидрофобные соединения, связаны с альбумином. При печеночной недостаточности содержание кислот повышается, а альбумина - закономерно снижается, поэтому ЖККЦ могут беспрепятственно оказывать токсический эффект на синапсы нервных клеток, замедляя проведение нервных импульсов.

Различают малую печеночную недостаточность и большую печеночную недостаточность, которая может быть обусловлена как поступлением токсичных веществ из кишечника (шунтирование печени), так и повреждением или разрушением печеночных клеток.

Таблица 8.

Дифференциальная диагностика печеночной недостаточности по признакам

Признак	Малая	Большая
Гепатогенная энцефалопатия	Отсутствует	Имеется
Наличие гепатодепрессии	Обычно умеренное	Обычно выраженное
Повышение индикаторов шунтирования	Отсутствует или умеренное	Выраженное

Основные характеристики печеночной недостаточности.

Печеночно-клеточная недостаточность (истинная кома) связана с разрушением клеток или их замещением на другие клетки (соединительнотканные, опухолевые и др.). Заболевание характеризуется энцефалопатией, желтухой и геморрагическим синдромом. У больных выражен гепатодепрессивный синдром (снижение факторов свертывания крови, ПТИ, холестерина, ХЭ, альбумина), повышение обеих фракций билирубина в 10-20 раз, отеки, связанные преимущественно со снижением уровня альбумина, повышен уровень индикаторов шунтирования печени - аммиака, циклических аминокислот, жирных кислот с короткой цепью, могут быть повышены ферменты цитолиза. Уменьшение содержания ферментов на фоне комы является неблагоприятным признаком, что обусловлено снижением способности печени к синтезу ферментов.

Портально-печеночная недостаточность (шунтовая кома) обусловлена, в первую очередь, попаданием в общий кровоток веществ, которые в норме обезвреживаются печенью и расцениваются как индикаторы шунтирования - аммиак, циклические аминокислоты, жирные кислоты с короткой цепью, меркаптаны. Ведущая роль в развитии комы отводится аммиаку, повышение которого нарушает энергетический метаболизм нервных клеток.

ТЕСТОВЫЕ ЗАДАНИЯ

1. Структурно-функциональной единицей печени является:
   1) гепатоцит
   2) купферовская клетка
   3) печеночная долька

4) эндотелий сосудов

2. В печени не образуется:
   1) альбумин
   2) факторы свертывания
   3) миоглобин
   4) желчные кислоты
3. Предшественником билирубина является
   1) миоглобин
   2) гемоглобин
   3) порфирин
   4) цитохром
   5) все перечисленное
4. Где в основном происходит метаболический распад гемоглобина:
   1) ретикулоэндотелиальная система
   2) эритроциты
   3) клетки печени
   4) почечные канальцы
   5) все перечисленное
5. Какую величину не должна превышать концентрация общего билирубина сыворотки крови в норме:
   1) 8,5 мкмоль/л
   2) 20,5 мкмоль/л
   3) 30,5 мкмоль/л
   4) 35,5 мкмоль/л
   5) 58,5 мкмоль/л
6. Конъюгированный билирубин в норме в крови составляет до:
   1) 5%
   2) 25%
   3) 50%
   4) 75%
   5) 100%
7. Что используется для синтеза конъюгированного билирубина:
   1) УДФ-глюкоза
   2) УДФ-глюкуронат
   3) глюкоза
   4) глюкуроновая кислота
   5) маннозамин
8. В дифференциальной диагностике паренхиматозной и гемолитической желтухи информативными являются тесты:
   1) фракции билирубина
   2) ЛДГ-изоферменты
   3) аминотрансферазы
   4) ретикулоциты
   5) все перечисленное верно
9. В моче здорового человека содержится:

1) биливердин
2) стеркобилиноген
3) мезобилирубин
4) билирубин
5) все перечисленное

10. Появление уробилина в моче при обтурационной желтухе может свидетельствовать о:
1) восстановлении проходимости желчных путей
2) закупорке желчных путей
3) поражении желчного пузыря
4) восстановлении функции печени
5) увеличении неконъюгированного билирубина

11. Отсутствие уробилина в моче указывает на:
1) гемолитическую желтуху
2) обтурационную желтуху
3) паренхиматозную желтуху в продромальный период
4) болезнь Жильбера
5) все заболевания

12. Выберите характеристику, не имеющую отношения к непрямому билирубину:
1) образуется в печени из прямого билирубина
2) в крови находится в комплексе с белком альбумином
3) плохо растворим в воде и не фильтруется в мочу
4) токсичен, проходя через гематоэнцефалический барьер, вызывает энцефалопатию
5) медленно реагирует с диазореактивом Эрлиха

13. Отметьте характеристику, не имеющую отношения к гемолитической желтухе:
1) возникает вследствие массивного разрушения эритроцитов
2) общий билирубин крови возрастает за счет непрямого билирубина
3) билирубин в моче не выявляют, содержание уробилиногена повышено
4) кал окрашен нормально
5) понижена активность фермента УДФ-глюкуронилтрансферазы

14. Отметьте характеристику, не имеющую отношения к механической желтухе:
1) возникает вследствие нарушения нормального оттока желчи в кишечник
2) в крови увеличено содержание как прямого, так и непрямого билирубина
3) содержание общего билирубина не превышает 20 мкмоль/л
4) каловые массы окрашены слабо, вплоть до обесцвечивания
5) в моче резко повышено содержание билирубина, уробилиногена нет

15. Назовите один из отличительных признаков гемолитической (надпеченочной) желтухи от механической (подпеченочной) и печеночно-клеточной (печеночной) желтух:
1) желтушное окрашивание склер и кожи
2) потемнение мочи
3) повышение содержания в крови и неконъюгированного (непрямого), и конъюгированного (прямого) билирубина
4) повышение содержания в крови конъюгированного (прямого) билирубина
5) повышение содержания в крови неконъюгированного (непрямого) билирубина

16. Печеночно-клеточная желтуха обусловлена повреждением гепатоцитов и желчных капилляров, например ,при острых вирусных инфекциях, хронических и токсических гепатитах. Назовите один из основных отличительных признаков печеночно-клеточной желтухи от гемолитической и механической желтух:

1) желтушное окрашивание склер и кожи
2) потемнение кала
3) повышение содержания в крови неконъюгированного и конъюгированного билирубина
4) повышение содержание в крови неконъюгированного (непрямого) билирубина

17. Признаком обтурационных желтух является наличие в моче:

1) конъюгированного билирубина
2) индикана
3) белка
4) цилиндров
5) лактозы

18. На окраску кала влияют:

1) примесь крови
2) билирубин
3) зеленые части овощей
4) стеркобилин
5) все перечисленное

19. Нормальную окраску кала определяет:

1) углеводная пища
2) жиры
3) белковая пища
4) стеркобилин

20. Появление билирубина в кале является признаком:

1) гастрита
2) острого энтерита
3) дуоденита
4) панкреатита
5) дисбактериоза

СИТУАЦИОННЫЕ ЗАДАЧИ

Ситуационная задача №1

В больницу поступил пациент с заболеванием печени. Проведен биохимический анализ мочевины в крови.

1. Целесообразно ли проведение этого анализа для оценки тяжести заболевания печени?

2. Какие дополнительные исследования нужно провести, чтобы исключить изменения экскреторной функции почек?

Ситуационная задача №2

При обследовании работников объединения «Химчистка» у одной работницы было обнаружено увеличение активности аланинаминотрансферазы (АлАТ) в крови в 5,7 раза, а аспартатаминотрансферазы (АсАТ) – в 1,5 раза. Врач-практикант А предположил, что это - следствие увеличенного потребления

мясных продуктов накануне, и причин для беспокойства нет. Врач-практикант Б предложил госпитализировать эту работницу, предполагая у нее поражение печени органическими растворителями.

1. Кто из них прав и почему?

2. Каково диагностическое значение определения активности аминотрансфераз в сыворотке крови?

Ситуационная задача № 3

При тяжелых вирусных гепатитах у больных может развиться печёночная кома, обусловленная, в частности, токсическим действием аммиака на клетки мозга. Какова причина столь значительного накопления аммиака в крови?

Ситуационная задача № 4

У двух больных концентрация билирубина 100 мкмоль/л, но у первого преобладает свободный, а у второго - связанный. Состояние какого больного тяжелее и почему?

Ситуационная задача № 5

У новорожденного содержание билирубина в крови повышено (за счёт свободного), кал интенсивно окрашен, в моче билирубин не найден.

1. О какой желтухе идёт речь?

2. Какой лекарственный препарат можно использовать для предотвращения этого заболевания и почему?

Ситуационная задача № 6

У больного яркая желтушность кожи, склер, слизистых оболочек. Моча цвета тёмного пива, окраска кала ослаблена. В крови повышено содержание билирубина, в моче определяется билирубин. О каком типе желтухи идёт речь?

Ситуационная задача № 7

Почему применение в качестве лекарственных препаратов салицилатов, сульфаниламидов, антибиотиков в больших дозах может явиться причиной гемолитической желтухи новорожденных с возможной последующей энцефалопатией?

Ситуационная задача № 8

Больная Ф., 32 года, доставлена в инфекционную больницу без сознания, с резко выраженной желтухой. Ощущается «печеночный» запах изо рта. Регионарные лимфатические узлы не увеличены. При перкуссии грудной клетки легочный звук, при аускультации везикулярное дыхание. Тоны сердца приглушены. Пульс ритмичный, слабого наполнения, 120/мин., АД - 110/70 мм рт.ст. Печень и селезенка не пальпируются. При перкуссии нижний край печени определяется на 2,0 см выше реберной дуги по средне-ключичной линии справа. Корнеальные рефлексы сохранены.

Из анамнеза: 3 месяца назад больной произведена аппендэктомия. Желтуха появилась вчера; за неделю до поступления началось «простудное заболевание».

1. Ваш предполагаемый диагноз и его обоснование.

2. Какие биохимические исследования необходимо провести для определения этиологии заболевания?

3. Какой биохимический показатель указывает на печеночно-клеточную недостаточность?

Ситуационная задача № 9

Мужчина 29 лет состоит активным донором, последние 6 месяцев - донором плазмы. Направлен в гепатоцентр станцией переливания крови в связи с появившимся у него повышением трансаминаз: АлАТ -

250 мкмоль/л. Ранее подобного повышения ферментных тестов не регистрировалось. Жалоб не предъявляет. При обследовании отмечено небольшое увеличение печени.

Из эпидемиологического анамнеза: повышение аминотрансфераз выявлено еще у 2х доноров этой станции. ИФА диагностика на маркеры к вирусным гепатитам B,C,D показала отрицательный результат.

1. Ваш предполагаемый диагноз.
2. Как подтвердить диагноз?

Ситуационная задача № 10

Больная К., 47 лет, обратилась к врачу с жалобами на частые приступы острой боли в правом подреберье, иррадиирующие в правую половину шеи, плечо, длящиеся до 3-х часов, сопровождающиеся повышением температуры тела до субфебрильных цифр, тошнотой, рвотой с примесью желчи. Возникают, как правило, после приема острой и жирной пищи. Стул ежедневно, оформленный, коричневого цвета, без патологических примесей. Считает себя больной около 2 лет, когда впервые возникли боли в правом подреберье. С этого времени после погрешностей в диете подобные обострения, не обследовалась, самостоятельно принимала спазмолитики, пользовалась грелкой. Вчера после погрешностей в диете возобновились боли, присоединились тошнота и рвота с примесью желчи, сегодня повысилась температура тела до $37,7^0$С, вызвала скорую помощь, доставлена в сан. пропускник.

Профессиональный анамнез: домохозяйка, часто не регулярный прием пищи, употребление жирной и жареной пищи.

При поверхностной пальпации мягкий, болезненный в правом подреберье, перитонеальные симптомы отрицательные. Пузырные симптомы Кера, Мерфи, Ортнера - положительные.

Данные дополнительных методов исследования:

1. Общий анализ крови: эритроциты –3,8-10*12/л,
Hb–135 г/л., ЦП –1,0, СОЭ –18 мм/ч,
тромбоциты –320-10*9/л,
лейкоциты –11,3-10*9/л: э-1%, п-20%, с-58%, лф-12%, м-9%.
2. Общий анализ мочи:
светло-желтая, прозрачная, pH кислая, удельный вес 1016; белок, сахар -нет, лейкоциты –1-2, эпителий –3-4 в поле зрения,
эритроциты, цилиндры –нет, оксалаты -небольшое количество.
3.Биохимическое исследование крови:
глюкоза –4,3 ммоль/л,
фибриноген –3,4 г/л, протромбиновый индекс –90%, АсАТ –0,38 ммоль/л, АлАТ –0,36 ммоль/л, холестерин –5,5 ммоль/л,
билирубин общий –59,0 мкмоль/л,
прямой - 44,0 мкмоль/л, непрямой –15,0 мкмоль/л,
амилаза –5,7 г/лч, креатинин - 0,07 ммоль/л,
общий белок –75 г/л,
альбумины –54%, глобулины –46%: α1–5%, α2–10%, β –15%, γ –16%.

1. Выделите синдромы, выделите ведущий синдром.
2. Обоснуйте предварительный диагноз.
3. Объясните механизм развития желтухи.
4. Оцените данные биохимического анализа крови.

Ситуационная задача № 11

Больной К., 33 лет, обратился к врачу с жалобами на выраженную слабость, утомляемость, снижение трудоспособности. Стул ежедневно, оформленный, коричневого цвета, без патологических примесей. Мочеиспускание 3-4 раза в день, безболезненное.Считает себя больным около года, когда без видимой причины появились вышеперечисленные жалобы, постепенно нарастали, что заставило обратиться к врачу. Ранее не обследовался, не лечился.

Профессиональный анамнез: стоматолог. Вредные привычки отрицает.

Туберкулез, вирусные гепатиты отрицает.

Объективно: общее состояние ближе к удовлетворительному, сознание

ясное, положение активное. Кожные покровы и видимые слизистые с иктеричным оттенком, сухие, пальмарная эритема, на коже груди единичные телеангиэктазии диаметром до 5мм. Живот правильной формы, обе половины одинаково участвуют в акте дыхания. При пальпации мягкий, незначительно болезненный в правом подреберье, симптомы Кера, Мерфи, Ортнера - положительные.

Данные дополнительных методов исследования:

1.Общий анализ крови:

эритроциты –3,8-10*12/л, лейкоциты –11,3-10*9/л: э-1%, п-20%, с-58%, лф-12%, м-9%, тромбоциты – 320*109/л, Hb–135 г/л., ЦП –1,0, СОЭ –18 мм/ч

2.Общий анализ мочи:

светло-желтая, прозрачная, pH кислая, удельный вес 1016; белок, сахар -нет, лейкоциты –1-2, эпителий –3-4 в поле зрения,

эритроциты, цилиндры –нет, оксалаты -небольшое количество.

3.Биохимическое исследование крови:

глюкоза –4,3 ммоль/л,

фибриноген –3,4 г/л,

протромбиновый индекс –90%,

АсАТ –0,38 ммоль/л,

АлАТ –0,36 ммоль/л,

холестерин –5,5 ммоль/л,

билирубин общий -59,0 мкмоль/л,

прямой –44,0 мкмоль/л,

непрямой –15,0 мкмоль/л,

амилаза –5,7 г/лч, креатинин –0,07 ммоль/л,

общий белок –75 г/л, альбумины –54%,

глобулины –46%: α1–5%, α2–10%, β –15%, γ –16%.

5. УЗИ:

Желчный пузырь нормальных размеров, стенка 4мм, уплотнена, в просвете определяются множественные конкременты.

1. Выделите синдромы, отметьте ведущий синдром.
2. Каков предварительный диагноз, его обоснование
3. Оцените данные биохимического анализа крови.

Ситуационная задача № 12

Больная З., 43лет, жалуется на интенсивный зуд кожи преимущественно в вечернее время, незначительное увеличение живота в размерах, чувство тяжести в правом подреберье, выраженную слабость, утомляемость, снижение трудоспособности. Физиологические отправления в норме. Считает себя больной около 3лет, когда впервые появились слабость и зуд кистей и стоп в ночное время, по поводу которого длительное время лечилась у дерматолога без эффекта. Постепенно присоединилась тяжесть в правом подреберье, увеличился живот, усилилась слабость, зуд стал более интенсивным и распространенным. В связи с прогрессирующим ухудшением состояния обратилась в поликлинику по месту жительства. Участковым врачом направлена на госпитализацию для обследования и подбора терапии.

Перенесенные заболевания: детские инфекции, ОРВИ. Профессиональный анамнез: бухгалтер, профессиональные вредности отрицает. Диету соблюдает. Вредные привычки отрицает. Туберкулез, вирусные гепатиты отрицает.

Объективно: общее состояние средней степени тяжести, сознание ясное, положение активное. Кожные покровы и видимые слизистые желтого цвета, сухие, на спине, животе, предплечьях и голенях следы расчесов. Живот правильной формы, равномерно увеличен, обе половины одинаково участвуют в акте дыхания. При пальпации мягкий, незначительно болезненный в правом подреберье. Печень при пальпации умеренно болезненна, плотная, край острый

Данные дополнительных методов исследования:

1.Общий анализ крови:

эритроциты –3,7-10*12/л, Hb –130 г/л., СОЭ –32 мм/ч, тромбоциты –250-10*9/л, лейкоциты –7,8-10*9/л: э-3%, п-2%, с-58%, лф-28%, м-9%.

2.Общий анализ мочи:

светло-желтая, прозрачная, pH кислая, удельный вес 1017; белок, сахар -нет, лейкоциты –1-2, эпителий –3 в поле зрения, эритроциты, цилиндры –нет, оксалаты –небольшое количество.

3. Биохимическое исследование крови:

глюкоза –4,1 ммоль/л,

фибриноген –2,0 г/л, протромбиновый индекс –75%,

АсАТ –2,48 ммоль/л, АлАТ –3,67 ммоль/л,

холестерин –8,5 ммоль/л,

билирубин общий –149,0 мкмоль/л,

прямой –112,0 мкмоль/л., непрямой –37,0 мкмоль/л,

амилаза –6,7 г/лч, креатинин –0,06 ммоль/л,

общий белок –56 г/л, альбумины –44%, глобулины –56%: α1–5%, α2–15%, β –15%, γ –21%, ГГТП –460 ЕД/л.

4.Маркеры вирусных гепатитов не обнаружены.

1. Выделите синдромы, выделите ведущий синдром.
2. Обоснуйте предварительный диагноз.
3. Оцените данные биохимического анализа крови.

Ситуационная задача № 13

Больной Г., 45 лет, жалуется на ноющие боли в правом подреберье, постоянные, уменьшаются после приема но-шпы через 30-40 минут, слабость, недомогание, снижение аппетита, сонливость днем и

бессонницу ночью, снижение веса (на сколько и за какой период времени -уточнить не может), периодически кровоточивость десен и геморроидальных узлов. Считает себя больным около 5 лет, когда стали возникать боли в правом подреберье, проходили самостоятельно. За медицинской помощью не обращалась. Около года назад присоединились слабость, недомогание, ухудшился аппетит, стал замечать снижение массы тела. Месяц назад присоединилась кровоточивость десен и геморроидальных узлов.

В анамнезе: злоупотребление алкоголем.

Перенесенные заболевания: ОРВИ, хронический бронхит курильщика. *Профессиональный анамнез:* работает слесарем.

Питается не регулярно, диету не соблюдает.

Вредные привычки: курит в течение 15 лет по 1 пачке сигарет в день, часто употребляет крепкие алкогольные напитки.

Наследственность не отягощена.

Аллергологический анамнез не отягощен.

Объективно: состояние средней степени тяжести, сознание ясное, положение активное. Кожные покровы и видимые слизистые желтого цвета, нормальной влажности, тургор и эластичность снижены, на груди множественные телеангиэктазии до 0,5–1,0 см в диаметре, гиперемия тенора и гипотенора, обоих ладонных поверхностей. Подкожно жировая клетчатка развита слабо, распределена равномерно, гинекомастия. Живот увеличен в размерах, обе половины одинаково участвуют в акте дыхания, по боковым поверхностям живота определяется расширенный венозный рисунок. При поверхностной пальпации живот мягкий, безболезненный во всех отделах, перитонеальные симптомы отрицательные, симптом флюктуации положительный. Пальпация всех отделов толстого и тонкого кишечника затруднена, область пальпации безболезненна.

При глубокой пальпации определяется болезненность при пальпации печени + 2см из-под края реберной дуги по среднеключичной линии.

Данные дополнительных методов исследования:

1.Общий анализ крови:

эритроциты –3,3-10*12/л, Hb –105 г/л., ЦП –1,0,

СОЭ –18 мм/ч,

тромбоциты –220-10*9/л,

лейкоциты –4,3-10*9/л: э-3%, п-4%, с-51%, лф-32%, м-10%.

2.Общий анализ мочи:

светло-желтая, прозрачная, pH кислая, удельный вес 1008; белок, сахар -нет, лейкоциты –1-2, эпителий –2-4 в поле зрения, эритроциты, цилиндры –нет, оксалаты -небольшое количество.

3.Биохимическое исследование крови:

глюкоза –4,3 ммоль/л,

фибриноген –1,4 г/л, протромбиновый индекс –60%,

АсАТ –1,38 ммоль/л, АлАТ –1,36 ммоль/л, холестерин –2,5 ммоль/л,

билирубин общий –49,0 мкмоль/л,

прямой –14,0 мкмоль/л., непрямой –35,0 мкмоль/л,

амилаза –5,3 г/лч, креатинин –0,07 ммоль/л,

общий белок –55 г/л,

альбумины –34%, глобулины –66%: α1–6%, α2–20%, β –16%, γ –24%.

1.Выделите синдромы, отметьте ведущий синдром.

2.Обоснуйте предварительный диагноз.

3. Оцените данные биохимического анализа крови.

Ситуационная задача № 14

Больной Р., 29 лет, жалуется на слабость, недомогание, снижение аппетита, желтушность кожи и слизистых, подташнивание после еды, повышение температуры тела до 39ºС, без озноба, в вечернее время, кожный зуд по всему телу, преимущественно в вечернее и ночное время. Считает себя больным около месяца, когда родственники отметили желтое окрашивание кожи и слизистых. За медицинской помощью не обращался, самостоятельно не лечился. Около недели назад присоединились слабость, недомогание, кожный зуд, ухудшился аппетит, усилилась интенсивность желтухи. Три дня назад отметил повышение температуры тела.

В анамнезе: злоупотребление алкоголем около 3 лет, в течение последнего месяца ежедневное употребление пива до 1 литра в сутки, периодически крепкие алкогольные напитки. У жены год назад стационарное лечение в инфекционной больнице по поводу вирусного гепатита С. Перенесенные заболевания: детские инфекции, ОРВИ, аппендэктомия в детстве.

Профессиональный анамнез: работает отделочником на стройке.

Питается не регулярно, диету не соблюдает.

Вредные привычки: курит в течение 9 лет по 1 пачке сигарет в день, часто употребляет крепкие алкогольные напитки.

Объективно: состояние средней степени тяжести, сознание ясное, положение активное. Кожные покровы и видимые слизистые желтого цвета, нормальной влажности, тургор и эластичность снижены, на коже лица, груди и спины телеангиэктазии 0,5–1,0 см в диаметре, на лице множественные ксантомы до 3мм в диаметре, гиперемия тенора и гипотенора. Следы расчесов по всей поверхности тела.

Живот незначительно увеличен в размерах, обе половины одинаково участвуют в акте дыхания.

При поверхностной пальпации мягкий, безболезненный во всех отделах, перитонеальные симптомы отрицательные, симптом флюктуации отрицательный. При глубокой пальпации определяется болезненность при пальпации нижнего края печени + 2 из-под края реберной дуги по среднеключичной линии.

Данные дополнительных методов исследования:

1.Общий анализ крови:

эритроциты –4,3-10*12/л, Hb –135 г/л., ЦП –1,0, СОЭ –38 мм/ч,

тромбоциты –320-10*9/л,

лейкоциты –24,3-10*9/л: э-3%, п-22%, с-53%, лф-22%, м-1%.

2.Общий анализ мочи:

светло-желтая, прозрачная, pH щелочная, удельный вес 1016; белок –0,033, сахар - нет, лейкоциты –1-2, эпителий –3-4 в поле зрения, эритроциты, цилиндры – нет, оксалаты -небольшое количество.

3.Биохимическое исследование крови:

глюкоза –4,3 ммоль/л,

фибриноген –2,4 г/л, протромбиновый индекс –70%,

АсАТ –4,38 ммоль/л, АлАТ –5,36 ммоль/л, холестерин –3,5 ммоль/л,

билирубин общий –349,0 мкмоль/л,

прямой –214,0 мкмоль/л., непрямой –135,0 мкмоль/л,

ЩФ –356 мкмоль/л., ГГТП -234 мкмоль/л.,

амилаза –5,3 г/лч, креатинин –0,07 ммоль/л,

общий белок –55 г/л, альбумины –44%,

глобулины –56%: α1–6%, α2–20%, β –16%, γ –24%.

1.Выделите синдромы, отетьте ведущий синдром.

2.Обоснуйте предварительный диагноз.

3. Оцените данные биохимического анализа крови.

4.Оцените данные общего анализа крови.

Ситуационная задача № 15

Больная О., 55 лет, жалуется на ноющие боли в правом подреберье, постоянные, уменьшаются после приема но-шпы через 30-40 мин., слабость, недомогание, снижение аппетита, желтушность кожи и слизистых. Стул ежедневно, однократно, коричневого цвета, без патологических примесей. Считает себя больной около 5 месяцев, когда во время лечения в неврологическом отделении по поводу поясничного остеохондроза на фоне приема диклофенака, найза стали возникать боли в правом подреберье, проходившие самостоятельно, кратковременная желтуха кожи и слизистых. После выписки чувствовала себя удовлетворительно. Около недели назад возобновились боли в поясничной области, в связи с чем принимала темпалгин, но-шпу, индометацин до 10 таблеток в день.. Три дня назад возникли боли в правом подреберье, без иррадиации, не связанные с приемом пищи, отметила желтушность кожи и слизистых, слабость, недомогание, ухудшение аппетита.

Перенесенные заболевания: аппендэктомия в детстве, поясничный остеохондроз.

Профессиональный анамнез: работает бухгалтером.

Питается не регулярно, диету не соблюдает. Вредные привычки отрицает. *Объективно*: общее состояние ближе к удовлетворительному, сознание ясное, положение активное. Кожные покровы и видимые слизистые желтушные, нормальной влажности, тургор и эластичность в норме. При глубокой пальпации определяется болезненность при пальпации нижнего края печени + 1см. из-под края реберной дуги по среднеключичной линии.

Данные дополнительных методов исследования:

1.Общий анализ крови:

эритроциты –4,3-10*12/л, Hb –135 г/л., ЦП –1,0, СОЭ –10 мм/ч,

тромбоциты –320-10*9/л,

лейкоциты –4,3-10*9/л: э-3%, п-4%, с-51%, лф-32%, м-10%.

2.Общий анализ мочи:

светло-желтая, прозрачная, pH кислая, удельный вес 1014; белок, сахар -нет, лейкоциты –1-2, эпителий –2-3 в поле зрения, эритроциты, цилиндры –нет, оксалаты -небольшое количество.

3.Биохимическое исследование крови:

глюкоза –4,3 ммоль/л,

фибриноген –3,4 г/л, протромбиновый индекс –80%,

АсАТ –4,48 ммоль/л, АлАТ –5,56 ммоль/л, холестерин –2,5 ммоль/л,

билирубин общий –29,0 мкмоль/л,

прямой –14,0 мкмоль/л., непрямой –15,0 мкмоль/л,

ЩФ –45 мкмоль/л., ГГТП –67 мкмоль/л., амилаза –5,3 г/лч,

креатинин –0,07 ммоль/л,

общий белок –72 г/л, альбумины –44%

1.Выделите синдромы, отметьте ведущий синдром.

2.Обоснуйте предварительный диагноз.

3.Причины развития желтухи

4. Оцените данные биохимического анализа крови.

5.Оцените данные общего анализа крови.

Ситуационная задача №16

Больной - студент, 18 лет, жалуется на боли в правом подреберье, слабость, плохой аппетит, боли в суставах. 1,5 года назад перенес вирусный гепатит В. Диету не соблюдал, любитель пива.

При осмотре: на коже конечностей и туловище «синяки», которые, со слов больного, образуются при малейших ушибах. Кожа и склеры иктеричны. Печень увеличена, уплотнена, пальпируется селезенка.

Данные дополнительных методов исследования:

Билирубин - 30 ммоль/л, непрямой - 17 ммоль/л.

АлАТ - 0.5 ммоль/л, АсАТ -0,6 ммоль/л,

протромбиновый индекс - 50 %,

тимоловая проба - 40 ед.

Обнаружены: HBsA, HBeA, анти-HBsJgM.

1. Ваш предположительный диагноз?

2. Какие выявлены синдромы?

3. Оцените данные анализа крови

Ситуационная задача № 17

Больной, 17 лет. Со слов матери, болеет желтухой с раннего детства. В последние годы периодически беспокоит чувство тяжести в правом подреберье, сопровождающиеся усилением желтухи, после физической нагрузки, занятий спортом.

При осмотре: состояние удовлетворительное. Склеры глаз и кожные покровы умеренно желтушны. Язык чистый. Живот мягкий, при пальпации безболезненный. Печень и селезенка не пальпируются.

Анализ крови и мочи без изменений.

Билирубин - 32,1 ммоль/л, непрямой - 28,1 ммоль/л.

АсАТ - 0,3 ед., АлАТ - 0,4 ед.

1.Ваш предположительный диагноз?

2. Чем объясняется желтуха?

3. Какую желтуху необходимо исключить?

Ситуационная задача № 18

Больная Б., 28 лет, находилась под наблюдением в больнице в течение 2 месяцев. Жалобы на желтушное окрашивание кожи и слизистых, слабость, тошноту, зуд. Недомогание появилось вскоре после родов. Печень увеличена, болезненна.

Кровь – билирубин прямой 82 мкмоль/л, билирубин обнаружен в моче, уробилина нет, реакция на стеркобилин слабо положительна, эритроциты – 3,8 · 1012/л, Hb – 110 г/л.

Больной произведена операция, в результате которой из общего желчного протока извлечен камень, который полностью закрывал просвет.

1. Назвать синдром, который наблюдался у больной.

2. Назвать причину его развития.

3. Объяснить его механизм.

4. Пояснить, почему в крови обнаруживается прямой билирубин.

5. Пояснить, почему в моче при этом синдроме нет уробилина?

Ситуационная задача № 19

Больная Ш. 48 лет, медицинская сестра туберкулезного стационара, в течение недели отмечала общую слабость, боли в мышцах, суставах рук и ног, зуд кожи, постоянное подташнивание (однократно была рвота), снижение аппетита. В течение 4-х дней отмечалась лихорадка до 37,5 – 37,8^{0}С. По рекомендации врача принимала антигриппин.

В гепатологический центр была госпитализирована после появления желтухи в состоянии средней тяжести. К прежним жалобам добавились упорный кожный зуд, плохой сон и головные боли.

При объективном обследовании: ярко выраженная желтуха кожи, склер и

слизистых оболочек. На коже видны единичные геморрагии. Язык обложен белым налетом. Печень на 3 см ниже реберной дуги, мягкая, чувствительная при пальпации и поколачивании. Селезенка не увеличена.

Данные дополнительных методов исследования:

1. Общий анализ крови:

Нв – 120 г/л, эритроциты – 4,5 х 1012 /л, лейкоциты – 4,7 х 109 /л,

СОЭ- 27мм/ч.

2. Биохимический анализ крови

Активность АлАТ в четыре раза превышает норму, повышена активность ще-

лочной фосфатазы.

Общий билирубин – 156,9 мкмоль/л, билирубиновый показатель – 81%. Выявлен «австралийский» антиген и повышенное содержание IgG. Протромбиновый индекс – 73%, снижено содержание проакцелерина и проконвертина, снижен альбумино-глобулиновый коэффициент.

Содержание глюкозы в крови натощак колеблется от 2-х до 4,5 ммоль/л.

Желтуха и зуд держались около 45 дней.

Выписана через два месяца с показаниями АлАТ в два раза больше нормы.

1. Какой вид желтухи у больной?
2. Возможные причины еѐ развития?
3. Дайте обоснование Вашего заключения.
4. Объясните механизм симптомов и изменений биохимических показателей.
5. Какие синдромы выявляются у больной?
6. Какие изменения можно обнаружить у больной в моче

Ситуационная задача № 20

Больная Р., 50 лет, обратилась к врачу с жалобами на кожный зуд, желтушность кожных покровов и склер, потемнение мочи, осветленный кал, снижение массы тела, кожный зуд и кровоточивость десен, метеоризм, запоры, «жирный кал». Перечисленные симптомы впервые появились 2 месяца назад.

При фиброгастродуоденоскопии обнаружена опухоль в области большого дуоденального сосочка, при ультразвуковом исследовании органов брюшной полости - увеличение лимфатических узлов.

Объективно: больная пониженного питания, кожа и склеры желтушны, следы расчесов на коже, петехиальные высыпания, АД 110/60 мм рт. ст., ЧСС 52 мин$^{-1}$.

Данные дополнительных методов исследования:

1. Биохимический анализ крови:

общий белок 67 г/л, альбумин 57 %, глобулины 43 %

фибриноген 4 г/л

тимоловая проба 4 ед.

креатинин 52 мкмоль/л, мочевина 6,5 ммоль/л,

глюкоза (плазма) 5,3 ммоль/л,

общий холестерин 14,2 ммоль/л, общий билирубин 270,7 мкмоль/л

прямой билирубин 252,1 мкмоль/л, непрямой билирубин 18,6 мкмоль/л

гемоглобин 80 г/л

уробилин – нет, желчные кислоты +++

АсАТ 59 ед/л, АлАТ 47 ед/л, ЩФ 283 ед/л.

2. Общий анализ мочи:

цвет темного пива, белок – отсутствует, уробилин отсутствует,

глюкоза отсутствует, билирубин +++, желчные кислоты +++.

1.Укажите причину и вид желтухи, наблюдаемой у больного, обоснуйте свое заключение.

ЭТАЛОНЫ ОТВЕТОВ К ТЕСТОВЫМ ЗАДАНИЯМ

1 - 3	**6 - 5**	**11 - 2**	**16 - 3**
2 – 3	**7 - 2**	**12 - 1**	**17 - 1**
3 – 5	**8 - 5**	**13 - 5**	**18 -5**
4 – 1	**9 - 2**	**14 - 2**	**19 - 4**
5 - 2	**10 - 1**	**15 - 5**	**20 - 5**

ЭТАЛОНЫ ОТВЕТОВ НА СИТУАЦИОННЫЕ ЗАДАЧИ

Ответ к задаче №1

Синтез мочевины происходит в печени. Ее содержание может служить для оценки синтезирующей способности печени, но для этого нужно исключить изменение экскреторной функции почек и определить остаточный азот, а также активность АлАТ в сыворотке крови.

Ответ к задаче №2

Прав врач – практикант Б. Фермент АлАТ имеет специфическую органную локализацию в печени и при разрушении клеток выходит в кровь, где его активность резко возрастает, что и наблюдается у больного.

Ответ к задаче №3

При вирусном гепатите нарушаются функции гепатоцитов. Синтез мочевины снижается, что приводит к накоплению аммиака.

Ответ к задаче № 4

У обоих больных гипербилирубинемия, но первый больной находится в более тяжёлом состоянии (у него можно предположить гемолитическую желтуху), чем второй (у него можно предположить механическую или паренхиматозную желтуху), так как свободный билирубин более токсичен (проникает через ГЭБ в головной мозг и поражает подкорковые ядра). Для дифференциальной диагностики вида желтух

надо дополнительно исследовать мочу на билирубин, экскреты на стеркобилин (его отсутствие в кале говорит о механической желтухе) и провести энзимодиагностику (повышение активности $ЛДГ_5$, АлАТ > АсАТ - характерно для паренхиматозной желтухи, а ЩФ и ГГТП - для механической желтухи).

Ответ к задаче № 5

а) Гемолитическая желтуха новорожденных.

б) Фенобарбитал, индуктор транскрипции гена УДФ-глюкуронилтранс-феразы.

Ответ к задаче №6

У больного вероятна механическая желтуха. Для уточнения диагноза необходимо провести энзимодиагностику; определить активность $ЛДГ_5$, АлАТ, ЩФ, ГГТП. При механической желтухе повышена активность ЩФ и ГГТ.

Ответ к задаче №7

1. Указанные лекарственные препараты могут конкурировать с БР за центры связывания на альбумине, в результате повышается токсическое действие свободного БР, главным образом на головной мозг.

2. Биохимический анализ крови в динамики, белок и его фракции, ПТИ, маркеры ВГВ (ИФА) - IgM к HBcor Ag, HBsAg, HBeAg; ПЦР - ДНК HBV.

Ответ к задаче № 8

1. Острый вирусный гепатит В, фульминантная форма, осложненная ОПЭ, кома I ст.

Диагноз выставлен на основании острого начала, короткого продромального периода по гриппоподобному варианту, выраженной желтухи, резкого сокращения размеров печени, «печеночного» запаха изо рта, тахикардии, отсутствия сознания, сохранении корнеальных рефлексов, сведений эпиданамнеза (хирургическое вмешательство 3 месяца назад).

2.Маркеры на вирусный гепатит В, D (ИФА), ПЦР диагностика - ПЦР - ДНК HBV, ПЦР - РНК HD V.

3.Протромбиновый индекс (ПТИ), альбумины сыворотки крови.

Ответ к задаче № 9

1.Острый вирусный гепатит С, безжелтушная форма, легкая степень тяжести. Диагноз выставлен на основании сведений эпидемиологического анамнеза (активный донор плазмы), субклинического течения заболевания, высокой активности АлАТ

2.ПЦР - диагностика с целью обнаружения РНК HCV, определение генотипа вируса.

Ответ к задаче №10

1. Холестатический синдром

2. Желчно-каменная болезнь. Хронический калькулезный холецистит, в стадии обострения. С учетом характерного болевого абдоминального синдрома (боли в правом подреберье с иррадиацией вправо и вверх, возникают после погрешностей в диете, положительные пузырные симптомы), наличия факторов риска (женский пол, возраст), признаков желтухи и повышения температуры тела.

3. Синдром желтухи развивается вследствие закупорки протоков конкрементом, что приводит к нарушению оттока желчи.

4. В биохимическом анализе крови признаки механической желтухи.

Ответ к задаче №11

1. Синдром цитолиза (астенический синдром, печеночно-клеточной недостаточности, синдром желтухи.

2. Хронический вирусный гепатит С? На основании клинической картины (ведущий синдром цитолиза), профессионального анамнеза.

3. В биохимическом анализе крови признаки паренхиматозной желтухи (гипербилирубинемия за счет обеих фракций) и синдрома цитолиза (повышение трансаминаз).

Ответ к задаче №12

1. Синдром холестаза, синдром цитолиза (астенический синдром, печеночно-клеточной недостаточности, гепатомегалии), синдром желтухи, синдром портальной гипертензии.

2. Первичный билиарный цирроз печени. Портальная гипертензия. Асцит. Холестаз.

3. В биохимическом анализе крови признаки подпеченочной желтухи (гипербилирубинемия за счет прямой фракции билирубина), синдрома цитолиза (повышение трансаминаз), печеночно-клеточной (снижение белка, альбуминов, фибриногена, протромбинового индекса), синдрома холестаза (увеличение холестерина и ГГТП).

Ответ к задаче №13

1.Синдром цитолиза (печеночно-клеточной недостаточности), синдром паренхиматозной желтухи, печеночная недостаточность.

2.На основании вышеперечисленных синдромов, анамнеза –злоупотребление алкоголем, больше данных за поражение печени –хронический гепатит, цирроз печени.

3. В биохимическом анализе крови признаки синдрома цитолиза, печеночно-клеточной недостаточности, паренхиматозной желтухи.

Ответ к задаче №14

1.Синдром цитолиза (гепатоспленомегалии, печеночно-клеточной недостаточности), синдром паренхиматозной желтухи, синдром холестаза, синдром мезенхимального воспаления.

2.На основании вышеперечисленных синдромов, анамнеза - злоупотребление алкоголем, контакт с инфицированной вирусом гепатита С, можно предположить поражение печени –хронический гепатит, цирроз печени.

3. В биохимическом анализе крови признаки синдрома цитолиза, печеночно-клеточной недостаточности, паренхиматозной желтухи, холестаза.

4. В общем анализе крови выявлены признаки синдрома мезенхимального воспаления: ускоренная СОЭ, лейкоцитоз со сдвигом лейкоцитарной формулы влево.

Ответ к задаче №15

1. Синдром цитолиза (астенический, печеночно-клеточной недостаточности, гепатомегалии, болевой), синдром желтухи.

2.На основании выделенных синдромов, анамнеза – прием гепатотоксичных препаратов, больше данных за токсическое поражение печени.

3.Желтуха развивается вследствие развития синдрома цитолиза – непосредственное разрушение гепатоцитов с выходом билирубина, а также из-за нарушения функции печени.

4. В биохимическом анализе крови имеются признаки синдрома цитолиза, паренхиматозной желтухи, печеночно-клеточной недостаточности.

5. Показатели общего анализа крови в пределах нормы.

Ответ к задаче № 16

1. Хронический активный гепатит, печеночно-клеточная недостаточность.

2. Выраженный синдром цитолиза.

3. В биохимическом анализе крови признаки синдрома цитолиза, печеночно-клеточной недостаточности.

Ответ задача № 18

1. Доброкачественная гипербилирубинемия - болезнь Жильбера.

2. Нарушение захвата билирубина из плазмы гепатоцита, дефект конъюгации билирубина с глюкуроновой кислотой.

3. Гемолитическую (ретикулоцитоз, осмотическую стойкость, сывороточное железо).

Ответ к задаче №19

1. Желтуха.

2. Камень желчного протока

3. Препятствие в желчных путях приводит к застою и повышению давления желчи, расширению и разрыву желчных капилляров и поступлению желчи в кровь.

4. В кровь в составе желчи попадает прямой (конъюгированный) билирубин.

5. В моче нет уробилина при полном закрытии протока, т.к. желчь не поступает в кишечник и уробилин не образуется.

Ответ к задаче № 20

Печеночная (паренхиматозная) желтуха у больной с вирусным гепатитом типа В. Желтуха печеночная, т.к. на фоне высокой гипербилирубинемии имеются признаки значительного снижения функции печени: нарушен синтез альбуминов (снижен А/Г коэффициент) и прокоагулянтов (протромбина, проакцелерина, проконвертина), нарушен углеводный обмен (гипогликемия). Увеличение АлАТ (цитолитический фермент) свидетельствует о повреждении гепатоцитов.

Больная выписана в состоянии неполного выздоровления (увеличена АлАТ).

У больной выявляются синдромы: желтуха, холестаз (маркером является увеличение в крови ЩФ), холемия (зуд кожи связан с увеличением в крови ЖК), синдром печеночно-клеточной недостаточности.

Моча у больной должна быть темной из-за содержания в ней ПБ (т.к. количество его в крови превышает 34 мкмоль/л и он легко проходит почечный фильтр) и должна вспениваться при встряхивании из-за присутствия в ней ЖК, которые понижают поверхностное натяжение жидкости.

I Перечень вопросов для проверки конечного уровня знаний:

1. Печень, функции печени человека

2. Детоксикационная функция печени.

3. Биохимические исследования функций печени.

4. Биохимические показатели при заболеваниях печени.

5. Основные синдромы при заболеваниях печени.

II Самостоятельная работа обучающихся:

Составить ситуационную задачу по теме: «Детоксикационная функция печени. Биохимические методы определения ее функциональной недостаточности».

III Список используемой литературы:

Обязательная:

1.Е.С. Северин «Биохимия», Москва 2004;
2.Е.С. Северин «Биохимия с упражнениями и задачами», Москва 2008.

Дополнительная:

1. Шерлок Ш., Дули Дж. Заболевания печени и желчных путей: Практич. рук.: Пер. с англ. / Под ред. З.Г. Апросиной, Н.А. Мухина. – М.: ГЭОТАР-МЕД, 2002. – 864 с.

2. Иванников И.О., Сюткин В.Е. Общая гепатология (издание третье, перераб. и доп.) – М.: Медпрактика-М, 2003. - 160 с.

3. Заболевания печени и желчевыделительной системы. Вольфганг Герок • Хуберт Е. Блюм Перевод с немецкого Под общей редакцией акад. РАМН В.Т.Ивашкина, профессора А.А.Шептулина Москва «МЕДпресс-информ» 2009.

4.Клиническая биохимия: учебное пособие. 3-е издание / под ред. В.А.Ткачука. -2008

5.Под общей редакцией д.м.н., профессора С.Г.Щербака. Клиническая интерпретация лабораторных исследований для практикующего врача. -СПб.:Издательство «Корона. Век», М.: Издательство «Бином», 2015. -464с.

6. В. В. Долгова, О. П. Шевченко. Лабораторная диагностика нарушений обмена белков// М. Кафедра КЛД, 2002, 67 стр.

7. А. А. Кишкун. Современные технологии повышения качества клинической лабораторной диагностики. Москва, РАМЛД, 2005 Клиническая лабораторная аналитика. Под ред. В. В. Меньшикова // М. 1999, Т 1-3

8. Клиническая оценка лабораторных тестов. Под ред. Н. У. Тица. // М. 1986.

Лабораторная диагностика. Под ред. В. В. Долгова, О. П. Шевченко// М., "Реафарм", 2005, 440 стр.

9. Дати Ф. Метцманн Э. Белки. Лабораторные тесты и клиническое применение.М., Набора.

10. Внутренние болезни по Тинсли Р. Хариссону. Кн.вторая. Под ред.

Э.Фаучи, Ю.Браунвальда, К.Киссельбахера и др. М., Практика. 2003.

11. W. F. Borron. Medical physiology / W. F. Borron, E. L. Boupaep. – Philadelphia: Saunders, 2004.

Тема: Метаболизм этанола в печени. Влияние больших доз алкоголя на обменные процессы паренхимы печени.

Поступивший в организм этанол кровью переносится во все органы и ткани организма. Его катаболизм осуществляется главным образом в печени (от 75 % до 98 % поступившего в организм этанола). Превращение этанола в печени происходит тремя путями с образованием токсического метаболита – ацетальдегида.

1. Окисление этанола NAD-зависимой алкогольдегидрогеназой

Алкогольдегидрогеназа катализирует обратимую реакцию, направление которой зависит от концентрации ацетальдегида и соотношения NADH/NAD+ в клетке. Алкогольдегидрогеназа (АДГ) — цитозольный фермент.

$C_2H_5OH + HAD^+ \leftrightarrow CH_3CHO + NADH + H^+$

При хроническом алкоголизме количество фермента в печени не увеличивается, т.е. он не является индуцируемым ферментом.

Изоферменты алкогольдегидрогеназы. Класс I АДГ-изоферментов (АДГ, β- АДГ и γ - АДГ) – окисление этанола и других алифатических спиртов небольших размеров.

Класс II АДГ (π-АДГ) (в печени) - окисление более крупных алифатических и ароматических спиртов.

Класса III АДГ (χ-АДГ) - длинноцепочечные алифатические спирты (начиная от пентанола) и ароматические спирты.

Класс IV АДГ (σ- или μ-АДГ) — окислении ретинола.

2. Окисление этанола при участии цитохром Р450 зависимой микросомальной этанолокисляющей системы Цитохром Р450-зависимая микросомальная этанолокисляющая система локализована в мембране гладкого ЭР гепатоцитов.

Она индуцируется этанолом, другими спиртами и приобретает существенное значение при поступлении больших доз этанола и при злоупотреблении алкоголем. Окисление этанола происходит при участии изофермента Р450IIE1.

При хроническом алкоголизме окисление этанола ускоряется на 50 – 70 % за счёт гипертрофии ЭР и индукции цитохрома Р450IIE1.

$C_2H_5OH + NADPH + H^+ + O_2 \rightarrow CH_3CHO + NADP^+ + 2H_2O$

Кроме основной реакции, цитохром Р450 катализирует образование активных форм кислорода (O_2^-, H_2O_2), которые стимулируют ПОЛ в печени и других органах.

Окисление этанола каталазой Второстепенную роль в окислении этанола играет каталаза, находящаяся в пероксисомах. Этот фермент расщепляет примерно 2 % этанола, при этом одновременно разлагается пероксид водорода. $CH_3CH_2OH + H_2O_2 \rightarrow CH_3CHO + 2H_2O$. Образующийся ацетальдегид – очень токсичен и поэтому в тканях он превращается в нетоксичный ацетат.

Ацетальдегид, образовавшийся из этанола, окисляется до уксусной кислоты. Работают два фермента: 1) FAD - зависимая альдегидоксидаза:

$CH_3CHO + O_2 + H_2O \rightarrow CH_3COOH + H_2O_2$

Повышение концентрации ацетальдегида в клетке вызывает индукцию фермента альдегидоксидазы. В ходе реакции образуются уксусная кислота, H_2O_2, другие активные формы кислорода, что приводит к усилению перекисного окисления липидов (ПОЛ).

2) Ацетальдегиддегидрогеназа (АлДГ) – окисляет субстрат при участии кофермента NAD+.

$CH_3CHO + H_2O + NAD^+ \rightarrow CH_3COOH + NADH + H^+$

В разных тканях организма человека встречаются полиморфные варианты АлДГ. Они характеризуются широкой субстратной специфичностью, разным распределением по клеткам тканей (почки, эпителий, слизистая оболочка желудка и кишечника) и в компартментах клетки.

Например, митохрондриальная изоформа АлДГ гепатоцитов, обладает более высоким сродством к ацетальдегиду (имеет низкую константу Михаэлиса КМ), чем цитозольная (КМ существенно выше).

У некоторых жителей Японии и Китая после употребления очень небольших доз алкоголя происходит расширение сосудов и увеличение частоты сердечных сокращений. Эти же дозы алкоголя у европейцев не вызывают такого действия.

Наблюдаемый физиологический эффект обусловлен тем, что у вышеупомянутых жителей присутствует только цитозольная АлДГ, а митохондриальная форма отсутствует поэтому ацетальдегид медленно превращается в нетоксичный ацетат.

Основным органом метаболизма ксенобиотиков в организме человека и млекопитающих является печень, главным образом благодаря разнообразию и высокой активности здесь ферментов биотрансформации. Кроме того, портальная система обеспечивает прохождение всех веществ, поступивших в желудочно-кишечный тракт, именно через печень, до того, как они проникнут в общий кровоток. Это также определяет функциональное предназначение органа. Тончайшая сеть печеночных капилляров, огромная площадь контакта между кровью и поверхностью гепатоцитов, обеспечивающаяся микроворсинками базальной поверхности печеночных клеток, обусловливают высокую эффективность печеночной элиминации токсиканта на клеточном уровне

Продукты l фазы метаболизма поступают в общий кровоток и могут оказывать действие на органы и системы. Печень выбрасывает в кровь и продукты ll фазы метаболизма. Из крови продукты превращения могут захватываться почками, легкими, другими органами, повторно печенью для экскреции с желчью. С желчью метаболиты поступают в кишечник, где частично реабсорбируются и повторно поступать в печень (цикл печеночной рециркуляции).

Несмотря на доминирующую роль печени в метаболизме ксенобиотиков, другие органы также принимают участие в этом процессе. Почки и легкие содержат энзимы и l и ll фаз метаболизма. Особенно велика роль почек, поскольку в этом органе имеется специфическая система захвата и катаболизма продуктов конъюгации, образующихся в печени. Активность других органов, таких как кишечник, селезенка, мышечная ткань, плацента, мозг, кровь - значительно ниже, однако наличие энзимов, катализирующих процессы биотрансформации, при отравлении токсифицирующимися ксенобиотиками, имеет ключевое значение в развитии патологических процессов в этих органах. В процессе внепеченочного метаболизма могут образовываться продукты, как аналогичные продуктам печеночного происхождения, так и отличные от них. Иногда в ходе внепеченочного метаболизма может осуществляться активация метаболитов, образующихся в печени.

Энзимы, участвующие в метаболизме ксенобиотиков, локализованы в основном внутриклеточно. Небольшое их количество определяется в растворимой фракции циотозоля, митохондриях, большинство же связаны с гладким эндоплазматическим ретикулумом (таблица 1). Методом ультрацентрфугирования гладкий эндоплазматический ретикулум выделяется из исследуемых клеток в виде фрагментов мембранных структур, называемых микросомами. Поэтому основная группа ферментов, участвующих в метаболизме ксенобиотиков, получила название "микросомальные энзимы".

Основные пути биотрансформации чужеродных соединений (окисление, восстановление, гидролиз, синтез).

Основные пути биотрансформации чужеродных соединений.

1. Окисление:

а) микросомальное – алифатичекое или ароматическое гидроксилирование, – эпоксидирование, – N-гидроксилирование, – N, S-окисление, – дезалкилирование, – дезаминирование, – десульфирование;

б) немикросомальное – окислительное дезаминирование, – окисление спиртов, альдегидов, – ароматизация алициклических соединений.

2. Восстановление:

а) восстановление нитросоединений, азотсоединений микросомальными ферментами; б) микросомальное восстановительное галогенирование; в) немикросомальное восстановление.

3. Гидролиз с участием микросомальных и немикросомальных ферментов.

4. Синтез (реакции коньюгации): а) образование коньюгатов с глюкуроновой кислотой; б) образование сложных эфиров с серной и фосфорной кислотами; в) метилирование; г) ацетилирование; д) пептидная коньюгация.

Ферменты биотрансформации ксенобиотиков присутствуют в основном в микросомах и в цитозоле и незначительная часть – в митохондриях, ядре и лизосомах.

Ферментативные реакции 1-й фазы биотрансформации. Реакции гидролиза фосфорорганических веществ, эпоксидов.

Ферментативные реакции 1-й фазы биотрансформации

карбоксилэстераза, ацетилхолинэстераза псевдохолинэстераза

эпоксидная гидролаза

Пример. Фосфорорганические вещества гидролизуются с помощью алк- и арилэстераз, атакующих эфирные связи или действующих на ангидриды кислот. 3 типа превращений:

Пример. Гидролиз эпоксидов (связи углерод-кислород в оксирановом кольце) осуществляется эпоксидгидратазой. В результате реакции образуются дигидродиолы

Ферменты реакций окисления ксенобиотиков. Характеристика реакций, катализируемых альдегиддегидрогеназ, дигидродиолдегидрогеназ, молибденовых гидроксилаз, моноаминоксидаз, пероксидаз, флавинмонооксигеназ.

Реакции окисления. Альдегиддегидрогеназы(АлДГ) - окисление альдегидов до карбоновых кислот (кофактор НАД+).

Дигидродиолдегидрогеназы- окисление полициклических ароматических углеводородов.

Молибденовые гидроксилазы: сульфитоксидаза – окисляет токсичный сульфит до относительно безопасного сульфата; ксантиндегидрогеназа (XD) и ксантиноксидаза (XO) — участвуют в процессах, связанных с оксидативным стрессом, пероксидном окислении липидов; альдегидоксидаза — пероксидное окисление липидов, катаболизм биогенных аминов и катехоламинов.

Моноаминоксидазы- окислительное дезаминировании первичных, вторичных и третичных аминов, включая эндогенные.

Пероксидазы

1) обезвреживают пероксиды; 2) могут превращать ксенобиотики в токсичные метаболиты;

3) могут осуществлять прямой перенос пероксидного кислорода к ксенобиотику То-х → То-хО;

4)амины или фенолы окисляются пероксидом водорода в присутствии пероксидаз с образованием свободных радикалов. Флавинмонооксигеназы - окисляют нуклеофильный азот, серу и фосфор в молекулах ксенобиотиков.

Цитохром Р450 катализирует реакции окисления:

-гидроксилирование алифатических и ароматических углеводородов; -эпоксидирование двойной связи; -окисление гетероатомов (O-, S-, N-, Si-) -N-гидроксилирование; -деалкилирование гетероатомов (O-, S-, N-, Si-), -окислительный перенос группы; -разрыв сложноэфирной связи; -дегидрирование.

Цитохром Р450 (цитохром Р450-зависимая монооксигеназа, англ. Cytochrome P450, CYP) — общее название ферментов семейства Р450. Входят в класс гемопротеинов, относятся к цитохромам типа b.

Цитохром Р450, связанный с монооксидом углерода, имеет максимум поглощения света при длине волны 450 нм, что определило его название (Гарфинкель, Клингинбирг, 1958).

Цитохромы Р450 обнаружены во всех без исключения царствах живых существ — у животных, растений, грибов, бактерий, архей. Эти белки отсутствуют только у облигатно анаэробных организмов.

Описано около 11 500 белков системы CYP. Р450 бактерий и архей растворѐн в цитоплазме. У эукариотических организмов цитохромы Р450 являются мембранными белками.

Система цитохрома Р450 участвует в окислении многочисленных соединений, как эндогенных, так и экзогенных.

Ферменты этой группы играют важную роль в обмене стероидов, желчных кислот, ненасыщеных жирных кислот, а также в нейтрализации ксенобиотиков (лекарств, ядов, наркотиков).

Цитохром Р450-зависимые монооксигеназы катализируют расщепление различных веществ с участием донора электрона НАДФН и молекулярного кислорода. В этой реакции один атом кислорода присоединяется к субстрату, а второй восстанавливается до воды.

Ферменты семейства цитохрома Р450, в отличие от остальных гемопротеинов, обладающих одним типом активности и строго определѐнной функцией, разнообразны: ⎱ по функциям, ⎱ типам ферментативной активности, ⎱ обладают малой субстратной специфичностью, ⎱ могут проявлять как монооксигеназную, так и оксигеназную активность.

Цитохромы Р450 катализируютω-окисление насыщенных жирных кислот, перекисное окисление ненасыщенных жирных кислот, гидроксилирование стероидных гормонов, желчных кислот и холестерина, биосинтез простагландинов.

Цитохромы Р450 микросом участвуют в нейтрализации ксенобиотиков (лекарств, ядов, наркотических веществ).

Гены цитохрома Р450 человека

У человека выявлено 57 генов и более 59 псевдогенов системы цитохрома Р450. Они подразделяются на 18 семейств и 43 подсемейства. Номенклатура генов цитохромов Р450 человека описана подробно.

Модели гидроксилирования ксенобиотиков микросомальными монооксигеназами

Упрощенная схема гидроксилирования ксенобиотиков микросомальными монооксигеназами (цитохром Р-450)

Реакции, катализируемые цитохромом Р-450

Реакции О-деалкилирования

Эпоксидирование и гидроксилирование ароматических соединений

Гидроксилирование циклических ароматических углеводородов

N-окисление (N-гидроксилирование)

Вторая фаза обезвреживания веществ – этап биологической конъюгации.

В ходе реакций конъюгации происходит присоединение к функциональным группам ксенобиотиков, поступивших в клетку или преобразовавшихся в реакциях 1-й фазы, молекул или групп эндогенного происхождения, таких как глутатион, глюкуроновая кислота, сульфат и т.д.
Все реакции конъюгации осуществляются ферментами класса трансфераз, это реакции биосинтеза и на их осуществление организм тратит макроэрги.
Реакции конъюгации протекают в разных компартментах, это позволяет связывать токсичные продукты появляющиеся и вне ЭПР.
Основные ферменты и метаболиты, участвующие в реакциях конъюгации
Примеры реакций глюкуронидной, сульфатной, глутатионовой конъюгации/
Глюкуронидная конъюгация
В реакцию способны вступать 4 группы химических веществ. В результате образуются О-, N-, S- С-

глюкурониды
УДФ-глюкуронозилтрансферазы – группа ферментов с разной степенью специфичности.
Работают в печени, коже, легких, селезенке, тимусе, почках, отсутствуют в крови.
90 % активности сосредоточено в ЭПС.
Фермент присутствует на ядерной мембране, что защищает ядерный аппарат клетки от реактивных липофильных метаболитов, не успевших связаться в других местах клетки.
Примеры образования глюкуронидных конъюгатов
Сульфатная конъюгация В реакцию вступают 6 классов органических веществ (алкоголи, ароматические амины, фенолы, ариламины, гидроксиламины, некоторые стероиды.
Источником неорганического сульфата в сульфатной конъюгации является сера из пищи и процессы окислительного превращения цистеина.

Сульфатная конъюгация – наиболее древняя и простая форма детоксикации.

В ряде случаев несовершенна, например, непрямой канцероген N-гидроксиацетиламинофлуорен после связывания с сульфатом спонтанно взаимодействует с белками и НК, оказывая канцерогенный эффект. Связывание этого же вещества с глюкуроновой кислотой ведет к образованию нетоксичного глюкуронидного конъюгата.
Сульфатная и глюкуронидная конъюгации конкурируют за субстрат. Выбор пути – индивидуален.
5. Конъюгация с аминокислотами
Конъюгация с глутатионом
Аминокислоты, не всосавшиеся в клетки кишечника, используются микрофлорой толстой кишки в качестве питательных веществ. Ферменты бактерий расщепляют аминокислоты и превращают их в амины, фенолы, индол, скатол, сероводород и другие ядовитые для организма соединения. Этот процесс

иногда называют гниением белков в кишечнике. В основе гниения лежат реакции декарбоксилирования и дезаминирования аминокислот.
Образование и обезвреживание n-крезола и фенола. Под действием ферментов бактерий из аминокислоты тирозина могут образовываться фенол и крезол путём разрушения боковых цепей аминокислот.
Всосавшиеся продукты по воротной вене поступают в печень и подвергаются конъюгации с сернокислотным остатком (ФАФС) или с глюкуроновой кислотой. Продукты конъюгации хорошо растворимы в воде и выводятся с мочой через почки.
Образование конъюгатов крезола и фенола с серной кислотой

Образование и обезвреживание индола и скатола

В кишечнике из триптофана микроорганизмы образуют индол и скатол. У скатола частично разрушается боковая цепь, индол полностью ее лишен. Скатол и индол – ядовитые вещества, определяющие запах кала. Они также обезвреживаются в печени образуя, конъюгаты с серной или глюкуроновой кислотами, и выводятся с мочой.

Аминокислоты, не всосавшиеся в клетки кишечника, используются микрофлорой толстой кишки в качестве питательных веществ. Ферменты бактерий расщепляют аминокислоты и превращают их в амины, фенолы, индол, скатол, сероводород и другие ядовитые для организма соединения. Этот процесс иногда называют гниением белков в кишечнике. В основе гниения лежат реакции декарбоксилирования и дезаминирования аминокислот.

Образование и обезвреживание n-крезола и фенола.

Под действием ферментов бактерий из аминокислоты тирозина могут образовываться фенол и крезол путём разрушения боковых цепей аминокислот.

Всосавшиеся продукты по воротной вене поступают в печень и подвергаются конъюгации с сернокислотным остатком (ФАФС) или с глюкуроновой кислотой. Продукты конъюгации хорошо растворимы в воде и выводятся с мочой через почки.

Образование конъюгатов крезола и фенола с серной кислотой

Образование и обезвреживание индола и скатола В кишечнике из триптофана микроорганизмы образуют индол и скатол. У скатола частично разрушается боковая цепь, индол полностью ее лишен. Скатол и индол – ядовитые вещества, определяющие запах кала. Они также обезвреживаются в печени образуя, конъюгаты с серной или глюкуроновой кислотами, и выводятся с мочой.

I Перечень вопросов для проверки конечного уровня знаний:

1. Метаболизм этанола в печени.
2. Механизм обезвреживания этанола в печени.
3. Основные пути биотрансформации чужеродных соединений (окисление, восстановление, гидролиз, синтез).
4. Ферментативные реакции 1-й фазы биотрансформации.
5. Ферменты реакций окисления ксенобиотиков.

II Самостоятельная работа обучающихся: составить ментальную карту по теме: «Метаболизм этанола в печени».

III Список используемой литературы:

Обязательная:

1.Е.С. Северин «Биохимия», Москва 2004;
2.Е.С. Северин «Биохимия с упражнениями и задачами», Москва 2008;

Дополнительная:

1.Интернет ресурсы
2.Материал конспектов занятия

Тема: Свертывание крови и фибринолиз. Тромбоцитарный и сосудистый гемостаз. Внутриклеточная сигнализация и структура тромбоцита.

I Научно-методическое обоснование темы:

Кровь – внутренняя среда организма (специализированная соединительная ткань), состоящая из плазмы и взвешенных в ней форменных элементов. Кровь выполняет следующие функций: транспортную; дыхательную; питательную; экскреторную; терморегулирующую; регуляторную; защитную; гомеостатическую.

Гемокоагуляция— это многокомпонентный цепной каскадный ферментативный процесс, в ходе которого происходит взаимодействие и последовательная активация ряда ферментов, заканчивающийся превращением растворимого фибриногена в нерастворимый фибрин.

Фазы гемокоагуляции:

Образование протромбиназы (4 мин 50 с – 6 мин 50 с)

Вторая фаза — образование тромбина (2–5 с)

Третья фаза — образование фибрина (2–5 с)

Четвертая (посткоагуляционная) фаза — ретракция тромба

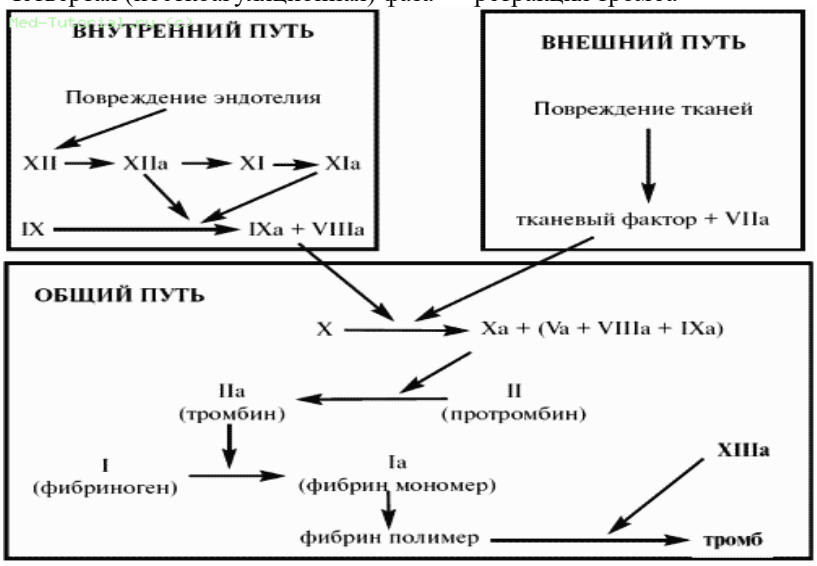


Схема 1. Первая фаза гемокоагуляции

В остановке кровотечения различают 3 этапа. На 1 этапе происходит сокращение кровеносного сосуда. 2 этап: прикрепление к месту повреждения Тr, (тромбоцитарную пробку, **белый тромб**). На 3 этапе растворимый белок плазмы крови фибриноген превращается в нерастворимый белок фибрин, который откладывается между тромбоцитами, и формируется прочный фибриновый тромб (**красным тромбом)**. При этом происходит ряд ферментативных реакций, сопровождающихся превращением фибриноген в фибрин. Факторами свёртывания синтезируются в основном в печени и клетках крови в виде неактивных предшественников, обозначаются римскими цифрами, но имеют и тривиальные названия (табл. 1). Большинство этих белков активируется в каскаде ферментативных реакций свёртывания крови.

Таблица 1. Основные функции и содержание в плазме крови факторов свёртывания крови

Ф	**Тривиальное название**	**г/л**	**Функции**
1	2	3	4
I	Фибриноген	2-4	Растворимый белок-предшественник фибрина
Ia	Фибрин		Образует фибриновый гель
II	Протромбин	0,1	Профермент*
IIa	Тромбин		Протеаза, превращающая фибриноген в фибрин и активирующая факторы V, VII, VIII, XIII, C
III	Тканевый фактор		Белок-активатор мембранного комплекса VIIa-ТФ-Ca^{2+}
IV	Ca^{2+}	0,9-1,2 **ммоль/л**	Опосредует взаимодействие ферментов прокоагулянтного пути с фосфатидилсерином
V	Проакцелерин	0,01	Предшественник белка-активатора мембранного

			комплекса Xa-Va-Ca^{2+}
Va	Акцелерин		Белок-активатор мембранного комплекса Xa-Va-Ca^{2+}
VII	Проконвертин	0,005	Профермент*
VIIa	Конвертин		Протеаза*, активирующая факторы X и IX
VIII	Неактивный антигемофильный фактор А (неакт. АГ глобулин)	0,01-0,02	Предшественник белка-активатора мембранного комплекса IXa-VIIIa-Ca^{2+}
VIIIa	Активный антигемофильный фактор А (акт. АГ глобулин)		Белок-активатор мембранного комплекса IXa-VIIIa-Ca^{2+}
IX	Неактивный антигемофильный фактор В (неакт.й фактор Кристмаса)	0,003	Профермент*
IXa	Активный антигемофильный фактор В (акт.фактор Кристмаса)		Протеаза*, активирующая фактор X
X	Неактивный фактор Стюарта-Прауэра	0,01	Профермент*
Xa	Активный фактор Стюарта-Прауэра		Протеаза*, активирующая фактор II
XI	Неакт. плазменный предшественник тромбопластина	0,005	Профермент контактного пути свёртывания крови
XIa	Активный плазменный предшественник тромбопластина		Протеаза, активирующая фактор IX
XII	Неактивный фактор Хагемана	0,03	Профермент контактного пути свёртывания крови
XIIa	Активный фактор Хагемана		Протеаза, активирующая фактор XI, прекалликреин, плазминоген
XIII	Неактивная трансглутамидаза (неакт. фибринста-билизирующий фактор)	0,01-0,02	Профермент
XIIIa	Активная трансглутамидаза (акт. фибринстабилизирующий фактор)		Катализирует образование амидных связей между молекулами фибрина-мономера, фибрином и фибронектином
	Прекашшкреин	0,05	Профермент контактного пути свёртывания крови
	Калликреин		Протеаза, активирующая фактор XII, плазминоген
	ВМК	0,06	Белок-активатор контактного пути свёртывания крови

* Содержит остатки карбоксиглутаминовой кислоты, необходимые для образования мембранных ферментных комплексов прокоагулянтного пути свёртывания крови.

Образование **фибринового тромба** начинается с превращения растворимого белка плазмы крови фибриногена в нерастворимый фибрин.

Фибриноген (фактор I) - гликопротеин с молекулярной массой 340 кДа, синтезируется в печени (8,02-12,9 мкмоль/л, или 2 - 4 г/л), состоит из 6 полипептидных цепей, связанных друг с другом дисульфидными связями. Обозначение: $A\alpha_2$, $B\beta_2$, γ_2. Заглавные буквы соответствуют тем участкам, которые отщепляются под действием тромбина при превращении фибриногена в фибрин. Фрагменты А в цепях Аα и В в цепях Вβ содержат большое количество остатков аспартата и глутамата. Это создаёт сильный «-» заряд на N-концах молекул фибриногена и препятствует их агрегации.

Молекула фибриногена состоит из трех глобулярных доменов, по одному на каждом конце молекулы (домены Д) и один в середине (домен Е). Домены отделены друг от друга участками полипептидных цепей, имеющими стержнеобразную конфигурацию. Из центрального домена Е выступают N-концевые фрагменты А и В цепей Аα и Вβ (рис. 1).

<u>В образовании фибринового тромба можно выделить 4 этапа:</u>

1. Превращение фибриногена в мономер фибрина. Сначала молекулы фибриногена освобождаются от отрицательно заряженных фрагментов А и В, в результате чего образуются мономеры фибрина.

Превращение фибриногена (фактор I) в фибрин (фактор 1а) катализирует фермент тромбин (фактор Па). В каждой молекуле фибриногена тромбин гидролизует четыре пептидные связи аргинилглицил, две из которых соединяют фрагменты А с α-цепью,

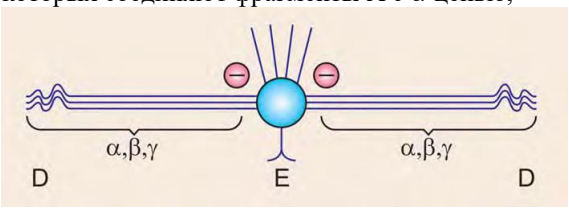


Рис. 1. Строение фибриногена.

Фибриноген состоит из шести полипептидных цепей: $A\alpha_2$, $B\beta_2$ и γ_2. А, В - отрицательнозаряженные фрагменты, благодаря которым молекулы фибриногена не агрегируют. Д, Е - глобулярные домены молекулы фибриногена. Домены отделены участками полипептидных цепей, имеющими стержнеобразную конфигурацию. Из центрального глобулярного домена Е выступают N-концевые участки фрагментов А и В цепей $A\alpha_2$ и $B\beta_2$, а две другие - В с β-цепью в $A\alpha_2$- и $B\beta_2$-цепях фибриногена. Мономер фибрина, образующийся из фибриногена, имеет состав $(\alpha, \beta, \gamma)_2$.

2.Образование нерастворимого геля фибрина - полимерный фибриновый сгусток. В результате превращения фибриногена в фибрин-мономер в домене Е открываются центры связывания с доменами D. Причём домен Е содержит центры агрегации, формирующиеся только после частичного протеолиза фибриногена под действием тромбина, а домен D является носителем постоянных центров агрегации. Первичная агрегация молекул фибрина происходит в результате взаимодействия центров связывания домена Е одной молекулы с комплементарными им участками на доменах D других молекул. Таким образом, между доменами молекул фибрина-мономера образуются нековалентные связи. При "самосборке" геля фибрина сначала образуются **двунитчатые протофибриллы**, в которых молекулы фибрина смещены друг относительно друга на 1/2 длины. После достижения протофибриллами определённой критической длины начинается их латеральная ассоциация, ведущая к образованию толстых фибриновых волокон (рис. 2). Образовавшийся гель фибрина непрочен, так как молекулы фибрина в нём связаны между собой нековалентными связями.

3.Стабилизация геля фибрина. В результате образования амидных связей между остатками лизина одной молекулы фибрина и остатками глутамина другой молекулы гель фибрина стабилизируется. Реакцию трансамидирования катализирует фермент трансглутамидаза (фактор XIIIa) (рис. 3). Фактор XIII активируется частичным протеолизом под действием тромбина.

Трансглутамидаза также образует амидные связи между фибрином и фибронектином - гликопротеином межклеточного матрикса и плазмы крови. Таким образом, тромб фиксируется в месте повреждения сосуда.

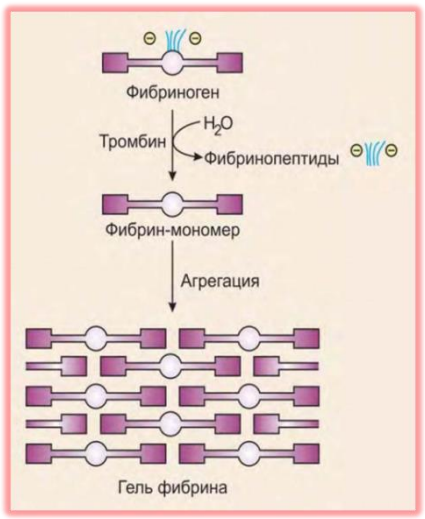


Рис. 2. Образование геля фибрина.

В образовании фибринового тромба можно выделить 4 этапа:

1. Превращение фибриногена в мономер фибрина.

2.Образование нерастворимого геля фибрина.

3.Стабилизация геля фибрина.

4. *Посткоагуляционный этап —Ретракция фибринового сгустка*

Фибриноген, освобождаясь под действием тромбина от отрицательно заряженных фрагментов (фибринопептидов 2А и 2В), превращается в фибрин-мономер. В результате взаимодействия комплементарных участков Е- и D-доменов фибрина-мономера происходит сначала линейная, а затем латеральная полимеризация молекул с образованием геля фибрина.

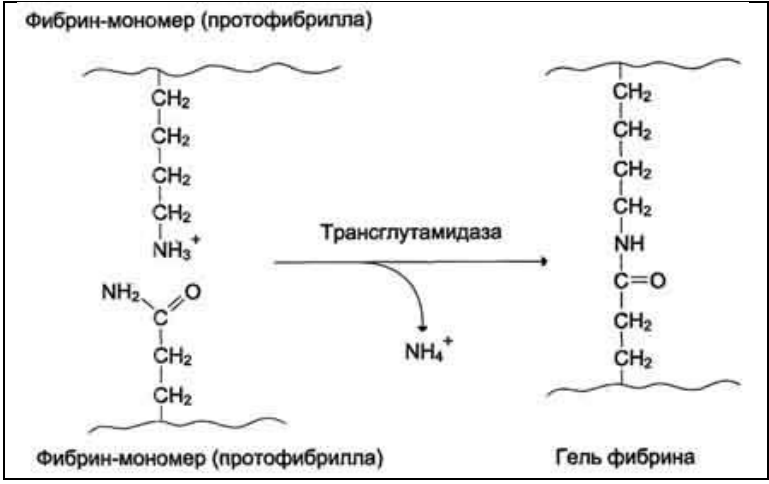


Рис. 3. Образование амидной связи между молекулами фибрина.

4. Ретракция фибринового сгустка. Сжатие (ретракцию) геля обеспечивает актомиозин тромбоцитов - сократительный белок тромбостенин, обладающий АТФ-азной активностью. Тромбостенин участвует также в активации и агрегации Tr. Ретракция кровяного сгустка предупреждает полную закупорку сосудов, создавая возможность восстановления кровотока.

В механизме образования тромба есть три функционально разных этапа: прокоагулянтный путь, контактный путь и антикоагулянтная фаза, препятствующая распространению тромба.

Б. Прокоагулянтный путь свертывания крови (внешний путь)

В активации ферментов каскада выделяют три основных механизма:

1. частичный протеолиз
2. взаимодействие с белками-активаторами
3. взаимодействие с модифицированными клеточными мембранами.

Прокоагулянтный путь занимает центральное место в свёртывании крови (рис. 4).

В циркулирующей крови содержатся проферменты протеолитических ферментов: факторы II, VII, IX, X. Находящиеся в крови факторы Va (акцелерин) и VIIIa (АГ фактор), а также мембранный белок - тканевый фактор (ТФ, ф.III) являются белками-активаторами этих ферментов.

При повреждении сосуда "включается" каскадный механизм активации ферментов с последовательным образованием трёх связанных с фосфолипидами клеточной мембраны ферментных комплексов. Каждый комплекс состоит из протеолитического фермента, белка-активатора и ионов Ca^{2+}: **VIIa-ТО-Ca^{2+}, IXa-VIIIa-Ca^{2+} (теназа), Xa-Va-Ca^{2+} (протромбиназа)**. Комплекс Xa-Va-Ca^{2+} (протромбиназный комплекс) активирует протромбин (ф. II). Каскад ферментативных реакций завершается образованием мономеров фибрина и последующим формированием тромба.

В активации ферментов каскада выделяют три основных механизма: частичный протеолиз, взаимодействие с белками-активаторами и взаимодействие с модифицированными клеточными мембранами.

Активация частичным протеолизом. Все ферменты прокоагулянтного пути являются сериновыми протеазами, синтезируются в печени в виде неактивных проферментов и в такой форме циркулируют в крови. В процессе реализации тромбогенного сигнала проферменты (факторы VII, IX, X и II) частичным протеолизом превращаются в активные ферменты.

Тромбин (фактор IIa) - гликопротеин с молекулярной массой 39 кД. Он образуется в крови из неактивного предшественника протромбина. Протромбин синтезируется в печени, имеет молекулярную массу 70 кДа и содержит остатки

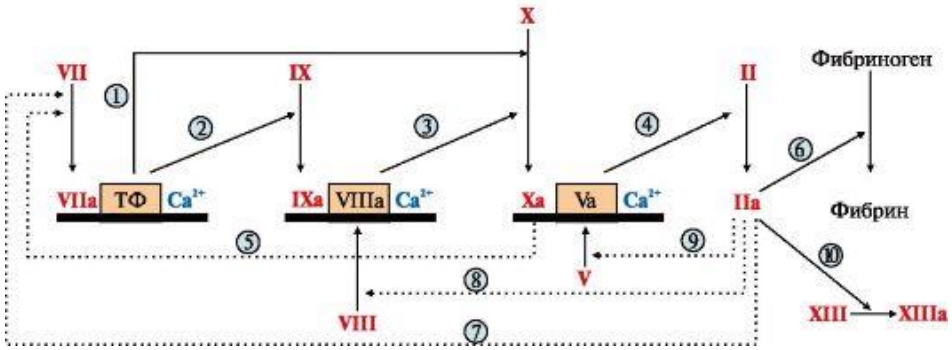


Рис. 4. Прокоагулянтный путь свёртывания крови. → активация факторов свертывания крови; ·····> активация факторов свертывания крови по принципу положительной обратной связи; ■ мембранный фосфолипидный компонент ферментных комплексов. В рамку обведены белки-активаторы. 1,2 - фактор VIIa мембранного комплекса VIIa-ТФ-CA^{2+} активирует факторы IX и X; 3 - фактор IXa мембранного комплекса IXa-VIIIa-Ca^{2+} активирует фактор X; 4, 5 - фактор Xa мембранного комплекса Xa-Va-Ca^{2+} превращает

протромбин (фактор II) в тромбин (фактор IIa) и активирует фактор VII; 6-10 - тромбин (фактор IIa) превращает нерастворимый фибриноген в растворимый фибрин, активирует факторы VII, VIII, V и XIII.

γ-карбоксиглутаминовой кислоты (0,1 г/л). Он фиксируется на мембранном ферментном комплексе **Xa-Va-Ca^{2+},** взаимодействуя, с одной стороны, остатками **γ**-карбоксиглутамата с Ca^{2+}, а с другой - непосредственно с белком-активатором Va. Фактор Xa гидролизует две пептидные связи в молекуле протромбина и образуется молекула тромбина, состоящая из двух цепей - лёгкой и тяжёлой, связанных между собой одной дисульфидной связью (рис. 5). Молекула тромбина не содержит остатков γ-карбоксиглутамата и освобождается из протромбиназного комплекса. Тромбин частичным протеолизом превращает фибриноген в фибрин и активирует факторы VII, VIII, V, XIII.

Тромбин выполняет ряд важных физиологических функций: является ферментом прокоагулянтного и контактного путей свёртывания крови, инициирует реакции антикоагулянтной фазы, вызывает агрегацию тромбоцитов и оказывает митогенное действие, участвуя в пролиферации и репарации клеток.

Частичным протеолизом активируются также факторы V и VIII, превращаясь, соответственно, в факторы Va и VIIIa. В результате активации этих факторов изменяется их конформация и повышается сродство к фосфолипидам мембран и ферментам, которые они активируют.

Функции тромбина:

- частичным протеолизом превращает фибриноген в фибрин
- активирует факторы VII, VIII, V, XIII
- активирует тромбоциты,вызывая их агрегацию
- оказывает митогенное действие, участвуя в пролиферации и репарации клеток.

Взаимодействие белков-активаторов с протеолитическими ферментами. Тканевый фактор, фактор Va и фактор VIIIa имеют центры связывания с фосфолипидами мембран и ферментами VIIa, IXa и Xa, соответственно. При связывании с белками-активаторами в результате конформационных изменений активность этих ферментов повышается.

Тканевый фактор (фактор III) представляет собой комплекс, состоящий из белка и фосфатидилсерина. Белковая часть тканевого фактора (апопротеин III) экспонирована на поверхности многих клеток (мозга, лёгких, печени, селезёнки и др.) и связана с фосфатидилсерином плазматических мембран. Однако появление апопротеина III на поверхности клеток, соприкасающихся с кровью (эвдотелиальных и моноцитов), происходит только при определённых условиях: при повреждении сосуда и/или нарушении нормальной асимметрии их плазматических мембран. Тканевый фактор в протеолитической активации не нуждается.

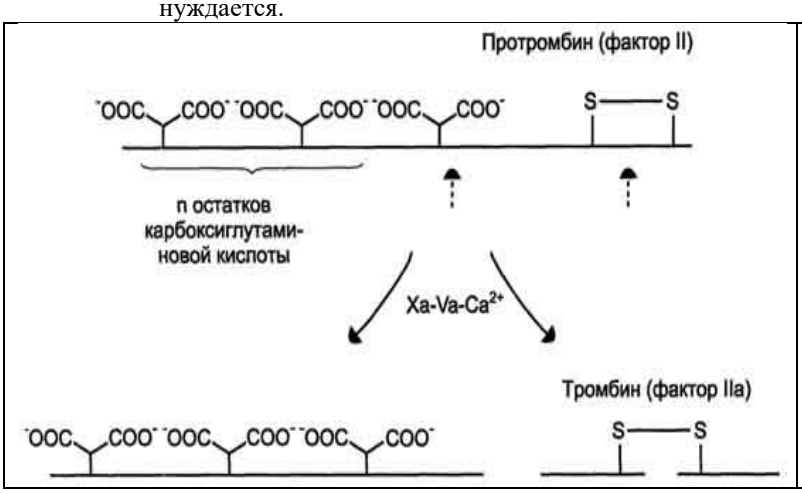


Рис.5. Протеолитическая активация протромбина фактором Xa протромбиназного комплекса. $^{-}OOC\diagdown\!\!\diagup COO^{-}$ — - остатки карбоксиглутаминовой кислоты; штрихстрелки указывают положение гидролизуемых в молекуле протромбина пептидных связей. Молекула протромбина состоит из одной полипептидной цепи, а образующийся в результате частичного протеолиза протромбина тромбин состоит из двух полипептидных цепей, связанных между собой одной дисульфидной связью.

Фактор V и фактор VIII - доменные белки, циркулирующие в крови. Фактор V синтезируется в печени, а фактор VIII - эндотелиальными клетками. Оба фактора активируются частичным протеолизом под действием тромбина. Фактор VIII в плазме крови находится в комплексе с белком - фактором тромбоцитов фон Виллебранда. Фактор фон Виллебранда в этом комплексе стабилизирует фактор VIII, препятствуя его разрушению прогеолитическим ферментом антикоагулянтной фазы фактором Са.

Взаимодействие ферментных комплексов с клеточными мембранами происходит с участием ионов Ca^{2+}. Все проферменты прокоагулянтного пути (II, VII, IX, X) содержат остатки у-кар-боксиглутаминовой кислоты, образующиеся в результате посттрансляционой модификации этих белков в ЭР гепатоцитов.

Остатки γ-карбоксиглутаминовой кислоты в факторах VIIa, IXa и Xa обеспечивают взаимодействие этих ферментов посредством Ca^{2+} с отрицательно заряженными фосфолипидами клеточных мембран. В отсутствие ионов Ca^{2+} кровь не свёртывается.

Роль витамина К в карбоксилировании остатков глутаминовой кислоты в проферментах прокоагулянтного пути свёртывания крови. Карбоксилирование остатков глутаминовой кислоты в проферментах прокоагулянтного пути катализирует карбоксилаза, коферментом которой служит восстановленная форма витамина К (нафтохинона) - дигидрохинон витамина К.

Поступивший в организм витамин К (нафтохинон) восстанавливается в печени NADPH-зависимой витамин К редуктазой с образованием дигидрохинона витамина К. В ходе реакции кар-боксилирования остатков

глутаминовой кислоты в проферментах прокоагулянтного пути дигидрохинон окисляется и эпоксидируется с образованием 2,3-эпоксида витамина К. Регенерация эпоксида в дигидрохинон витамина К происходит следующим образом: сначала 2,3-эпоксид витамина К восстанавливается в витамин К тиолзависимой эпоксидредуктазой, коферментом которой является белок, подобный тиоредоксину. Затем образующийся в этой реакции витамин К восстанавливается ферментом витамин К тиолзависимой редуктазой в дигидрохинон витамина К. Донором водорода в этой реакции, так же, как и в предыдущей, служит тиоредоксинподобный белок (рис. 6). Недостаточность витамина К приводит к нарушению карбоксилирования проферментов прокоагулянтного пути и сопровождается кровоточивостью, подкожными и внутренними кровоизлияниями.

Структурные аналоги витамина К дикумарол и варфарин ингибируют тиолзависимые ферменты витамин К 2,3-эпоксидредуктазу и витамин К редуктазу, вызывая торможение свёртывания крови (рис. 7). Эти препараты применяют в клинической практике для предупреждения тромбозов.

Инициация каскада реакций прокоагулянтного пути. Ферментные мембранные комплексы прокоагулянтного пути образуются только при наличии на внешней поверхности плазматической мембраны клеток тканевого фактора и отрицательно заряженных фосфолипидов. Поперечная асимметрия плазматических мембран, в частности, определяется преобладанием в наружном слое нейтральных фосфолипидов (фосфатидил-холина и сфингомиелина), а во внутреннем - отрицательно заряженных (фосфатидилинозитол-бисфосфата и фосфатидилсерина). Специальная ферментная сисгема обеспечивает трансмембранный перенос и такое распределение фосфолипидов в клеточных мембранах, при котором в норме внешняя поверхность плазматических мембран клеток не заряжена.

При нарушении поперечной асимметрии мембран тромбоцитов и эндотелиальных клеток на их поверхности формируются отрицательно заряженные (тромбогенные) участки и экспонируется апопротеин III тканевого фактора. Такие нарушения могут возникнуть при физической травме. В этом случае тканевый фактор и внутренняя поверхность клеточной мембраны становятся доступными для плазменных факторов прокоагулянтного пути. Кроме того, взаимодействие сигнальных молекул, вызывающих тромбогенез, с рецепторами эндотелиальных клеток и тромбоцитов активирует Ca^{2+}-зависимые регуляторные системы. В конечном итоге это приводит к повышению содержания в цитоплазме Ca^{2+}, который ингибирует АТФ-зависимую аминофосфолипидтранслоказу. Этот фермент играет важную роль в сохранении поперечной асимметрии мембран, так как переносит фосфатидилсерин из внешнего липидного слоя во внутренний. Снижение активности аминофосфолипидтранслоказы приводит к увеличению содержания во внешнем слое клеточной мембраны фосфатидилсерина и образованию отрицательно заряженных участков, необходимых для формирования мембранных ферментных комплексов. Кроме того, в результате такого нарушения структуры плазматической мембраны на её внешней поверхности экспонируется тканевый фактор и формируется первый ферментный комплекс прокоагулянтного пути свёртывания крови VII-ТФ-Ca^{2+}.

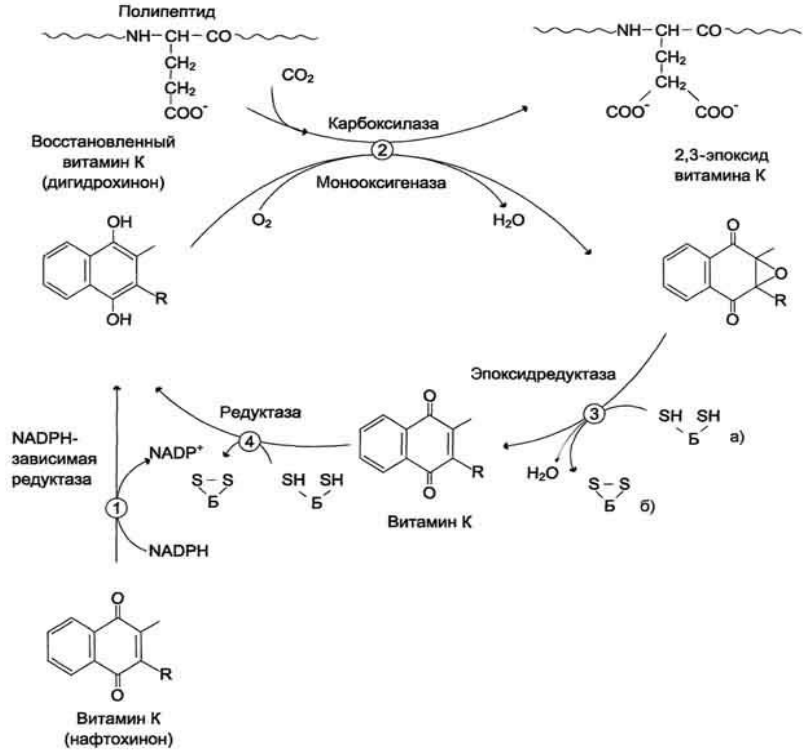


Рис. 6. Роль витамина К в посттрансляционном карбоксилировании глутаминовой кислоты. 1 - восстановление экзогенного витамина К NADPH-зависимой редуктазои; 2 - γ-карбоксилирование остатков глутаминовой кислоты в факторах II, VII, IX, X, протеине С витамин К зависимой карбоксилазой сопровождается окислением дигидрохинона с образованием 2,3-эпоксида витамина К; 3 - восстановление 2,3-эпоксида тиолзависимои витамин К редуктазои; 4 - восстановление витамина К тиолзависимои витамин К редуктазои; а) и б) - восстановленная и окисленная формы тиоредоксинподобного белка.

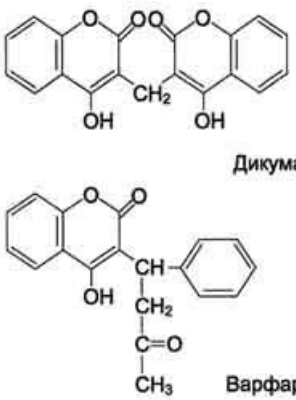


Рис. 7. Структурные аналоги витамина К дикумарол и варфарин.

Активация ферментов каждого комплекса - результат взаимодействия всех его компонентов. Если факторы IX, X и II требуют активации, то фактор VII обладает невысокой протеолитической активностью. Фактор VII мембранного комплекса VII-ТФ-Ca^{2+} частичным протеолизом активирует факторы IX и X. Активные факторы IXa и Xa включаются в образование мембранных комплексов IXa-VIIIa-Ca^{2+} и Xa-Va-Ca^{2+}. При этом фактор Xa протеолитически активирует фактор V, а протромбиназный комплекс не только превращает протромбин в тромбин, но и активирует фактор VII, протеолитическая активность которого в комплексе VIIa-Тф-Ca^{2+} в 10 000 раз выше, чем в комплексе VII-Тф-Ca^{2+}.

Образовавшийся в результате каскада реакций тромбин катализирует реакции частичного протеолиза фибриногена, фактора XIII и по принципу положительной обратной связи протеолитически активирует факторы V, VII и VIII.

В процессе свёртывания действуют 2 механизма усиления сигнала: каскад реакций, в котором каждое ферментативное звено обеспечивает усиление сигнала, и положительные обратные связи.

Контактный путь свертывания крови

Контактный путь свёртывания крови начинается с взаимодействия профермента фактора XII с повреждённой эндотелиальной поверхностью сосудистой стенки.

Такое взаимодействие приводит к активации фактора XII и инициирует образование мембранных ферментных комплексов контактной фазы свёртывания. Они содержат ферменты калликреин, факторы XIa (плазменный предшественник тромбопластина) и XIIa (фактор Хагемана), а также белок-активатор - высокомолекулярный кининоген (ВМК) (рис. 8).

Фактор XII - профермент, циркулирующий в крови. Он последовательно активируется двумя способами: сначала в результате изменения конформации при взаимодействии с отрицательно заряженной поверхностью повреждённого эндотелия, затем частичным протеолизом мембранным комплексом калликреин-ВМК.

Высокомолекулярный кининоген - белок-активатор в ферментных мембранных комплексах XIIa-ВМК, XIa-ВМК и калликреин-ВМК. ВМК - гликопротеин плазмы крови, который синтезируется в печени и имеет молекулярную массу 120 кД. Он опосредует взаимодействие протеолитических ферментов контактной фазы свёртывания крови с коллагеном субэндотелия и, кроме того, является компонентом каллик-реин-кининовой системы.

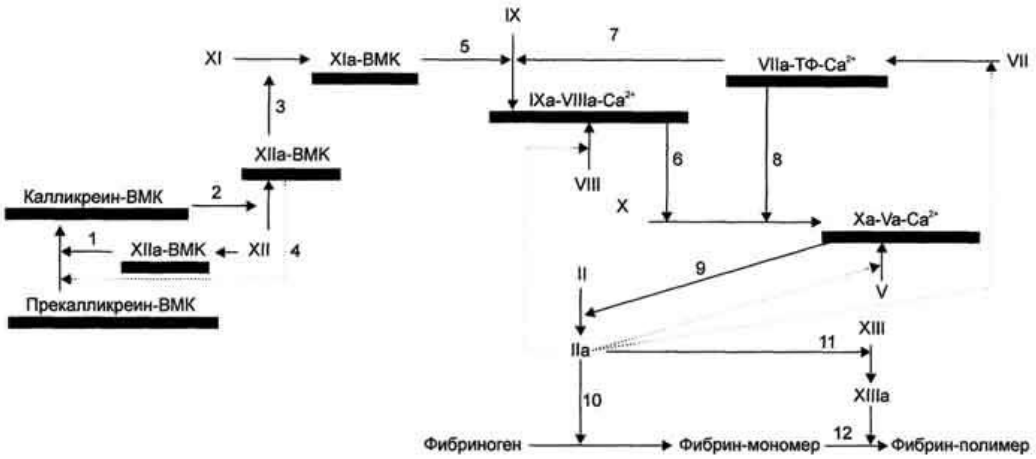


Рис. 8. Схема прокоагулянтного (внешнего) и контактного (внутреннего) путей свёртывания крови. Обозначения: ВМК - высокомолекулярный кининоген; ТФ - тканевый фактор; → - активация факторов свёртывания крови; ⋯> активация факторов свёртывания по принципу положительной обратной связи; - мембранный фосфолипидный компонент ферментных комплексов. Все ферменты мембранных комплексов свертывающей системы крови являются протеазами и активируются частичным протеолизом. 1 - активированный в результате контакта с субэндотелием фактор XII превращает прекалликреин в калликреин; 2 - калликреин мембранного комплекса калликреин-ВМК активирует фактор XII; 3 - фактор

XIIa активирует фактор XI; 4 - активированный частичным протеолизом фактор XIIa превращает прекалликреин в калликреин по принципу положительной обратной связи; 5 - фактор XIa мембранного комплекса XIa-ВМК активирует фактор IX; 6 - фактор (Xa мембранного комплекса IXa-VIIIa-Ca^{2+} активирует фактор X; 7, 8 - фактор VIIa мембранного комплекса VIIa-Тф-Ca^{2+} активирует факторы IX и X; 9 - фактор Xa протромбиназного комплекса активирует фактор II; 10, 11 - тромбин (фактор II) превращает фибриноген в фибрин и активирует фактор XIII; 12 - фактор XIIIa катализирует образование амидных связей в геле фибрина.

Калликреин - сериновая протеаза, субстратами которой являются, кроме фактора XII, белки плазмы крови плазминоген (профермент, участвующий в растворении фибрина) и кининогены с низкой (69 кД) и высокой (120 кД) молекулярной массой. При частичном протеолизе кининогенов образуются регуляторные пептиды кинины. В частности, мощный вазодилятатор брадикинин повышает проницаемость сосудов и вызывает разрушение клеточных мембран эндотелия.

В результате контакта фактора XII с субэндотелием сосудов он активируется. Активный фактор XIIa в комплексе с ВМК протеолитически превращает прекалликреин, связанный с мембраной посредством ВМК, в калликреин. Мембранный комплекс калликреин-ВМК по принципу положительной обратной связи частичным протеолизом активирует фактор XII. При этом фактор XII приобретает максимальную ферментативную активность и по принципу положительной обратной связи активирует связанный с ВМК прекалликреин. Кроме того, образовавшийся в результате частичного протеолиза фактор XIIa протеолитически активирует фактор XI, а фактор XIa в составе ферментного комплекса XIa-ВМК активирует фактор IX. Фактор IXa мембранного комплекса 1Xa-VIIIa-Ca^{2+} активирует фактор X, который в составе протромбиназного комплекса активирует протромбин.

Каскад реакций, ведущий к образованию тромбина, может реализоваться двумя путями - прокоагулянтным (внешним) и контактным (внутренним) (рис. 8). Для инициации реакций внешнего пути необходимо появление тканевого фактора на внешней поверхности плазматической мембраны клеток, соприкасающихся с кровью. Внутренний путь начинается с активации фактора XII при его контакте с повреждённой поверхностью эндотелия сосудов и взаимной активации ферментов прекалликреина и фактора XII.

Таким образом, в прокоагулянтном и контактном путях свёртывания крови последовательное образование мембранных ферментных комплексов приводит к активации фактора X и образованию протромбиназы. Этапы, одинаковые для обоих путей свёртывания крови, называют общим путём свёртывания крови. В настоящее время понятие о внутреннем и внешнем путях свёртывания считают достаточно условным, так как стало ясно, что комплекс УПа-ТФ-Ca^{2+} более эффективно активирует фактор IX, чем фактор X, а фактор VII активируется фактором 1Xa, хотя и значительно медленнее по сравнению с активацией фактором Xa. Следовательно, можно полагать, что каскад реакций свёртывания крови идёт преимущественно в линейной последовательности, а не по двум относительно независимым путям. Контактный путь, очевидно, не является абсолютно необходимым для инициации свёртывания; по-видимому, он служит для сопряжения системы свёртывания крови с различными регуляторными сисгемами организма, например, калликреин-кининовой и системой ферментов фиб-ринолиза, растворяющей тромб.

Кровь здорового человека *in vitro* свёртывается за 5-10 мин. При этом образование протромбиназного комплекса занимает 5 - 8 мин, активация протромбина - 2-5 с и превращение фибриногена в фибрин - 2-5 с.

Снижение свёртываемости крови. При снижении свёртываемости крови наблюдают заболевания, сопровождающиеся повторяющимися кровотечениями. Гемофилии - наследственные болезни, характеризующиеся повышенной кровоточивостью. Причиной этих кровотечений (спонтанных или вызванных травмой) является наследственная недостаточность белков свёртывающей системы крови.

Гемофилия А (классическая гемофилия) обусловлена мутацией гена фактора VIII, локализованного в X хромосоме. Классическая гемофилия составляет 80% всех случаев заболевания гемофилией. Гемофилия В встречается реже и обусловлена генетическим дефектом фактора IX.

Дефект гена фактора VIII проявляется как рецессивный признак, поэтому этой формой гемофилии болеют только мужчины. Это заболевание сопровождается подкожными, внутримышечными и внутрисуставными кровоизлияниями, иногда опасными для жизни. Дефект фактора VIII встречается примерно у одного из 10 000 новорождённых. Больных лечат препаратами, содержащими фактор VIII, получаемыми из донорской крови или методами генной инженерии.

<u>Противосвертывающая система крови</u>

1. ингибиторы ферментов свёртывания крови - инактивируют активные ферменты в кровяном русле
2. антикоагулянтная фаза - вызывает торможение каскада реакций свёртывания крови

1. Физиологические ингибиторы свёртывания крови играют важную роль в поддержании гемостаза, так как они сохраняют кровь в жидком состоянии и препятствуют распространению тромба за пределы повреждённого участка сосуда.

<u>Тромбин</u>, образующийся в результате реакций прокоагулянтного и контактного путей свёртывания крови, вымывается током крови из тромба. Он может инактивироваться при взаимодействии с ингибиторами ферментов свёртывания крови или активировать антикоагулянтную фазу, тормозящую образование тромба.

Белок плазмы крови **антитромбин III** - наиболее сильный ингибитор свёртывания крови; на его долю приходится около 80-90% антикоагулянтной активности крови. Он инактивирует ряд сериновых протеаз крови: тромбин, факторы IXa, Xa, XIIa, калликреин, плазмин и урокиназу. <u>Не ингибирует</u> фактор VIIIa и не

влияет на факторы в составе мембранных комплексов, а устраняет ферменты, находящиеся в плазме крови, препятствуя распространению тромбообразования в кровотоке.

Взаимодействие антитромбина с ферментами свёртывания крови ускоряется в присутствии гепарина. **Гепарин** - гетерополисахарид, который синтезируется в тучных клетках. В результате взаимодействия с гепарином антитромбин III приобретает конформацию, при которой повышается его сродство к сериновым протеазам крови. После образования комплекса антитромбин III-гепарин-фермент гепарин освобождается из него и может присоединяться к другим молекулам антитромбина.

При наследственном дефиците антитромбина III в молодом возрасте наблюдают тромбозы и эмболии сосудов, опасные для жизни.

α_2**-Макроглобулин** образует комплекс с сериновыми протеазами крови. В таком комплексе их активный центр полностью не блокируется, и они могут взаимодействовать с субстратами небольшого размера. Однако высокомолекулярные субстраты, например фибриноген, становятся недоступными для действия протеаз в комплексе α_2-макроглобулинтромбин.

Антиконвергин (тканевый ингибитор внешнего пути свёртывания) синтезируется в эндотелии сосудов. Он специфически соединяется с ферментным комплексом **Тф-VIIa-Ca^{2+},** после чего улавливается печенью и разрушается в ней.

α_1**-Антитрипсин** ингибирует тромбин, фактор XIa, калликреин, однако он не рассматривается как важный ингибитор факторов свёртывания крови, α_1-Антитрипсин в основном на тканевом уровне ингибирует панкреатические и лейкоцитарные протеазы, коллагеназу, ренин, урокиназу.

Пептиды, образующиеся в результате протеолитической активации проферментов и профакторов, тоже обладают выраженными антикоагулянтными свойствами, но механизм их действия в настоящее время не выяснен.

2. Антикоагулянтная фаза - ограничивает время существования активных факторов в крови и инициируется самим тромбином. Тромбин: ускоряет свёртывание крови, являясь последним ферментом каскада реакций коагуляции, и тормозит его, вызывая образование ферментных комплексов антикоагулянтной фазы на неповреждённом эндотелии сосудов. Этот этап представляет собой короткий каскад реакций, в котором кроме тромбина участвуют белок-активатор **тромбомодулин** (Тм), **витамин К-зависимая сериновая протеаза протеин С**, **белок-активатор S** и факторы Va и VIIIa (рис. 9). В каскаде реакций антикоагулянтной фазы последовательно образуются 2 мембранных комплекса IIa-Тм-Ca^{2+} и Ca-S-Ca^{2+}.

Тромбомодулин - интегральный белок мембран эндотелиальных клеток. Он не требует протеолитической активации и служит белком-активатором тромбина. Тромбин приобретает способность активировать протеин С только после взаимодействия с тромбомодулином, причём связанный с тромбомодулином тромбин не может превращать фибриноген в фибрин, не активирует фактор V и тромбоциты.

Протеин С - профермент, содержащий остатки γ-карбоксиглутамата. Тромбин в мембранном комплексе IIa-Тм-Ca^{2+} активирует частичным протеолизом протеин С. Активированный протеин С (Ca) образует с белком-активатором S мембраносвязанный комплекс Ca-S-Ca^{2+}.

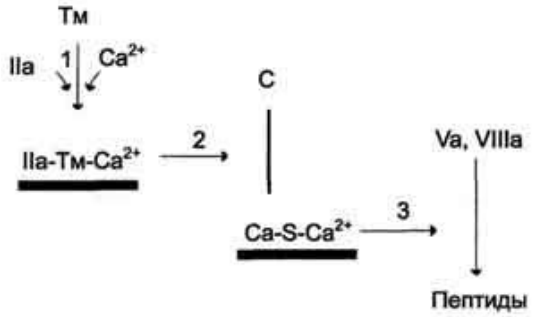


Рис. 9. Антикоагулянтная фаза. Тм - тромбомодулин; С - протеин С; Са - активный протеин С; S - протеин S; жирные линии - мембранно-связанный комплекс. 1 - тромбин (На) образует мембранный комплекс с белком тромбомодулином (Тм); 2 - тромбин в составе мембранного комплекса Иа-Тм-Ca^{2+} активирует протеин С; 3 - активированный протеин С в составе ферментного мембранного комплекса Ca-S-Ca^{2+} гидролизует по 2 пептидные связи в факторах Va и VIIIa и превращает их в неактивные пептиды.

Са в составе этого комплекса гидролизует в факторах Va и VIIIa по две пептидные связи и инактивирует эти факторы. Под действием комплекса Ca-S-Ca^{2+} в течение 3 мин. теряется 80% активности факторов VIIIa и Va. Таким образом, тромбин по принципу положительной обратной связи не только ускоряет своё образование, но и, активируя протеин С, тормозит процесс свёртывания крови.

Наследственный дефицит протеина С и S ведёт к снижению скорости инактивации факторов VIIIa и Va и сопровождается тромботической болезнью. Мутация гена фактора V, при которой синтезируется фактор V, резистентный к протеину С, также приводит к тромбогенезу.

Роль тромбоцитов в гемостазе

Способность Tr прилипать к повреждённой поверхности стенки сосуда (адгезия) и друг к другу (агрегация), связываться с фибрином, образуя тромбоцитарный тромб, и секретировать в месте повреждения сосуда гемостатические факторы определяет их роль в гемостазе.

Циркулирующие в крови Tr имеют дисковидную форму и не прилипают к неповреждённому эндотелию сосудов. Адгезию и агрегацию предотвращают взаимное отталкивание Tr и интактного эндотелия, а также простациклин (PG 12). Механизм действия некоторых индукторов и репрессора агрегации тромбоцитов рассмотрен на рис.10.

Простациклин образуется из арахидоновой кислоты в эндотелиии сосудов и поступает в кровь. Синтез и секрецию простациклина эндотелиальными клетками стимулируют тромбин, гистамин, ангиотензин II и калликреин. Он действует через аденилатциклазную систему передачи сигнала. Взаимодействие простациклина с рецептором вызывает активацию протеинкиназы А (ПКА). Активная ПКА фосфорилирует и таким образом активирует Ca^{2+}-АТФ-азу и Ca^{2+}-транслоказу. Это приводит к снижению уровня содержания Ca^{2+} в цитоплазме Tr, сохранению ими дисковидной формы и снижению способности к агрегации.

Активация Tr сопровождается появлением на поверхности плазматической мембраны «-» заряженных участков, образованных фосфатидилсерином. Основные индукторы активации и агрегации тромбоцитов - фактор фон Виллебранда, коллаген, тромбин, АДФ.

Фактор фон Виллебранда - гликопротеин, присутствующий в плазме крови, эндотелии сосудов и а-гранулах тромбоцитов. При повреждении стенки сосудов коллаген, базальная мембрана и миоциты субэндотелия взаимодействуют с Tr посредством фактора фон Виллебранда. Плазматическая мембрана Tr содержит несколько типов рецепторов этого фактора. Фактор фон Виллебранда, взаимодействуя с рецепторами, действует на Tr через инозитолфосфатную систему (ИФ-система) передачи сигнала. В конечном итоге это приводит к повышению содержания Ca^{2+} в цитоплазме Tr и образованию комплекса **кальмодулин-4Ca^{2+} - миозинкиназа**. Фермент миозинкиназа в составе этого комплекса фосфорилирует сократительный белок **миозин**, который взаимодействует с актином с образованием актомиозина (тромбостенина). В результате этого Tr приобретают шиповидносферическую форму, облегчающую их взаимодействие друг с другом и с поверхностью повреждённого эндотелия.

Снижение концентрации фактора фон Виллебранда, уменьшение количества или изменение структуры его рецепторов ведут к нарушениям адгезии и агрегации Tr, что сопровождается кровоточивостью. Это наблюдают при синдроме Бернара - Сулье, обусловленном недостатком рецептора фактора фон Виллебранда гликопротеина Ia в Tr, и при болезни фон Виллебранда вследствие дефицита фактора фон Виллебранда.

Наиболее важные первичные индукторы активации Tr - тромбин и коллаген. Взаимодействие этих белков со специфическими рецепторами плазматической мембраны Tr приводит к мобилизации Ca^{2+} из плотной тубулярной системы в цитоплазму, что в конечном итоге вызывает их адгезию и агрегацию.

Коллаген вызывает в Tr активацию фосфолипазы A_2, которая освобождает арахидоновую кислоту из фосфолипидов их мембраны. Арахидоновая кислота служит субстратом для фермента циклооксигеназы (ЦОГ). В результате реакции, катализируемой циклооксигеназой, образуются циклические эндоперекиси простагландин G_2 (PG G_2) и простагландин H_2 (PG H_2). Эти простагландины под действием тромбоксансинтетазы превращаются в тромбоксан A_2. Тромбоксан A_2 снижает уровень цАМФ и, активируя фосфолипазу С, ускоряет освобождение Ca^{2+} из плотной тубулярной системы (рис. 10).

Тромбин взаимодействует со специфическим рецептором - интегральным белком, имеющим 7 трансмембранных доменов. Тромбин активирует рецептор частичным протеолизом, отщепляя от него N-концевой пептид, находящийся на внешней плазматической поверхности тромбоцита. Следовательно, тромбин, в отличие от других активаторов, действует каталитически, и одна молекула тромбина может активировать несколько рецепторов. Передача сигнала осуществляется через ИФ_систему, в результате чего в тромбоците повышается концентрация Ca^{2+} и активируется ПК С.

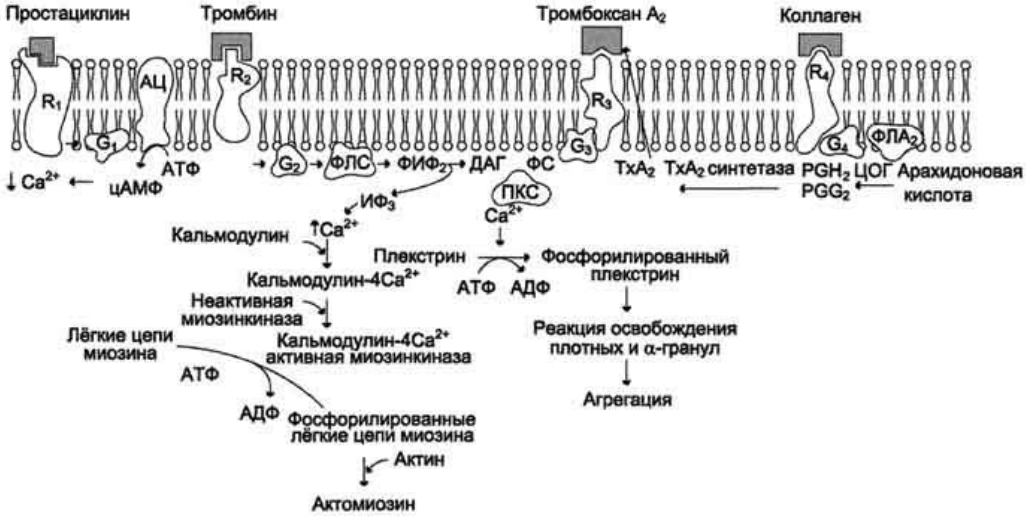


Рис. 10. Механизм действия простациклина, тромбоксана.

Образующийся комплекс кальмодулин-4Ca^{2+}-миозинкиназа фосфорилирует миозин, взаимодействие которого с актином приводит к изменению формы Tr, к их адгезии и агрегации. ПК С, кроме того, фосфорилирует белок Tr плекстрин. **Фосфорилированный плекстрин** вызывает "реакцию освобождения" содержащихся в гранулах Tr вторичных индукторов активации и агрегации Tr. К этим веществам относят содержащиеся в плотных гранулах Tr АДФ, Ca^{2+}, ГДФ, серотонин, гистамин и присутствующие в

осгранулах белок β-тромбоглобулин, фактор фон Виллебранда, белок фибронектин, тромбосподин и ВМК. **Тромбосподин** участвует во взаимодействии тромбоцитов друг с другом. β-Тромбоглобулин снижает секрецию простациклина и связывает гепарин. **Фибронектин** имеет центры связывания для коллагена, гепарина и тромбоцитов.

АДФ содержится в Tr, а также попадает в кровь при разрушении эритроцитов. АДФ взаимодействует со специфическими рецепторами и подавляет активность аденилатциклазы. Это вызывает увеличение мобилизации внутриклеточного Ca^{2+} и в конечном итоге приводит к агрегации Tr.

Активация Tr, таким образом, сопровождается изменением их метаболизма и освобождением биологически активных веществ. Эти вещества вызывают морфологические изменения, адгезию, агрегацию Tr и участвуют в образовании тромба.

Нарушение функциональной активности рецепторов и системы вторичных посредников Tr приводит к изменению их функции и может явиться причиной ряда заболеваний, сопровождающихся тромбозами или кровотечениями.

Лекарственные препараты, нарушающие агрегацию тромбоцитов, используют для предупреждения возникновения тромбозов. **Аспирин** (ингибитор циклооксигеназы), никотиновая кислота (ингибитор тромбоксансинтетазы) и Ca^{2+}-блокаторы угнетают агрегацию тромбоцитов, влияя на разные этапы реализации тромбогенного сигнала.

Тромб растворяется в течение нескольких дней после образования.

Фибринолиз - ферментативное расщепление волокон фибрина с образованием растворимых пептидов, которые удаляются из сосудистого русла. Разрушение фибрина в составе тромба происходит под действием сериновой протеазы плазмина.

Плазмин образуется из плазминогена под действием активаторов. Неактивный профермент плазмина плазминоген синтезируется в печени, почках и костном мозге.

Тканевый активатор плазминогена (ТАП) - протеолитический фермент, содержащийся в эндотелии сосудов всех тканей, кроме печени. Поступление этого активатора в кровь увеличивается при эмоциональном напряжении, боли, венозной тромбоэмболии, умеренной физической работе. ТАП частичным протеолизом превращает неактивный плазминоген в активный плазмин. Активаторами плазминогена также служат фактор XIIa и калликреин.

Растворение фибринового сгустка происходит при взаимодействии фибрина, плазминогена и ТАП (рис. 11).

Формирование сети фибриновых волокон при образовании тромба сопровождается сорбцией на ней плазминогена и его активаторов. В молекуле плазмина и плазминогена есть участки, комплементарные доменам фибрина, причём одна молекула плазмина может связывать несколько молекул фибрина. Молекулы ТАП тоже имеют центры связывания с фибрином. Образующийся из плазминогена под действием ТАП плазмин гидролизует фибрин с образованием пептидов X и Y, активирующих фибринолиз, и пептидов D и E, его тормозящих. Растворимые пептиды X, Y, D, E поступают в кровоток и там фагоцитируются. Разрушение тромба приводит к освобождению из него плазмина и ТАП. В кровяном русле последние быстро инактивируются специфическими ингибиторами и улавливаются печенью.

ТАП ингибируется ингибиторами тканевого активатора плазмина первого (и-ТАП-1) и второго (и-ТАП-2) типов, а плазмин - α_2-антиплазмином или другими ингибиторами сериновых протеаз.

В почках синтезируется протеолитический активатор плазминогена урокиназа, которая, превращая плазминоген в плазмин, способствует освобождению почечных клубочков от фибриновых волокон. Из β-гемолитического стрептококка выделили белок стрептокиназу, образующий комплекс с плазминогеном, в котором плазминоген аутокаталитически превращается в плазмин.

Урокиназу, стрептокиназу и ТАП используют при тромболитической терапии инфаркта миокарда, тромбозах вен и артерий, гемодиализе.

Такие ингибиторы ферментов свёртывания крови, как α_2-макроглобулин, α_1-антитрипсин и комплекс антитромбин III-гепарин также обладают небольшой фибринолитической активностью.

Снижение фибринолитической активности крови сопровождается тромбозами. Нарушение разрушения фибринового сгустка может быть вызвано наследственным дефицитом плазмино-гена или генетическим дефектом его структуры, снижением поступления в кровь активаторов плазминогена, повышением содержания в крови ингибиторов фибринолиза (и-ТАП-1, и-ТАП-2, α_2-антиплазмина).

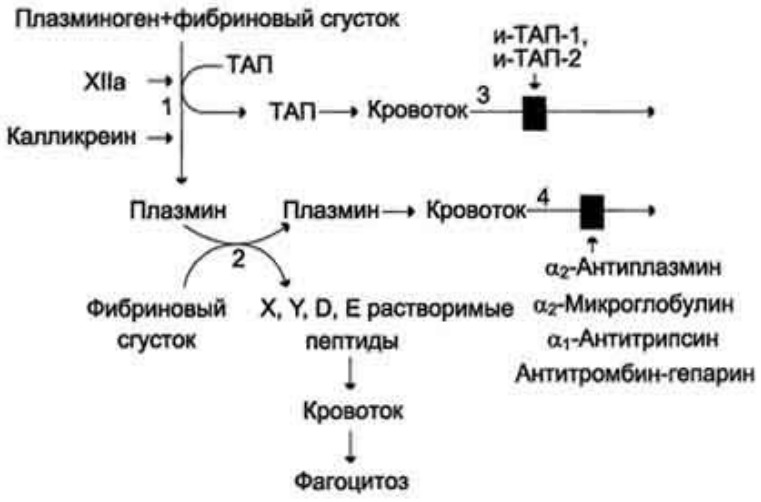


Рис. 11. Схема фибринолиза. 1 - абсорбированный на фибриновом сгустке плазминоген под действием активаторов (фактор XIIa, калликреин, ТАП) частичным протеолизом превращается в плазмин; 2 - плазмин гидролизует фибрин с образованием растворимых пептидов X, Y,D, E; 3 - в кровотоке ТАП инактивируется специфическими белками и-ТАП-1, и-ТАП-2; 4 - активность плазмина снижается под действием неспецифических ингибиторов сериновых протеаз (α_2-антиплазмина, α_2-макроглобулина, α_1-антитрипсина, комплекса антитромбин-гепарин).

Название заболевания	**Фактор, образование которого нарушено**
Афибриногенемия или гипофибриногенемия	Фактор I, фибриноген
Дисфибриногенемия	
Гипопротромбинемия	Фактор II, протромбин
Гипопроакцелеринемия	Фактор V, проакцелерин
Гипопроконвертинемия	Фактор VII, проконвертин
Гемофилии А, В, С	Фактор VIII, прокоагулянтный компонент комплекса фактора VIII; антигемофильный глобулин А,В

Наследственные и приобретённые нарушения гемостаза могут привести как к геморрагическим заболеваниям, характеризующимся кровоточивостью, так и к тромботической болезни. Однако следует отметить, что повышенная склонность к тромбообразованию и внутрисосудистому свёртыванию (тромбофилии) встречается гораздо чаще, чем гемофилии. Например, частота разных форм гемофилии колеблется в разных странах от 6 до 18 на 100 000 мужчин, в то время как тромбофилии, вызванные дефицитом антитромбина III, встречаются у 1-2 больных на 5000, а при недостатке протеина С - у одного на 15 000 человек.

II Цель деятельности обучающихся на занятии

Обучающийся должен знать:

1.Что такое коагуляция;
2.Какие этапы свертывания различают;
3.Перечислить факторы свертывания;
4.Как происходит образование фибринового (красного) тромба;
5.Фибриноген, строение и свойства;
6.описать первый этап гемокоагуляции: превращение фибриногена в мономер фибрина;
7.Как происходит образвание нерастворимого геля фибрина (2 этап);
8.Опишите 3 этап- стабилизация геля фибрина;
9.Как происходит ретракция фибринового сгустка (4 этап);
10.Прокоагулянтный путь свертывания крови (тромбин, тканевый фактор);
11.Противосвертывающая система крови;
12.Антиокагулянтная фаза (тромбомодулин, протеин С);
13.Ингибиторы ферментов свертывания крови (антитромбин III, **α_2**-макроглобулин, α_1-антитрипсин, антиконвертин);
14.Фибринолиз

ШОбучающийся должен уметь:

1. Написать схему свертывания крови

III Перечень лабораторных работ, наглядных пособий и средств ТСО.

Наглядные пособия:

Таблицы названия Схема 1. Первая фаза гемокоагуляции; Таблица 1. Основные функции и содержание в плазме крови факторов свёртывания крови; Рисунки: 1. Строение фибриногена; 2. Образование геля фибрина; 3. Образование амидной связи между молекулами фибрина; 4. Прокоагулянтный путь свёртывания крови.**;** 5.Протеолитическая активация протромбина фактором Ха протромбиназного комплекса; 6. Роль витамина К в посттрансляционном карбоксилировании глутаминовой кислоты; 7. Структурные аналоги витамина К дикумарол и варфарин; 8. Схема прокоагулянтного (внешнего) и контактного (внутреннего) путей свёртывания крови; 9. Антикоагулянтная фаза; 10. Механизм действия простациклина, тромбоксана; 11. Схема фибринолиза.

IV Перечень вопросов для проверки исходного уровня знаний:

1. Кровь, ее функции. Белковый спектр плазмы крови. Белки «острой фазы» и их клиническое значение;
2. Характеристика основных белковых фракций плазмы крови: альбуминов, глобулинов, фибриногена;
3. Гиперпротеинемия и гипопротеинемия;
4. Плазменные липопротеиды и гликопротеиды;
5. Иммуноглобулины, их классы, структура, синтез и роль в иммунитете;
6. Ферменты крови и их клиническое значение для диагностики заболеваний;
7. Важнейшие азотсодержащие соединения. Остаточный азот: азотемия**.** Азотемия ретенционная и продукционная.
8. Безазотистые органические компоненты крови.

V Перечень вопросов для проверки конечного уровня знаний:

1. Кровь, ее функции. Белковый спектр плазмы крови. Белки «острой фазы» и их клиническое значение;
2. Характеристика основных белковых фракций плазмы крови: альбуминов, глобулинов, фибриногена;
3. Гиперпротеинемия и гипопротеинемия;
4. Плазменные липопротеиды и гликопротеиды;
5. Иммуноглобулины, их классы, структура, синтез и роль в иммунитете;
6. Ферменты крови и их клиническое значение для диагностики заболеваний;
7. Важнейшие азотсодержащие соединения. Остаточный азот: азотемия**.** Азотемия ретенционная и продукционная.
8. Безазотистые органические компоненты крови.
9. Что такое коагуляция;
10. Какие этапы свертывания различают;
11. Перечислить факторы свертывания;
12. Как происходит образование фибринового (красного) тромба;
13. Фибриноген, строение и свойства;
14. описать первый этап гемокоагуляции: превращение фибриногена в мономер фибрина;
15. Как происходит образвание нерастворимого геля фибрина (2 этап);
16. Опишите 3 этап- стабилизация геля фибрина;
17. Как происходит ретракция фибринового сгустка (4 этап);
18. Прокоагулянтный путь свертывания крови (тромбин, тканевый фактор);
19. Противосвертывающая система крови;
20. Антиокагулянтная фаза (тромбомодулин, протеин С);
21. Ингибиторы ферментов свертывания крови (антитромбин III, α_2-макроглобулин, α_1-антитрипсин, антиконвертин);
22. Фибринолиз.

VI Самостоятельная работа обучающихся:

Составление тестов, задач и кроссвордов по данной теме.

Вопросы для самостоятельного обучения:

1. Описание гемофилии А;
2. Роль Тг в гемостазе;
3. Простациклин, фактор Виллибранда;
4. Первичные индукторы активации Тг- тромбин и коллаген;

VII Список используемой литературы:

Обязательная:

1. Березов Т.Т., Коровкин Б.Ф. Биологическая химия. Москва, 2004. 740 с.
2. Конспект лекций.
3. Дзугкоева Ф.С., Каряева Э.А., Гурина А.Е. и соавт. Биохимия основных процессов обмена веществ и гормональная регуляция: Учебное пособие с грифом УМО. Владикавказ, 2006. 198 с.

Дополнительная:

1. Северин Е.С., Алейникова Т.Л., Осипов Е.В. Биохимия. М.: Медицина, 2004.164 с.
2. Биохимические основы патологических процессов / Под ред. Е.С.Северина. М.: Медицина, 2000. 304 с.

16, 18.Молекулярные механизмы нарушений гемостаза. Биохимические принципы коррекции нарушений гемостаза. Эволюция системы гемостаза. Молекулярные механизмы ангиогенеза, иммунитета, репарации.

Исследования показали, что подавляющее большинство заболеваний сопровождается нарушениями в системе гемостаза. Патология гемостаза выражается либо гипокоагуляцией, либо гиперкоагуляцией, в ряде случаев смешанными нарушениями. Гипокоагуляция встречается сравнительно реже. Диагностика причин гипокоагуляции не всегда возможна в рамках стандартной, даже расширенной гемостазиограммы. Как правило, такие больные обследуются в специализированных лечебных учреждениях. Гиперкоагуляцией страдает большое число пациентов. Она проявляется у пациентов в виде тромбозов, тромбэмболий или тромбофилического состояния. Диагностика, лечение и контроль терапии, как правило, проводятся в лечебных учреждениях общего профиля.

Гипокоагуляция. Геморрагические заболевания.

Гипокоагуляция клинически проявляется геморрагическим синдромом - различного рода кровоизлияниями или кровотечениями, поэтому заболевания называются геморрагическими. Они могут быть связаны

- с патологией тромбоцитов,
- с падением ниже порога коагуляции факторов свертывания крови,
- с ингибированием факторов свертывания крови,
- с гиперфибринолизом,
- с патологией структуры капилляров.

Заболевания могут быть врожденными или приобретенными.

Патология тромбоцитарного звена.

Патология тромбоцитов выражается либо тромбоцитопенией (снижением содержания тромбоцитов), либо тромбоцитопатией – нарушением их функции. При данных видах патологии изменяется как минимум тромбоцитарно-сосудистое звено гемостаза. Такая патология, как правило, сопровождается микроциркуляторным петехиально-синячковым типом кровоточивости, при котором наблюдается появление петехий и мелких синячков на коже конечностей и туловища, носовые кровотечения, меноррагия, гематурия. Нарушения могут быть наследственными или приобретенными. Тромбоцитоз – повышение уровня тромбоцитов. Он может сопровождаться геморрагиями или тромбозами в зависимости от сохранности функции тромбоцитов. Тромбоцитоз имеет только приобретенный характер.

Тромбоцитопения – снижение содержания тромбоцитов ниже 150 тыс./мл.

Основные наследственные тромбоцитопении: синдромы Фанкони, Вискотта-Олдриха, аномалия Мэя-Хегглина.

Приобретенная тромбоцитопения может быть связана:

- с нарушением образования тромбоцитов при системных гематологических заболеваниях,
- с повышенным потреблением кровяных пластинок (ДВС-синдром, ангиоматоз).
- с повышенным разрушением тромбоцитов (гиперспленизм, ВИЧ-инфекция, системная красная волчанка, введение лекарств, том числе гепарина, повторные гемотрансфузии и др.). В большинстве случаев данный вид тромбоцитопении связан с иммунной патологией.

При подозрении на тромбоцитопению проводят подсчет тромбоцитов, оценивают их размер, определяют время кровотечения. При аутоиммунных процессах характерно появление гигантских тромбоцитов. Время кровотечения у большинства пациентов с тромбоцитопенией удлинено.

Тромбоцитопатии – объемная группа разнородных заболеваний. Большое место в этой группе занимают врожденные нарушения функции тромбоцитов: дефекты рецепторов тромбоцитов (например, дефект Гп Ib – синдром Бернара-Сулье, дефект Гп IIbIIIa – тромбастения Гланцмана), аномалии гранул пула хранения, нарушение метаболизма арахидоновой кислоты.

Болезнь Виллебранда связана с мутацией фактора vWF и является следствием качественных или количественных нарушений фактора Виллебранда. Строго говоря, она не относится к тромбоцитопатиям, но аномальный фактор нарушает адгезию тромбоцитов и приводит к появлению геморрагического синдрома, проявления которого зависят от типа болезни. Болеют как мужчины, так и женщины.

Нарушение функции тромбоцитов, снижение их тромбопластической активности и, как следствие, повышенную кровоточивость могут вызывать лекарства, системные гематологические заболевания, уремия, парапротеинемия и дисглобулинемия.

Доступными методами оценки тромбоцитарного звена гемостаза являются: подсчет количества тромбоцитов, определение их размера, оценка морфологии кровяных пластинок и определение времени кровотечения. Количество тромбоцитов при патологии кровяных пластинок может быть нормально или снижено, время кровотечения чаще удлинено. При тромбоцитопатиях, связанных с дефектом пула хранения белковых гранул, нарушается прокрашивание этих гранул в мазке крови (синдром «серых» тромбоцитов). При некоторых тромбоцитопатиях удлиняется АЧТВ и ПВ (протромбин в % по Квику, соответственно, снижается). В условиях специализированного лечебного учреждения для дифференциальной диагностики определяют дополнительно содержание фактора Виллебранда, фактора VIII, оценивают агрегацию тромбоцитов с адреналином, АДФ, коллагеном, ристоцетином, арахидоновой кислотой и другими индукторами агрегации.

Геморрагические коагулопатии.

К данной группе патологии относятся заболевания, обусловленные дефицитом или ингибированием факторов свертывания крови и гиперфибринолизом.

Дефицит факторов может быть врожденным, генетически обусловленным, или приобретенным. Врожденный дефицит факторов сопровождается кровоточивостью гематомного типа. При данном типе кровоточивости при небольших ушибах возникают кровоизлияния в полости суставов, живота, под фасции и др. У больных наблюдается отсроченное (через 1-2 ч) кровотечение из раны после операции, длительное кровотечение из лунки после удаления зуба. Иногда встречается смешанный гематомно-микроциркуляторный или микроциркуляторный тип кровоточивости.

Врожденный дефицит факторов обусловлен генетическими нарушениями. В настоящее время выявлены заболевания, связанные с дефектами всех факторов свертывания плазмы, хотя встречаются они крайне редко. Наиболее распространенными являются гемофилия А (недостаток фактора VIII, частота встречаемости 100 больных на 1 млн. населения), и гемофилия В (недостаток фактора IX, частота встречаемости 20 больных на 1 млн. населения). Оба вида гемофилии сцеплены с полом, поэтому болеют только мальчики. Впервые болезнь была описана в Вавилонском Талмуде в 5 веке в связи с наличием случаев смертельного кровотечения у мальчиков после обрезания. Гемофилия представляет собой выраженное нарушение свертывания крови с кровоизлияниями в подкожную клетчатку, суставы и мышцы и последующим повреждением данных органов и нервов. Кровотечения у гемофиликов без лечения приводят к смерти.

Приобретенная гипокоагуляция может быть связана с потреблением факторов (ДВС-синдром), наличием ингибиторов к факторам, с гиперфибринолизом, с лечением антикоагулянтами, с патологией печени и с некоторыми другими заболеваниями.

Наиболее частой и клинически важной причиной гипокоагуляции является дефицит витамин К-зависимых факторов. Витамин К частично синтезируется в кишечнике, частично поступает с пищей. Он относится к жирорастворимым витаминам, поэтому для его всасывания необходимо присутствие желчных кислот желчи как эмульгаторов жиров, и панкреатической липазы. При дефиците витамина К, врожденном или приобретенном, в печени нарушается синтез витамин-К-зависимых факторов – IIV, IX, X и II, а также протеинов С и S. Витамин К необходим на последней стадии образования факторов. Факторы, образующиеся без Витамина К, не могут обеспечивать полноценный гемостаз. Они называются PIVKA-факторами и могут быть определены иммунологическими методами.

Причинами дефицита полноценных витамин-К-зависимых факторов могут быть:

- нарушение синтеза витамина К у недоношенных новорожденных,
- недостаточное поступление витамина К из кишечника при дисбактериозах, длительном приеме антибиотиков широкого спектра действия, при резекции тонкой кишки,
- нарушение всасывания витамина К при холестазе,
- прием антагонистов витамина К – оральных антикоагулянтов (варфарин и др.).

Гипокоагуляция с геморрагией может проявляться при ряде общих и системных заболеваний и состояний. Заболевания печени с нарушением синтетической функции приводят к снижению всех факторов, кроме XIII (см. табл.2). При амилоидозе наблюдается дефицит фактора X, связанный с поглощением данного фактора амилоидом. При нефротическом синдроме снижается уровень фактора VII в связи с избыточным выделением данного фактора с мочой. При некоторых видах патологии наблюдается появление антител к различным факторам, что приводит к ингибированию факторов, появлению геморрагического синдрома и удлинению времени свертывания в тех тестах, где данный фактор задействован. Наличие

антител к факторам фиксировалось при лейкозах, миелодисплазиях, солидных опухолях, иммунно-аллергических синдромах, при укусах ос, на конечном этапе беременности и в раннем послеродовом периоде, и др. Наиболее часто антитела образуются к факторам VIII и Виллебранда, а также к факторам IX, V, VII и II.

Первичное выявление геморрагической коагулопатии возможно после проведения тестов стандартной коагулограммы по удлинению времени свертывания плазмы в том тесте, в котором участвует дефицитный фактор. Так, при дефиците фактора VII удлиняется ПВ, а при дефиците факторов VIII, IX и XI – АЧТВ, при дефиците протромбина (фактор II) будут удлинены оба показателя и т.д. В специализированных лечебных учреждениях дифференциальная диагностика осуществляется путем проведения уточняющих тестов.

Парапротеины и криоглобулины, которые образуются наиболее часто при иммунокомплексных заболеваниях и неопластических процессах, нарушают не только функции тромбоцитов, как указывалось ранее, но и влияют на результаты некоторых тестов плазменного гемостаза. Удлинение времени свертывания плазмы в тромбиновом тесте при нормальном содержании фибриногена и отсутствии тромбинемии (ПДФ и РФМК не увеличены), как правило, связано с парапротеинами, которые нарушают взаимодействие тромбина с фибриногеном и препятствуют полимеризации фибрина. Одновременное удлинение АЧТВ и ПВ в ряде случаев может быть обусловлено наличием криоглобулинов.

Одной из причин геморрагической коагулопатии является гиперфибринолиз (активный фибринолиз, фибринолитическое состояние). В физиологических условиях плазмин в кровотоке нейтрализуется естественными ингибиторами, и фибринолиз ограничен зоной фибринообразования, то есть гемостатической пробкой. Фоновая активность фибринолиза в плазме крови достаточно мала. У женщин во время менструации наблюдается локальная активация фибринолиза в сосудах матки, что обеспечивает отсутствие сгустков и беспрепятственное вытекание крови. При патологических состояниях фибринолиз может быть генерализованным, охватывая и фибрин сгустка, и фибриноген плазмы крови. Клинически гиперфибринолиз проявляется кровотечениями, а при истощении плазминогена – тромбозами.

Выделяют первичный и вторичный гиперфибринолиз. Первичный гиперфибринолиз вызывается гиперплазминемией при поступление в кровь больших количеств активаторов плазминогена. Он может быть вызван физической нагрузкой, стрессом или венозным стазом, опухолями, которые выделяют активаторы фибринолиза (опухоли яичников, поджелудочной железы, простаты, кишечника, промиелоцитарный лейкоз), хирургическими вмешательствами на органах, богатых активаторами фибринолиза (легкие, предстательная, поджелудочная и щитовидная железы). Крайне редко гиперфибринолиз наблюдается при наследственном избытке тканевого активатора плазминогена (t-PA) или при наследственном недостатке основного ингибитора плазмина α_2-антиплазмина.

Вторичный фибринолиз развивается в ответ на внутрисосудистое свертывание крови, тромбэмболические процессы различной локализации или введение фибринолитиков (стрептокиназа, актилизе и др.). Активация фибринолиза также наблюдается при массивных переливаниях консервированной крови, множественных травмах, сепсисе.

Лабораторно гиперфибринолиз можно выявить в тесте с лизисом эуглобулинового сгустка (фибринолитическая активность - ФАК) и методом тромбоэластографии или тромбоэластометрии. Возможно определение уровня плазминогена.

Гиперкоагуляция.

Состояния, связанные с гиперкоагуляцией, встречаются часто, их диагностика и лечение в большинстве случаев проводится в рамках лечебных учреждений общего профиля.

Для пациентов данной группы характерно понятие тромбофилии – наклонности к тромбообразованию, повышению вязкости крови, агрегации тромбоцитов, снижению антикоагуляционного потенциала. Тромбофилия может приводить к развитию артериальных и венозных тромбозов и тромбэмболий.

Артериальные и внутрисердечные тромбозы, как правило, обусловлены изменением сосудистой стенки, например, при атеросклерозе, и активацией тромбоцитов. Артериальные тромбозы также могут быть связаны с наличием волчаночного антикоагулянта или со снижением уровня антикоагулянтов. Обычно это пристеночные белые тромбы, склонные к отрыву. Клинически артериальные тромбозы проявляются прекращением функции пораженного тромбозом органа, например, инфарктом миокарда или инсультом.

Появление венозных тромбозов связано с гиперкоагуляцией и стазом крови. Это чаще красные тромбы, полностью закрывающие просвет сосуда. Клинически венозный тромбоз проявляется в виде болевого синдрома с местным покраснением и повышением температуры.

Как при артериальном, так и при венозном тромбозе, особенно при тромбозе глубоких вен бедра, может быть отрыв тромба с последующей тромбэмболией легочной артерии (ТЭЛА), сосудов мозга (ишемический инсульт) и других мелких или крупных сосудов. Тромбэмболия при артериальных тромбозах может быть вызвана нарушением ритма сердечных сокращений, например, мерцательной аритмией.

Появление тромботических осложнений связывают как с наследственными, так и с приобретенными факторами.

Приобретенные факторы можно условно разделить на 2 группы: факторы, связанные с особенностями физиологии и образом жизни (возраст, пол, диета, курение, гиподинамия, повышенная масса тела, беременность), и вторичные нарушения, обусловленные другим заболеванием.

Классификация основных видов тромбофилий.

1. Гемореологические формы при миелопролиферативных заболеваниях, полиглобулиях, нарушениях объема и формы эритроцитов (гемоглобинопатии, ферментопатии и др.), при повышенной вязкости крови (парапротеинемии, гиперфибриногенемии, гаммапатии).
2. Формы, связанные с сосудисто-тромбоцитарным гемостазом: тромбоцитозы, повышенная агрегация тромбоцитов, увеличение продукции фактора Виллебранда, липкие тромбоциты и др.
3. Формы, обусловленные дефицитом или аномалиями физиологических антикоагулянтов: дефицит и аномалии антитромбина, протеина С и S и др.
4. Формы, связанные с дефицитом, гиперпродукцией или аномалиями плазменных факторов свертывания крови.
5. Формы, связанные с нарушением фибринолиза.
6. Метаболические формы (атеросклероз, сахарный диабет, гиперлипидемия, гиперлипопротеинемия (а), гипрегомоцистеинемия).
7. Аутоиммунные и инфекционно-иммунные формы (антифосфолипидный синдром, аллергозы и другие иммунные заболевания, иммунные и вирусные тромбоваскулиты, тромбогеморрагические лихорадки, бактериальный эндокардит и другие виды хроносепсиса).
8. Паранеопластические тромбэмболические синдромы (тромботические осложнения при всех видах рака, хирургических и химиотерапевтических вмешательствах).
9. Ятрогенные формы (катетеризация, протезы сосудов, кавальные фильтры, трансплантация стволовых клеток, лекарственные формы – лечение концентратами активированных факторов, гепарином, активаторами плазминогена, прием гормональных контрацептивов и др.).
10. Комбинированные формы.

Таким образом, большинство пациентов стационара и широкий контингент поликлинических больных нуждаются в определении параметров свертывания крови и дальнейшем мониторинге коагуляции. ***Тромбофилические состояния могут быть выявлены с помощью лабораторных тестов, отражающих склонность к гиперкоагуляции.***

Для обследования больных с подозрением на тромбофилию, используют две группы тестов. В первую группу входят маркеры активации свертывания крови. Эти тесты, как правило, доступны обычной клинико-диагностической лаборатории. Они позволяют выявить гиперкоагуляцию, но не дают информации об ее причинах. К данной группе тестов относится ПВ (укорочение), АЧТВ (укорочение), фибриноген (рост), ТВ (изменение), маркеры тромбинемии (увеличение РФМК, ПДФ, Д-димеров).

Тесты на выявление причин тромбофилии проводятся в большинстве случаев после постановки тестов первой группы и купирования тромбоза. Например, определение концентрации гомоцистеина или выявление наследственной аномалии факторов. К сожалению, причина тромбофилии устанавливается далеко не во всех случаях.

В последнее время большое внимание уделяется гипергомоцистеинемии и антифосфолипидному синдрому.

Гипергомоцистеинемия

является доказанным фактором риска развития как артериального, так и венозного тромбоза. Молекулярные механизмы тромбогенного действия гомоцистеина не идентифицированы.

Гомоцистеин – серосодержащая аминокислота, промежуточный продукт обмена незаменимой аминокислоты метионина.

Гипергомоцистеинемия может быть

- врожденной, связанной с дефицитом одного из ферментов превращения гомоцистеина,

- приобретенной, обусловленной недостатком витаминов B_{12}, B_6, и/или фолиевой кислоты, а также применением лекарств, нарушающих функции ферментов или обмен витаминов.

Тяжелая врожденная гипергомоцистеинемия приводит к рецидивирующим артериальным и венозным тромбозам, которые проявляются с детства. Индивидуальный риск развития тромбоза при гипергомоцистеинемии повышается в 3-10 раз.

Референтные пределы содержания гомоцистеина в плазме крови зависят от методики анализа, доступный метод определения – ИФА.

Антифосфолипидный синдром (АФС) - особый синдром, в основе которого лежит развитие аутоиммунной реакции на отрицательно заряженные фосфолипидные детерминанты на мембранах тромбоцитов, эндотелия, нервных клеток и связанные с фосфолипидами этих мембран гликопротеиды. Синдром относится к аутоиммунным тромбогенным гемофилиям как одна из гипокоагуляционных форм. АФС – частая причина приобретенных иммунных тромбофилий. Для синдрома характерно сочетание тромботических и ишемических проявлений с умеренной тромбоцитопенией**.** У женщин АФС встречается чаще. Патогенез АФС окончательно не установлен.

При АФС наблюдаются повторные тромбозы вен, тромбозы артерий. Акушерская патология проявляется привычным выкидышем (44%), тромбозом сосудов плаценты, внутриутробной гибелью плода, преэклампсией. У пациентов с АФС могут быть поражения нервной системы, головки бедра, кожи, изменения в сердце и сосудах.

При АФС появляются аутоиммунные антитела, которые ингибируют активацию протромбина и вызывают гипокоагуляцию в фосфолипидзависимых коагуляционных тестах без специфического угнетения какого-либо фактора свертывания крови.

У больных с АФС в крови появляются:

1. Антитела к мембранным фосфолипидам – кардиолипину, фосфатидилсерину и др., поэтому синдром иногда называют антикардиолипиновым. Пациенты с АФС могут иметь положительную реакцию Вассермана, так как кардиолипин является реагентом.

2. Антитела к гликопротеидам, связанным с фосфолипидами (аннексину V, β2-гликопротеину-I, протромбину).

3. Волчаночные антикоагулянты (ВА).

Волчаночные антикоагулянты – это группа антифосфолипидных антител всех классов иммуноглобулинов (IgA, IgM, IgG), которые удлиняют время свертывания плазмы в фосфолипидзависимых тестах, таких как протромбиновый тест и АЧТВ. Антикоагулянты названы волчаночными потому, что впервые были обнаружены Conley и Hartman, 1952г, при исследовании крови больных системной красной волчанкой (СКВ). Кроме АФС и СКВ, волчаночные антикоагулянты могут быть обнаружены при других аутоиммунных заболеваниях.

Таким образом, для АФС характерно состояние гиперкоагуляции в организме при гипокоагуляции в фосфолипидзависимых тестах на фоне умеренной тромбоцитопении.

Различают 3 вида антифосфолипидного синдрома (табл. 5).

Таблица 5

Классификация антифосфолипидных синдромов

Название	Характеристики
Первичный АФС	Нет проявлений «фонового» иммунного заболевания. *Иногда обнаруживают а/т к ДНК, рост циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК). Впоследствии может проявиться СКВ или другие коллагенозы*
Вторичный АФС	Осложнение «фонового» иммунного системного заболевания (**СКВ**, РА, склеродермия и др.), вирусные инфекции, опухоли, прием лекарств (прокаинамид, хинидин, хлорпромазин)
Катастрофический АФС	Быстро прогрессирующий политромботический синдром с циркуляцией в крови ВА и/или антифосфолипидных антител. Лечению не поддается и заканчивается летальным исходом

Основными клиническими признаками для прицельного обследования пациента на наличие АФС являются тромбозы, ишемии органов, акушерская патология. К дополнительным признакам относится присутствие иммунной патологии, тромбоцитопения, положительная RW.

Для правильной диагностики АФС необходимо проводить лабораторное обследование, включающее:

- Выявление антител к кардиолипину и фосфатидилсерину в высоком титре.
- Выявление антител к гликопротеидам (протромбин и др.).
- Выявление антикоагулянтов волчаночного типа.

Антитела к фосфолипидам и гликопротеидам обнаруживают с помощью иммуноферментного анализа. Эффект волчаночного антикоагулянта выявляют клоттинговыми методами в фосфолипидзависимых тестах. Выявление ВА проходит в 2 этапа: проведение скрининговых тестов, обнаруживающих эффекты, связанные с ВА, и подтверждающих тестов, которые устанавливают, что гипокоагуляция в скриниговых тестах корректируется добавлением тромбоцитарных фосфолипидных мембран или эритрофосфатида.

Обследование пациента на АФС должно быть комплексным. Один иммунологический тест не обеспечивает надежного распознавания АФС. Ошибка составляет от 35 до 60%.

Для лечения АФС используют антикоагулянты прямого и непрямого действия, антиагреганты, иммуносупрессоры цитостатического действия, дискретный плазмаферез.

Синдром диссеминированного внутрисосудистого свертывания.

Синдром диссеминированного внутрисосудистого свертывания (ДВС-синдром) является универсальным процессом, который проявляется при критических и терминальных состояниях. Впервые процесс был описан классиком средневековой восточной медицины Абу-Ибрахимом Джурджани в 1110г., а расшифрован в 60-х годах прошлого века исследованиями М.С. Мачабели и других авторов.

ДВС-синдром отражает срыв механизмов адаптации гемостаза и генерализацию процесса свертывания крови. Механизм развития ДВС-синдрома обусловлен активацией свертывающей системы крови и тромбоцитарного гемостаза с последующим их истощением (коагулопатия и тромбоцитопения потребления). Активация и истощение касается всех других плазменных протеолитических систем – фибринолитической, калликреин-кининовой, комплемента, ренин-ангиотензиновой.

Основным агентом, вызывающим свертывание крови и активацию тромбоцитов, является тромбин. В большинстве случаев ДВС-синдрома активация протромбина осуществляется тканевым фактором, который выделяется из поврежденных тканей и бактерий (внешний путь активации протромбиназы). Реже активация протромбина происходит раковыми прокоагулянтами или коагулазами змей. Избыток тромбина за короткое время активирует такое количество фибриногена, что образовавшийся фибрин-мономер циркулирует в крови как в неизменной форме, так и в виде растворимого фибрина (РФ). Активация свертывания крови и избыток РФ приводит к образованию микросгустков, которые, перекрывая просвет сосудов, приводят к прекращению функции органов – полиорганной недостаточности. Первоначальная гиперкоагуляция по мере истощения факторов свертывания крови и тромбоцитов переходит в гипокоагуляцию с развитием геморрагического синдрома, а избыток РФ и РФМК активирует фибринолиз. Таким образом, ДВС-синром характеризуется гиперкоагуляцией, переходящей в геморрагический синдром с вторичным системным гиперфибринолизом.

Доказано, что истощение резервов физиологических антикоагулянтов (в первую очередь, протеина С, антитромбина) происходит значительно быстрее, чем плазменных факторов свертывания крови. Открытие данного явления позволило пересмотреть тактику лечения больных с ДВС-синдромом и спасти жизни тысячам пациентов.

Диагноз ДВС-синдрома ставится клинически. Одним из основных проявлений синдрома является развитие полиорганной недостаточности в результате блокады микроциркуляции в органах сгустками крови. К основным органам-мишеням относятся:

1. Легкие: прогрессирующая дыхательная недостаточность (одышка, цианоз, диспноэ, гипоксемия) вплоть до развития дистресс-синдрома.
2. Почки: олигурия, доходящая до анурии, протеинурия, азотемия, почечная недостаточность и уремическая интоксикация.
3. Желудочно-кишечный тракт: образование кровоточащих эрозий и язв, диапедезная кровоточивость, снижение барьерной функции слизистой кишечника для кишечной флоры, проникновение которой в кровь вызывает развитие вторичного эндогенного сепсиса.
4. Печень: гипербилирубинемия, рост активности ферментов. В ряде случаев развивается гепато-ренальный синдром.
5. Нервная система: глубокая депрессия.

Основные причины развития ДВС-синдрома.

1. Попадание в кровоток большого количества тканевого тромбопластина при разрушении тканей.
   - Тяжелые травмы, включая синдром сдавления, травматические хирургические вмешательства.
   - Злокачественные новообразования, в том числе гематологические. Острый промиелоцитарный лейкоз всегда сопровождается ДВС-синдромом.
   - Острые массивные деструкции органов и тканей (панкреатиты, ожоги и др.).
   - Акушерская патология (отслойка плаценты, гибель плода, эмболия околоплодными водами, эклампсия и др.).
2. Нарушение микроцитруляции. Все терминальные состояния и шок.
3. Все острые инфекционно-септические состояния. Ведущую роль играют эндотоксины грам-отрицательных микроорганизмов.
4. Чужеродные поверхности при применении экстракорпоральных методов лечения.
5. Нарушение фагоцитарной функции клеток ЕММС при циррозе печени.
6. Острый внутрисосудистый гемолиз и цитолиз.
7. Отравления гемокоагулирующими змеиными ядами.

Характер течения и фазы ДВС-синдрома.

Характер течения ДВС-синдрома определяется скоростью поступления в кровь активирующих гемостаз субстанций. Различают следующие виды течения:

- Острое, включая катастрофическую форму.
- Подострое с длительным периодом гиперкоагуляции.
- Хроническое с малой скоростью генерации тромбина.

Наличие хронического ДВС признается не всеми авторами. Иногда его называют «лабораторным» ДВС-синдромом, так как выявленные нарушения гемостаза не сопровождаются характерными клиническими проявлениями.

ДВС в своем развитии проходит следующие основные фазы:

1. Гиперкоагуляция и гиперагрегация. При остром ДВС-синдроме фаза очень короткая, ее не всегда удается выявить лабораторно. При заборе кровь может сворачиваться в игле.
2. Гипокоагуляция с коагулопатией потребления.
3. Генерализация фибринолиза (дефибринация). Манифестация гипокоагуляции и дефибринации – отсутствие сгустков крови, вытекающей из матки, кишечника, носа, ран.
4. Восстановление.

Все эти фазы могут перекрываться между собой, а на поздних стадиях развития протекать одновременно. Летальность острых форм на фоне современного лечения составляет 10-15%, без лечения – 50%.

Изменение лабораторных показателей при ДВС-синдроме.

Диагноз ДВС ставится клинически, поэтому лабораторные тесты используют для подтверждения диагноза, объективной оценки эффективности проводимой терапии и состояния различных звеньев гемостаза в соответствующую фазу развития синдрома (табл.6).

Таблица 6.

Лабораторные показатели в разных фазах ДВС-синдрома

Фаза	Лабораторные тесты
Гиперкоагуляция (тромбинемия)	↑ маркеров активации (фибрин-мономер, РФМК, ФПА) ↓ АЧТВ, ТВ, ↓ АТ, протеин С Тромбоцитопения (< 150 000),
Коагулопатия потребления	Высокие маркеры активации ↓ фибриногена и других факторов ↑ АЧТВ, ТВ

Гиперфибринолиз	↓ фибриногена до дефибринации ↑ ПДФ и Д-димеров ↑ АЧТВ, ТВ, протромбинового времени

Примечание: стрелки обозначают ↑- увеличение, ↓ - снижение параметра.

Фаза гиперкоагуляции характеризуется выраженной тромбинемией. Так как измерить содержание тромбина в плазме из-за короткого срока жизни не представляется возможным, уровень тромбинемии определяется косвенным путем по увеличению содержания маркеров активации свертывания. В крови растет содержание фибрин-мономеров, растворимых фибрин-мономерных комплексов (РФМК), фибринопептида А (ФПА) и некоторых других соединений. В связи с активацией свертывания укорачивается АЧТВ и ТВ и снижается активность антитромбина и протеина С. Определение содержания антикоагулянтов в динамике полезно для индивидуализации прогноза, так как их нарастание в процессе лечения предполагает благоприятный исход. Характерна прогрессирующая, но не доходящая до критического уровня, тромбоцитопения с повышением агрегации тромбоцитов.

В фазе гипокоагуляции на фоне высоких показателей маркеров активации свертывания снижается содержание фибриногена и других факторов. АЧТВ и ТВ удлиняются.

В фазе гиперфибринолиза резко выражено снижение фибриногена вплоть до дефибринации и увеличение фибринолитической активности (ФАК). В связи с активацией фибринолиза растет содержание ПДФ и образующихся только из фибрина Д-димеров. Другие коагуляционные тесты (ПВ, АЧТВ, ТВ), как правило, удлиняются.

При лабораторном мониторинге ДВС-синдрома основное внимание необходимо уделить выявлению тестов, отражающих стабильно прогрессирующие изменения, и на основании этих тестов осуществлять лабораторный контроль проводимой терапии. Эти тесты могут отличаться у различных больных. Они могут включать оценку содержания тромбоцитов, фибриногена, фибринолитической активности, антитромбина, протеина С, РФ и других показателей. Такие коагуляционные тесты, как ПВ, АЧТВ, ТВ имеют разнонаправленные значения в зависимости от фазы заболевания и могут быть мало информативны для динамического наблюдения.

При ДВС-синдроме в крови появляется повышенное количество фрагментированных эритроцитов. Их можно обнаружить в мазке крови и по показателям гемanализатора: гистограмме эритроцитов, снижению MCV и росту RDW.

Принципы лечения ДВС-синдрома.

Гиперкоагуляционная фаза: обычный гепарин в/в, свежезамороженная плазма при низком уровне антикоагулянтов, антибиотики, замещение функции жизненно-важных органов.

Гипокоагуляционная фаза: свежезамороженная плазма, иногда концентраты факторов, тромбомасса, антибиотики, замещение функции жизненно-важных органов.

Перед лечением больных, которые находятся в фазе гиперкоагуляции, желательно измерить содержание антитромбина, так как при снижении его уровня гепарин не окажет желаемого эффекта. При лечении, как правило, используется обычный гепарин, поскольку его основное действие антитромбиновое. Антибиотики вводятся всем больным для купирования возможного вторичного сепсиса, вызванного попавшей в кровь кишечной флорой в результате снижения барьерной функции кишечника.

Основные лекарственные препараты для лечения нарушений гемостаза.

У здорового человека все составляющие гемостаза находятся в динамическом равновесии. При различного рода нарушениях гемостаз сдвигается либо в область гиперкоагуляции, либо в область гипокоагуляции. Для восстановления равновесия и предотвращения тяжелых, а порой и опасных для жизни осложнений, используются различные группы фармакологических препаратов.

Принципы лечения кровоточивости.

При геморрагических проявлениях в зависимости от причины геморрагии используют свежезамороженную плазму как источник факторов свертывания плазмы крови, концентраты факторов свертывания, активированные факторы свертывания, концентраты тромбоцитов.

Медикаментозная терапия включает антифибринолитики, иммуносупрессанты, иммуноглобулины, аналоги вазопрессина (десмопрессин), витамин К (викасол), препараты местного действия.

Антифибринолитики (ингибиторы фибринолиза).

При генерализованном или локальном фибринолизе используют препараты, которые ингибируют фибринолиз. К ним относится аминокапроновая кислота, транексамовая кислота, аминобензоевая кислота (Памба) и апротинин (торговые названия трасилол, контрикал). Аминокапроновая кислота блокирует действие активаторов плазминогена, угнетает действие плазмина, частично блокирует кинины. Транексамовая и аминобензоевая кислоты блокируют места связывания с лизином в молекуле плазминогена, предотвращая активацию последнего. Белок апротинин, выделенный из легких крупного рогатого скота, ингибирует энзиматическое действие плазмина путем образования с ним комплексов. Кроме плазмина апротинин ингибирует трипсин, химотропсин и калликреин.

Медикаментозное лечение гиперкоагуляции.

Из приобретенных нарушений наиболее часто встречается гиперкоагуляция, которая выражается в тромбофилии, тромбозе или тромбоэмболии. Введение практически всех лекарственных препаратов требует лабораторного контроля. Выбор тестов зависит от механизма действия препарата.

Ингибиторы функции тромбоцитов (антиагреганты).

Для снижения уровня тромбофилии с профилактической целью используют антиагреганты. Эти препараты ингибируют адгезию и агрегацию тромбоцитов, препятствуют развитию атеросклеротического процесса. Их применяют в терапии больных со стенозированием и тромбозами артерий, ишемией, инфарктами органов, при наличии тромбофилии.

В настоящее время применяются различные группы препаратов: ингибиторы циклооксигеназы-1 (ЦОГ-1), ингибиторы фосфодиэстеразы, ингибиторы АДФ-рецепторов тромбоцитов, ингибиторы рецептора IIb/IIIa тромбоцитов. В нашей стране наиболее часто используются ингибиторы ЦОГ-1 и ингибиторы АДФ-рецепторов тромбоцитов.

К ингибиторам циклооксигеназы-1 относятся препараты **аспирина**, которые используются в малых дозах (30 – 300 мг/сутки). Механизм действия аспирина связан с необратимым ингибированием ЦОГ-1 тромбоцитов, предотвращая тем самым образование при активации из арахидоновой кислоты прокоагулянта тромбоксана A_2, который повышает адгезию кровяных пластинок. Восстановить уровень фермента тромбоциты не могут, так как не содержат ядра и не способны к синтезу белка. На уровень антиагреганта простациклина, который образуется из арахидоновой кислоты при участии ЦОГ-1 в эндотелиальных клетках (ЭК), аспирин практически не влияет: содержащие ядро ЭК замещают ЦОГ-1 путем нового синтеза.

Антиагрегантное действие аспирина лабораторно редко контролируется, несмотря на то, что у 1/5 пациентов наблюдается генетически детерминированная или приобретенная резистентность к аспирину. Для контроля антиагрегантной терапии оптимально исследовать агрегатограмму пациента с индукцией агрегации тромбоцитов адреналином до приема аспирина и на 2-3-ий день после начала лечения. Снижение агрегации в 3-4 раза подтверждает эффективность действия аспирина.

Иногда используют мочевой тест для оценки индивидуального ответа на прием аспирина: при достаточной чувствительности к аспирину в моче снижается уровень метаболита арахидоновой кислоты тромбоксана В2.

К побочным действиям аспирина относятся кровотечение и нейтропения (0,17%).

Из ингибиторов АДФ-рецепторов тромбоцитов (тинопиридинов) наиболее широко используется **плавикс** (клопидогрель). Он необратимо ингибирует один из трех известных АДФ-рецепторов тромбоцитов, блокируя их АДФ-зависимую агрегацию. Генетически детерминированная резистентность к плавиксу не выявлена. Показан лабораторный контроль путем оценки агрегатограммы при индукции агрегации добавлением АДФ (снижение показателей агрегатограммы от исходной в 3-4 раза), но возможно применение плавикса без лабораторного контроля.

Побочными действиями плавикса могут быть кровотечение и нейтропения (0,1%).

Антикоагулянты прямого действия.

К антикоагулянтам прямого действия относятся гепарины, гепариноиды и гирудин. Их название обусловлено прямым действием на свертывание плазмы: нейтрализацию тромбина или инактивацию Ха-фактора.

Гепарины являются полимерами серусодержащего дисахарида и относятся к кислым полисахаридам. Они различаются по ОММ и приоритетному механизму действия.

Обычный нефракционированный гепарин (ОГ) представляет смесь гепаринов с ОММ от 1700 до 24000 Д. Он действует двумя основными путями: через каталитическое усиление действия антитромбина

(антитромбиновое действие), и через инактивацию фактора Ха (противотромботическое действие). Наиболее выражено ***антитромбиновое действие ОГ.*** Обычный гепарин широко применяется как для профилактики венозных тромбозов и тромбэмболических осложнений, так и для лечения тромбозов, тромбэмболий, ДВС-синдрома. При лечении ДВС-синдрома использование ОГ предпочтительно, так как он через АТ нейтрализует избыток тромбина. ОГ используют в аппаратах искусственного кровообращения (АИК), при гемодиализе, при гемосорбции и др. Его преимущества заключаются в доступности, простоте мониторинга и возможности полной нейтрализации антикоагулянтного действия введением протаминсульфата - белка из спермы рыб. Обычный гепарин вводят либо подкожно, либо внутривенно. Резистентность к гепарину встречается редко. В этом случае его заменяют гирудином.

Лабораторный контроль ОГ заключается в определении АЧТВ через 4 часа после введения гепарина. При использовании высоких доз лечебным считается удлинение времени свертывания плазмы в 1,5-2,5 раза по сравнению ***со средним значением АЧТВ для данной лаборатории***, а не с исходным значением АЧТВ пациента. При введении низких доз ОГ с целью профилактики удлинение АЧТВ может быть незначительным и лабораторный контроль не является обязательным. В условиях АИК контроль за гепаринотерапией может проводиться по времени свертывания цельной крови. Так как основное антикоагуляционное действие ОГ осуществляется через антитромбин, перед лечением высокими дозами гепарина пациенту рекомендуется измерить уровень антитромбина. При уровне, менее 70%, введение свежезамороженной плазмы или концентрата антитромбина компенсирует недостаток антикоагулянта. Дозы ОГ измеряются в антитромбиновых единицах. К побочным эффектам высоких доз ОГ относятся кровотечения и гепарининдуцированная тромбоцитопения (ГИТ). Снижение содержания тромбоцитов наблюдается у 10% пациентов, получающих гепарин, что обусловлено способностью гепарина активировать тромбоциты. Однако количество тромбоцитов не бывает ниже 80.000^{9}/л. Более выраженное падение уровня кровяных пластинок связано с образованием антител против тромбоцитов и гепарина. При таком осложнении возрастает риск тромбэмболий, так как активированные антителами тромбоциты способны к агрегации. Снижения уровня тромбоцитов наблюдается не ранее, чем через 5-14 дней от начала лечения. В связи с этим при введении высоких доз гепарина рекомендуется контролировать содержание тромбоцитов перед лечением, на 7-е и 12-е сутки, и далее при продолжении лечения 1-2 раза в неделю. В редких случаях в качестве осложнения у пациентов может развиться гепаринзависимый остеопороз.

Низкомолекулярные гепарины (НМГ) получают путем химической или энзиматической обработки обычного гепарина. Они имеет более низкую ОММ и отличаются механизмом действия. Основным для НМГ является ***противотромботическое действие*** через инактивацию фактора Ха. НМГ применяются подкожно главным образом для профилактики тромбозов и при терапии венозных тромбэмболических осложнений. Лабораторный контроль проводится либо по остаточной активности фактора Ха (анти-Ха) перед введением очередной дозы, либо не проводится. Осложнения могут быть те же, что и при введении ОГ, но встречаются крайне редко. Доза НМГ измеряется в анти-Ха-единицах, которые не соответствуют антитромбиновым единицам ОГ.

Гирудин – это полипептид из слюны медицинской пиявки, который обладает выраженным прямым антитромбиновым действием без участия каких-либо факторов свертывания крови. В медицинских целях используют рекомбинантные препараты гирудина. Гирудин вводят внутривенно для антикоагулянтной терапии пациентов с гепарининдуцированной тромбоцитопенией, и подкожно для профилактики тромбоза в условиях высокого риска. Применение гирудина ограничено из-за опасности кровотечений, так как гирудин не метаболизируется. Он выводится через почки в неизменном виде и при избытке накапливается в тканях. Для гирудина, в отличие от гепарина, нет антидота. При заболеваниях почек дозы корректируются.

Лабораторный контроль терапии гирудином проводится по АЧТВ. Критерии такие же, как для гепарина. Однако в некоторых случаях при увеличении дозы время свертывания плазмы в тесте АЧТВ выходит на плато и более не удлиняется, что свидетельствует об относительной или абсолютной передозировке препарата.

Антикоагулянты непрямого действия (антагонисты витамина К).

Антикоагулянты непрямого действия (АНД) широко используются в лечебной практике, особенно при необходимости длительной антикоагуляционной терапии. Они используются для первичной профилактики при мерцательной аритмии, профилактики рецидивов тромбэмболии, тромботических осложнений при наличии искусственных протезов или фильтра в полой вене.

Преимущества данных препаратов состоят в том, что их можно принимать внутрь, и их действие не зависит от наличия других факторов свертывания крови, например, антитромбина. К группе АНД (оральных антикоагулянтов) относятся антикоагулянты кумаринового ряда (варфарин и др.) и индандионового ряда

(фенилин). В последнее время широко используется варфарин как наименее токсичный и наиболее «управляемый».

Варфарин является дериватом кумарина. Его действие, как и других оральных антикоагулянтов, заключается в нарушении реакции γ-карбоксилирования витамин К-зависимых факторов свертывания: II, VII, IX, X, протеинов С и S. Без витамина К образуются неполноценные в процессе плазменного гемостаза PIVKA-факторы, у которых нарушена способность связывания с ионами кальция, фосфолипидами мембран и другими факторами свертывания крови, что и приводит к антикоагулянтному эффекту.

При приеме АНД, в частности, варфарина, меняется как внешний, так и внутренний путь активации протромбиназы. VII фактор участвует во внешнем пути, IX – во внутреннем, а II и X - в обоих путях активации протромбиназы. Тем не менее, действие АНД больше сказывается на внешнем пути, поэтому прием варфарина контролируют протромбиновым временем (тестом – ПВ, ПТ).

Для правильного использования варфарина требуется постоянный лабораторный контроль. Дозировка препарата не поддается никаким предварительным расчетам. На действие лекарства влияет синтетическая способность печени, пищевой режим, другие лекарственные препараты или сопутствующие заболевания. Желаемый уровень активности факторов устанавливается индивидуально. В настоящее время применяется также низкодозовая терапия АНД. В начальной фазе насыщения назначается индукционная доза варфарина, а лабораторный контроль проводится протромбиновым тестом в процентах по Квику. Далее при подборе дозы контроль осуществляется индексом по Квику каждые 3-4 дня. В качестве дополнительного теста перед началом лечения полезно проводить оценку системы протеина С. При низкой активности протеина С прием варфарина может приводить к тромбозам и некрозам кожи.

В фазе стабильной гипокоагуляции действие препарата оценивают по более объективному показателю Международному Нормализованному Отношению (МНО).

При применении варфарина следует выполнять следующие правила:

1. Применять варфарин в соответствии со сроком годности.
2. При приеме варфарина по возможности ограничивать потребление витамина К. Витамин К содержится в овощах, фруктах, печени, дрожжах.
3. Отодвигать прием варфарина от приема пищи, так как препарат сорбируется пищей.
4. Использовать наиболее низкий режим дозирования, который дает терапевтический эффект (по контролю МНО).

Интервал МНО при лечении варфарином зависит от характера патологии и определяется лечащим врачом. В большинстве случаев он колеблется от 2-х до 4-х.

При длительном лечении варфарином полезно определять АЧТВ как тест на внутренний путь активации протромбиназы. Время свертывания плазмы пациента обычно удлиняется в 2-2,5 раза по сравнению с нормальными значениями АЧТВ лаборатории.

Наиболее опасные осложнения в виде кровотечений встречаются сравнительно редко. При длительном применении возможно повышенное выпадение волос. Препарат противопоказан женщинам в первый триместр беременности.

I Перечень вопросов для проверки конечного уровня знаний:

1. Механизм развития гипокоагуляции.
2. Геморрагические заболевания.
3. Патология тромбоцитарного звена.
4. Геморрагические коагулопатии.
5. Механизм развития гиперкоагуляции.
6. Классификация основных видов тромбофилий.
7. Гипергомоцистеинемия, механизм развития.
8. Антифосфолипидный синдром, классификация.
9. ДВС-синдром.

II Самостоятельная работа обучающихся: составить ментальную карту по теме: «Молекулярные механизмы нарушений гемостаза».

III Список используемой литературы:

Обязательная:

1. Е.С. Северин «Биохимия», Москва 2004;
2. Е.С. Северин «Биохимия с упражнениями и задачами», Москва 2008;

Дополнительная:

1. Интернет ресурсы
2. Материал конспектов занятия

17. Лабораторные тесты системы гемостаза.

Лабораторные тесты неотделимы от диагностики и мониторинга нарушений гемостаза, особенно при мониторинге антикоагулянтной терапии. Для оценки системы гемостаза используются следующие группы тестов:

1. Свертывание плазмы (коагуляционное звено).
    - Скрининговые тесты.
    - Исследование факторов (активность и концентрация).
    - Маркеры активации свертывания.
    - Ингибиторы свертывания.
2. Фибринолиз.
    - Скрининговые тесты.
    - Факторы фибринолиза (плазминоген, t-PA).
    - Маркеры фибринолиза.
    - Ингибиторы фибринолиза.
3. Исследование тромбоцитов (количество, функции, факторы тромбоцитов).

В лечебных учреждениях общего профиля проводятся, как правило, скрининговые тесты, которые оценивают функцию отдельных фаз процессов свертывания, то есть совместную активность нескольких факторов. Другие тесты обычно выполняются в профильных лабораториях или специализированных лечебных учреждениях, хотя, в принципе, могут проводиться в любой КДЛ, имеющей соответствующее оборудование.

При назначении анализов на гемостаз врач руководствуется наличием клинических признаков, анамнезом, вероятностью оперативного вмешательства, а также возможностями лаборатории. В зависимости от диагностической необходимости пациентам назначается исследование коагулограммы или гемостазиограммы.

Коагулограмма предполагает изучение плазменного звена гемостаза. *Гемостазиограмма* включает одновременную оценку плазменного и сосудисто-тромбоцитарного гемостаза. При рутинных исследованиях минимальный набор тестов для сосудисто-тромбоцитарного звена состоит из определения времени кровотечения и количества тромбоцитов. Более тонкое изучение функции тромбоцитов проводится с помощью специальных методов и приборов.

Пациентам без видимой клинической симптоматики и перед оперативным вмешательством назначается *базовая коагулограмма*. Минимальное количество параметров базовой коагулограммы четыре: протромбиновое время (ПВ), активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ), тромбиновое время (ТВ) и фибриноген. Эти тесты относятся к скрининговым и позволяют выявить нарушения на всех этапах коагуляции. Данный набор тестов может выполняться как ручными методами, так и на коагулометре. Однако минимального набора тестов недостаточно для пациентов с нарушениями в системе гемостаза. Учитывая трудоемкость и немалую стоимость тестов, в КДЛ должны быть «резервные» тесты, которые выполняются только по назначению лечащего врача дополнительно к базовой коагулограмме. Эти тесты, как правило, скрининговые, и позволяют оценить функциональную активность других звеньев гемостаза. К ним относятся: фибринолитическая активность (ФАК, скрининговый тест на фибринолиз), оценка активности физиологических антикоагулянтов (антитромбина и общей активности системы протеина С), оценка уровня тромбинемии (РФМК, Д-Димеры и др.), выявление эффектов волчаночного антикоагулянта и некоторые другие. Все эти тесты доступны для выполнения, и для них, кроме Д-димеров, имеются отечественные реагенты. Д-димеры определяется иммунологическими методами и требует специального оборудования. Набор тестов должен соответствовать потребностям лечебного учреждения. Редкие тесты рациональнее проводить в специализированной лаборатории из-за их нерентабельности.

Для общей оценки системы гемостаза проводится тромбоэластография (ТЭГ) или тромбоэластометрия (ТЭМ). Методы дорогие, но в ряде случаев крайне необходимые.

Таким образом, каждая КДЛ выделяет диапазон исследований, который определяется потребностями лечебного учреждения и возможностями лаборатории.

Основные этапы исследования гемостаза.

При изучении системы гемостаза, как и при других лабораторных исследованиях, анализ складывается из 3-х этапов:

- преаналитического, включающего назначение исследования, оформление бланка-заказа на анализ, забор, хранение и транспортировку биологического материала, иногда первичную обработку биологического материала (центрифугирование и отделение плазмы от эритроцитов);

- аналитического, то есть непосредственного проведения анализа;
- постаналитического, включающего выдачу анализа в отделение, лечащему врачу или пациенту, и интерпретацию результатов лабораторных исследований.

На каждом из этих этапов могут быть допущены ошибки. По статистическим данным 70-80% всех ошибок приходится на преаналитический этап, поэтому все составляющие этого этапа должны быть стандартизированы и неукоснительно выполнены.

Преаналитический этап. *Назначение анализов* проводится лечащими врачами и включает как стандартную коагулограмму, так и дополнительные тесты. Назначение анализов должно быть обосновано. Обоснованием служат данные анамнеза, данные клинического обследования (наличие геморрагий, признаки венозного застоя или артериальной недостаточности). Также учитывается информация о приеме лекарственных препаратов, прямо или косвенно влияющих на гемостаз.

При назначении анализов необходимо правильно заполнить направление, что поможет и врачу-клиницисту, и врачу клинической лабораторной диагностики при интерпретации полученных результатов. Тесное сотрудничество врачей-клиницистов с врачом лаборатории по гемостазу помогает и в правильном назначении тестов, и в их расшифровке, тем более, что основную информацию дает не столько конкретный тест, сколько комбинация тестов.

На процессы свертывания влияет множество лекарственных препаратов, эффекты которых могут быть как терапевтическими, так и побочными. Фармакотерапия нарушений гемостаза обсуждалась ранее. Побочные эффекты лекарств могут проявляться в виде влияния на тромбоциты или плазменные факторы. *Анальгетики*, как правило, снижают агрегацию тромбоцитов. Прием *оральных контрацептивов* и препаратов заместительной гормонотерапии активирует агрегацию тромбоцитов и факторов свертывания, снижает уровень антитромбина, что может способствовать тромбофилии. *Антибиотики широкого спектра действия* подавляют кишечную флору и связанный с ней эндогенный синтез витамина К, а также могут вызывать тромбоцитопению. Установлено наличие склонности к гипокоагуляции у пациентов после введения кровозаменителей и при лечении аспарагиназой и вальпроиевой кислотой. Эффекты препаратов необходимо учитывать при интерпретации результатов лабораторных исследований.

Физический и эмоциональный стресс активирует систему коагуляции и фибринолиза. Биологическим материалом для исследования гемостаза может быть кровь, плазма и сыворотка крови.

Кровь необходима при регистрации тромбоэластограммы. Сыворотка используется крайне редко для измерения содержания ряда факторов или ПДФ. Сыворотка – это жидкость, остающаяся после свертывания крови и отделения клеточных элементов. Она не содержит фибриноген и некоторые другие факторы. Основным материалом для исследования системы гемостаза является плазма крови. Для получения плазмы при заборе крови в пробирку добавляется стабилизатор (антикоагулянт), который препятствует свертыванию крови. Плазма – это жидкость, полученная после отделения клеточных элементов без предварительного свертывания крови. Плазма содержит фибриноген и все факторы.

Забор крови на гемостаз проводится из пальца, мочки уха или из вены. Капиллярная кровь берется для некоторых специально адаптированных методов, таких как подсчет тромбоцитов, определение времени кровотечения, АЧТВ, ПВ, и у детей. При заборе капиллярной крови необходим достаточно глубокий прокол стерильным скарификатором и быстрое (10 сек) взятие первых капель крови, полученных самотеком без давления или сжатия. При переносе крови в пробирку с антикоагулянтом (цитратом натрия) она должна быть спущена в центр пробирки, а не растекаться по краям. Кровь с антикоагулянтом должна быть тщательно и аккуратно перемешана.

Стандартным является исследование крови, взятой из вены. Кровь забирают натощак или после легкого завтрака без жирной пищи из локтевой вены силиконированной иглой с широким просветом в пробирки с цитратом натрия. При взятии крови время наложения жгута должно быть минимальным (не более 2-х мин), так как стаз крови активирует свертывание. Если кровь одновременно берут в несколько пробирок, то пробирка для гемостаза должна быть второй. При заборе крови из катетера для исключения влияния гепарина предварительно спускают до 20 мл крови. Кровь с цитратом натрия сразу 2-3 раза перемешивают без встряхивания и пенообразования, и оставляют при комнатной температуре. В качестве контейнеров для взятия крови могут быть использованы силиконированные стеклянные пробирки, пластиковые пробирки или вакуумные пробирки с голубой крышкой, содержащие цитрат натрия. В

обычные стеклянные пробирки забор крови недопустим, так как стекло активирует некоторые факторы свертывания крови (контактная активация).

Для тестов, где важно избежать высвождения тромбоцитарных факторов в период времени между забором крови и выполнением анализа, используют СТАД-пробирки. Эти пробирки содержат цитрат натрия, теофиллин, аденозин и дипиридамол. Последние три составляющих препятствуют агрегации тромбоцитов и высвождению из тромбоцитов биологически активных веществ.

Для предотвращения свертывания крови после забора для коагулологических исследований в качестве стабилизатора крови используется цитрат натрия (далее цитрат). Цитрат обратимо связывает ионы кальция, чем предотвращает свертывание крови. Цитрат также стабилизирует факторы VIII и V и дает возможность получить прозрачную плазму после центрифугирования. Соотношение цитрата и крови строго определено – 1:9. По рекомендациям ВОЗ концентрация раствора цитрата составляет 109мМ, что соответствует 3,8% цитрату, приготовленному из трехзамещенного 5,5 водного кристаллогидрата ($Na_3C_6H_6O_7x5,5H_2O$), или 3,2% цитрату, приготовленному из трехзамещенного 2-х водного кристаллогидрата ($Na_3C_6H_6O_7x2H_2O$). При использовании обычных градуированных пробирок в лаборатории наливают необходимое количество цитрата и отмечают фломастером уровень для крови. В вакуумных пробирках с голубой крышкой содержится стандартное количество цитрата, а уровень для крови уже отмечен.

Таблица 7.

Зависимость соотношения антикоагулянта и крови от гематокрита

Гематокрит *%*	*Антикоагулянт мл* *(3,8% цитрат натрия)*	*Общий объем мл*
20	1,4	10
22-26	1,3	10
28-32	1,2	10
34-38	1,1	10
40-44	1,0	10
46-50	0,9	10
52-56	0,8	10
58-60	0,7	10
>65	0,5	10
новорожденные	0,25	5,0

Примечание: значения гематокрита, отмеченные жирным шрифтом, допускают использование стандартного количества цитрата.

Высокий и низкий гематокрит требуют коррекции соотношения цитрат-кровь (табл. 7). В этом случае кровь забирают в пластиковые пробирки с откорректированным количеством цитрата. На практике при гематокрите от 25 до 55% количество цитрата можно не менять.

Наибольшее число ошибок связано с неправильным соотношением цитрата и крови и плохим перемешиванием проб. Очень часто процедурные сестры кровь набирают выше или ниже метки. В этом

случае происходит нестандартное разбавление факторов, что может привести к образованию сгустков или нарушению коагуляции в пробирке при ее отсутствии у пациента. ***Кровь со сгустками не анализируется!***

Время проведения исследований для оценки функций тромбоцитов и некоторых других тестов (PAI-1) составляет 30-40 мин. Такие пробы должны быть взяты в том лечебном учреждении, где они анализируются. При оценке плазменного гемостаза пробы должны анализироваться в течение 4-х часов. Использование вакуумных пробирок продлевает время проведения анализа, образцы крови могут транспортироваться в профильную лабораторию. Пробы до исследования хранятся при комнатной температуре.

Предварительный этап обработки проб включает *центрифугирование.* Путем изменения режима центрифугирования получают плазму, содержащую различное количество тромбоцитов. *Обогащенную тромбоцитами плазму (ОТП)* получают центрифугированием крови в течение 5 мин при 1000 оборотов/мин. ОТП используют для подсчета количества и оценки функции тромбоцитов. *Бедную тромбоцитами плазму (БТП)* получают путем центрифугирования цитратной крови при 3000 оборотов/мин в течение 15 мин. Ее используют для исследования показателей плазменного гемостаза. *Бестромбоцитная плазма* получается при центрифугировании цитратной крови в течение 30 мин при 4000 об/мин. Центрифугирование при исследовании гемостаза лучше проводить в центрифугах с бакет-ротором. При взятии пробирок из такой центрифуги фазы не смешиваются. Медленная остановка центрифуги также препятствует смешиванию фаз.

При необходимости плазму можно однократно заморозить (-20^0 - -70^0C). Для замораживания рекомендуется использовать бестромбоцитную плазму. При высокой температуре замораживания (-20^0C) плазма должна анализироваться в течение 2-х недель. Размораживание плазмы проводится на водяной бане при 37^0C. Размороженная плазма сразу анализируется. В плазме, содержащей гепарин и ПДФ, показатели гемостаза после замораживания меняются.

Гемолизированная плазма не анализируется за исключением случаев внутрисосудистого гемолиза у пациента.

Аналитический этап включает непосредственное проведение анализа. Результат анализа зависит от метода исследования, качества реактивов, используемого оборудования и человеческого фактора. Снижение влияния человеческого фактора обеспечивает автоматизация аналитического процесса.

Для исследования гемостаза применяются следующие группы методов:

1. Клоттинговые, основанные на регистрации времени образования сгустка (clot – сгусток, тромб). Используются для выполнения скрининговых тестов, определения активности отдельных факторов свертывания и ингибиторов.
2. Хромогенные, основанные на фотометрическом определении активности факторов по расщеплению хромогенных или флуорогенных субстратов. Используются для выполнения скрининговых тестов, определения активности отдельных факторов свертывания и ингибиторов. Методы чувствительны и специфичны, легко адаптируются к биохимическим анализаторам. С их помощью можно достаточно надежно измерить содержание того или иного фактора, но не всегда возможно оценить его биологическую активность.
3. Иммунологические, основанные на реакции антиген-антитело (ИФА, латексная агглютинация, нефелометрия, турбидиметрия и др.). Используются для определения концентрации факторов.
4. Другие методы для специальных исследований (например, растворение сгустка, молекулярные методы и др.).

При выборе методов необходимо помнить, что понятия активности и концентрации факторов не всегда тождественны. Так, при лечении варфарином концентрация витамин-К-зависимых факторов, измеренная методом ИФА, может быть в пределах нормы, в то время как их активность в клоттинговых тестах будет снижена (удлинение ПВ и АЧТВ) из-за синтеза функционально неполноценных PIVKA-факторов.

Для калибровки исследования активности и большинства концентраций факторов используется пул цитратных плазм.

Нормальная плазма – это пул бестромбоцитных цитратных плазм, полученный не менее чем от 20 клинически здоровых доноров. В этой плазме активность всех факторов считается по определению как

100% или 1 ед/мл. Нормальная плазма и ее серийные разведения используются для многоточечной калибровки.

Референтная плазма (100% значения) – централизованно приготовленная в соответствии со стандартом нормальная плазма.

Калибровочная плазма – пул цитратных плазм, в котором активность или концентрация компонентов гемостаза точно определены, но могут отличаться от 100%. Калибровочная плазма и ее серийные разведения используются для многоточечной калибровки с учетом активности или концентрации, определенной производителем.

Коагулологические методы исследования плохо поддаются стандартизации. Показатели тестов зависят от качества и состава реактивов и используемого оборудования. Некоторые успехи достигнуты в стандартизации ПВ при использовании МИЧ и расчете МНО в контроле лечения АНД. Во избежание ошибок желательно пользоваться готовыми наборами реактивов, которые поставляют отечественные и зарубежные фирмы. Среди отечественных производителей тест-систем наиболее популярны реактивы фирм «Ренам» (Москва), «Технология-Стандарт» (Барнаул), «МедиоЛаб», (Москва). Рекомендуется использовать наборы одного и того же производителя и отрабатывать референтные значения показателей в условиях своей лаборатории. Для уверенности в правильности проводимых исследований и получении достоверных результатов каждой лаборатории необходимо ежедневно проводить внутрилабораторный контроль качества и участвовать во внешнем контроле качества, отечественном или международном. В связи с недостаточной стандартизацией тестов при внешней оценке качества, например ФСВОК, для большинства тестов учитываются не абсолютные значения времени свертывания плазмы, а степень удлинения или укорочения времени свертывания контрольной плазмы по сравнению с донорской плазмой, измеренных в условиях данной лаборатории.

Все клоттинговые тесты проводятся в силиконированной или пластиковой посуде. Тесты проводятся ручными методами на водяной бане с прозрачными стенками или на полуавтоматических и автоматических анализаторах гемостаза - коагулометрах. Ручные методы допускаются, но воспроизводимость и точность определения у них самая низкая. Это связано с невозможностью стандартизации процесса проведения анализа, осуществляемого разными операторами, а также со сложностью визуальной регистрации времени появления сгустка. Клоттинговые тесты ставятся в дублях. Расхождение времени образования сгустка в параллельных исследованиях должно быть менее 0,5 сек.

Более современным и распространенным является измерение параметров гемостаза с помощью коагулометров. В полуавтоматических коагулометрах автоматизирована только система регистрации. По системе регистрации образования сгустка различают оптические, оптико-механические, механические и турбидиметрические коагулометры. Оптические и оптико-механические приборы могут анализировать только плазму. Эти приборы имеют так называемый автоматический старт: добавление реактива в измеряемую кювету автоматически запускает регистрацию времени образования сгустка. При использовании нескольких реактивов в кювету, поставленную в ячейку для измерения, должен добавляться только последний (стартовый) реактив. В механических коагулометрах может анализироваться и плазма, и цельная кровь. Эти приборы не имеют автоматического старта, отсчет времени запускается механическим нажатием кнопки. Механические коагулометры особенно удобны для поликлиник при мониторинге пациентов, принимающих варфарин, по протромбину капиллярной крови. Автоматические коагулометры проводят всю процедуру анализа в соответствии с заданной программой. Некоторые коагулометры рассчитывают фибриноген по протромбину. Такая методика может быть использована при массовых скрининговых обследованиях, но малопригодна для обследования пациентов с патологией гемостаза.

Постаналитический этап включает заполнение бланка анализа, выдачу анализов из лаборатории и помощь лечащему врачу в интерпретации результатов. Некоторые лаборатории пишут заключение по коагулограмме. Ошибки постаналитического этапа чаще всего связаны с неправильным вписыванием в бланк результатов анализа. Использование современных технологий (автоматизация, компьютеризация, установка лабораторных информационных систем – ЛИС) резко снижает процент ошибок.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ ГЕМОСТАЗА

Методы оценки общей коагуляции.

Для оценки общего комплексного состояния гемостаза существуют методы графической регистрации процессов коагуляции: тромбоэластография (ТЭГ) и тромбоэластометрия (ТЭМ). ТЭМ отличается от ТЭГ использованием компьютерного анализа и активаторов свертывания крови.
Таблица 8.

Основные стандартные параметры ТЭГ и ТЭМ

Параметр	Аббревиатура	Содержание
Время начала коагуляции сек	CT (r)	Время от начала анализа до размаха (амплитуды) 2 мм Отражает время образования тромбина
Время формирования сгустка сек	CFT (k)	Время от амплитуды 2 мм до 20мм Кинетика образования стойкого сгустка из тромбоцитов и фибрина
Угол α (^{0})	Alpha	Касательная к кривой в точке 2 мм Скорость формирования сгустка
Максимальная амплитуда мм	MCF (MA)	Механические свойства сгустка на максимуме свертывания

Принцип метода основан на вовлечении в колебательное движение подвижных кюветы или штифта полимеризованным фибрином. В зависимости от количества фибрина, степени его полимеризации, активности тромбоцитов, наличия гиперфибринолиза на термобумаге или в компьютере изображается характерная кривая в координатах амплитуда - время. Ручная или компьютерная обработка кривой позволяет вычислить ряд необходимых параметров. Основные стандартные параметры указаны в таблице 8. Графическое изображение ТЭМ здорового человека представлено на рисунке 5.

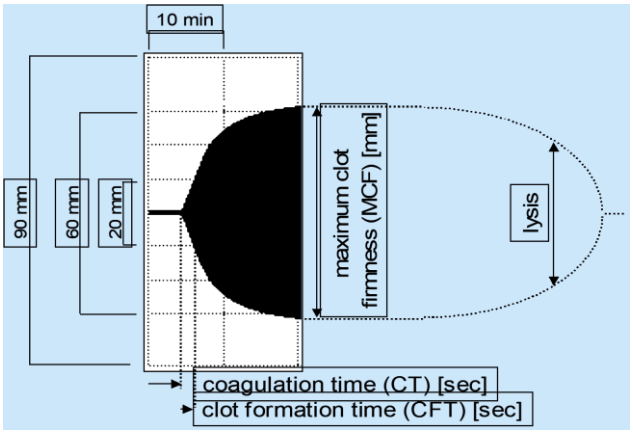


Рис 5. Изображение и параметры ТЭМ.

Графическое изображение процесса наглядно отражает состояние гемостаза (рис.6). Оно содержит информацию о текущем состоянии всех основных звеньев. Метод позволяет качественно и полуколичественно охарактеризовать процесс образования сгустка, его механические характеристики, плотность, стабильность и процесс фибринолиза. Анализ наиболее полезен в тех случаях, когда врачу необходимо быстро принять правильное решение относительно функционального состояния системы гемостаза пациента (гематология, акушерство и гинекология, онкология, травматология, ожоговые отделения, обследование новорожденных, трансплантология, сердечно-сосудистая хирургия, кардиология).

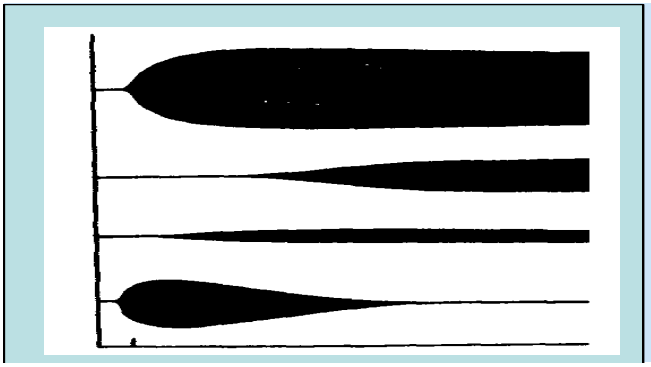


Рис. 6. Различные варианты ТЭМ. Сверху вниз: норма, гемофилия, тромбоцитопения, гиперфибринолиз.

Оценка сосудисто-тромбоцитарного звена.

1. Пробы на длительность и величину капиллярного кровотечения из поверхностных микрососудов после нарушения их целостности. Включает пробу Дьюка и другие методы, например, чувствительную пробу (Айви) на фоне искусственно созданного веностаза при давлении 40 мм рт.ст. Референтные значения до 4-х минут (новорожденные 1-3 мин.).

Время кровотечения характеризует функциональную активность тромбоцитов и капилляров и не зависит от процессов свертыванияплазмы. Время свертывания удлинено при нарушении адгезии и агрегации тромбоцитов, при некоторых типах болезни Виллебранда, выраженной тромбоцитопении, токсическом повреждении капилляров. Однако нормальные результаты проб не исключают дефектов тромбоцитов (проба Дьюка у 2/3 больных с тромбоцитопатиями показывает нормальные результаты). У больных гемофилией время кровотечения находится в пределах допустимых значений. Проба имеет значение в предоперационном скрининге и у детей.

2. Подсчет количества тромбоцитов проводят у пациентов при первичном обследовании, перед операцией, при геморрагических и тромбофилических состояниях, при мониторинге тромбоцитопенического состояния или тромбоцитоза.

Референтные значения составляют 150-380 тыс/мл. При функционально полноценных тромбоцитах явления кровоточивости наблюдаются при снижении уровня тромбоцитов до 50 тыс/мл и менее. Тромбоцитозом считают повышение содержания тромбоцитов более 600 тыс/мл.

Тромбоцитопении в большинстве случаев обусловлены аутоиммунной или гетероиммунной патологией, а также приемом лекарственных препаратов, в частности гепарина. Тромбоцитопения также может быть связана с повышенным депонированием тромбоцитов в селезенке при портальной гипертензии, хроническом миелолейкозе и других видах спленомегалии, при вирусных и бактериальных инфекциях, при миелофтизе, некоторых видах анемий, повышенном потреблении тромбоцитов при ДВС-синдроме и некоторых других состояниях.

Различают первичный тромбоцитоз, связанный с дефектом стволовых клеток, и реактивный тромбоцитоз. Он наблюдается при миелопролиферативных расстройствах, злокачественных заболеваниях, некоторых анемиях, воспалительных процессах, после спленэктомии и др.

Подсчет тромбоцитов проводят несколькими методами:

1). Непосредственный подсчет в крови.

- С помощью счетной камеры в фазово-контрастном микроскопе из обогащенной тромбоцитами плазмы (референтный метод). Ошибка метода составляет от 10%.
- С помощью автоматического счетчика. Ошибка метода минимальная при отсутствии агрегатов тромбоцитов. Наиболее точный подсчет в интервале от 60 до 600 тыс/мл.

2) Подсчет в мазках крови по Фонио. Ошибка метода составляет до 25%.

Таким образом, в большинстве случаев наиболее точный подсчет тромбоцитов обеспечивает гематологический анализатор, который определяет следующие тромбоцитарные параметры: количество тромбоцитов (Platelets, PL, PLT), средний объем тромбоцита (MPV), дисперсию распределения тромбоцитов по объему (PDW) и рисует гистограммы тромбоцитов, то есть графики распределения тромбоцитов по объему. В случае отклонения показателей тромбоцитов от референтного интервала или при наличии аномальных гистограмм тромбоцитов или эритроцитов необходимо исследовать мазок периферической крови и посчитать тромбоциты в мазке крови по Фонио.

Наиболее частая причина, приводящая к ошибкам подсчета тромбоцитов в гематологическом анализаторе – агрегация тромбоцитов, которая проявляется ложной тромбоцитопенией - псевдотромбоцитопенией. Псевдотромбоцитопения может быть связана с индуцированной ЭДТА-агглютинацией (ЭДТА-индуцированная псевдотромбоцитопения) или слипанием тромбоцитов с нейтрофилами под влиянием тромбоцитарных агглютининов (рис 7).

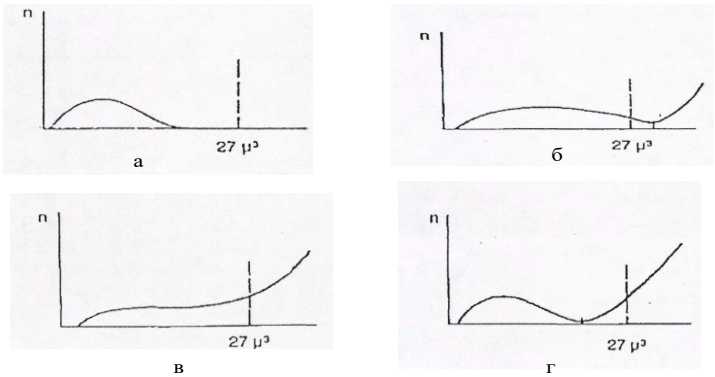


Рис.7. Гистограммы тромбоцитов: а – норма; б, в – гигантские тромбоциты или их агрегаты (на гистограмме отсутствует нормальный пик распределения, график смещается вправо и меняет свою форму); г – гистограмма тромбоцитов при наличии микроцитов

ЭДТА-индуцированная псевдотромбоцитопения встречается у 0,1-1% пациентов при использовании в качестве антикоагулянта ЭДТА. Она обусловлена наличием антител, которые в присутствии ЭДТА связываются с мембранами тромбоцитов, вызывают аггютинацию тромбоцитов in vitro и уменьшение количества кровяных пластинок при подсчете. При ЭДТА-индуцированной тромбоцитопении рекомендуется подсчет тромбоцитов в пробе крови проводить с цитратом или гепарином сразу после взятия крови.

Псевдотромбоцитоз может быть обусловлен дополнительным подсчетом эритроцитов при микроцитозе или наличии фрагментированных эритроцитов.

При анализе мазка крови необходимо обращать внимание на морфологию тромбоцитов. Визуально под микроскопом виден и размер тромбоцитов, и наличие агрегатов, и некоторые морфологические изменения. При тромбоцитопатии, связанной с нарушением формирования белковых гранул, тромбоциты не прокрашиваются, выглядят серыми (синдром «серых» тромбоцитов).

Оценка функционального состояния тромбоцитов.

Оценка функции тромбоцитов проводится при изучении их агрегации с использованием различных индукторов агрегации. Предлагавшиеся ранее фактически качественные методы с оценкой агрегации на предметном стекле, в пробирке или с помощью ФЭКа в настоящее время являются устаревшими. Функции тромбоцитов оцениваются с помощью специальных приборов – агрегометров.

Принцип работы большинства агрегометров основан на снижении светопоглощения богатой тромбоцитами плазмы при образовании агрегатов тромбоцитов. Агрегация провоцируется добавлением различных индукторов агрегации или оценивается без их добавления (спонтанная агрегация).

Использование агрегометров необходимо в следующих ситуациях:

1. При выявлении наследственных или приобретенных тромбоцитопатий и тромбоцитопений.
2. При диагностике болезни Виллебранда.
3. При комплексном исследовании системы гемостаза у пациентов с нарушениями свертывания крови.
4. При лечении антиагрегантами, особенно аспирином, так как у 10-38% пациентов либо существует врожденная, либо формируется приобретенная толерантность к действию препарата.

В качестве индукторов агрегации используют АДФ, адреналин, тромбин, коллаген, ристоцетин, арахидоновую кислоту и некоторые другие агенты.

Дифференциальная диагностика патологии тромбоцитов обычно проводится в специализированных лечебных учреждениях. В поликлиниках и многопрофильных больницах агрегатограмма актуальна при комплексном исследовании системы гемостаза и мониторинге лечения антиагрегантами.

При лечении препаратами аспирина исходная агрегатограмма спонтанной (без индуктора) или индуцированной адреналином агрегации тромбоцитов сравнивается с агрегатограммой, полученной через 3-4 дня лечения аспирином. Снижение агрегации в 3-4 раза свидетельствует о наличии эффекта аспирина и об адекватности дозы. Отсутствие снижения агрегации связано с толерантностью к аспирину и предполагает замену антиагреганта.

При использовании плавикса оценка АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов полезна для корректировки дозы. Снижение агрегации с АДФ на 3-4 день в 3-4 раза свидетельствует о наличии эффекта и об адекватности дозы.

Для анализа агрегации тромбоцитов используется свежая обогащенная тромбоцитами плазма (ОТП). Хранение проб крови не должно превышать 45 мин.

Тесты скриниговой коагулограммы.

К тестам скриниговой коагулограммы относятся протромбиновое время (ПВ), активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ), тромбиновое время (ТВ) и фибриноген. ПВ выявляет нарушения внешнего пути свертывания, АЧТВ – внутреннего пути свертывания, ТВ – конечного этапа свертывания, то есть образования фибрина из фибриногена. При проведении тестов время свертывания плазмы пациента сравнивается со временем свертывания плазмы здоровых доноров. Укорочение времени свертывания указывает на гиперкоагуляцию, удлинение – на гипокоагуляцию. Удлинение времени свертывания во всех трех тестах одновременно встречается при гепаринотерапии, присутствии в пробе продуктов деградации фибрина/фибриногена (ПДФ) или патологических ингибиторов. Эти тесты являются базисными, так как позволяют решить, какой уточняющий тест необходимо выполнить.

Протромбиновое время (ПВ).

ПВ (ПТ) является тестом на внешний (быстрый) механизм гемокоагуляции. В свертывании крови по внешнему пути участвует тканевой фактор (ТФ), он же тканевой тромбопластин, который запускает реакцию свертывания плазмы, витамин К- и одновременно Ca^{++}-зависимые факторы VII, X и II (протромбин), фактор V и фактор I (фибриноген). В физиологических условиях ТФ попадает в кровь из поврежденных или разрушенных клеток, в том числе лейкоцитов, макрофагов, клеток опухолей и тканей, и активирует процесс свертывания крови.

Основные области применения: как скриниговый тест исследования свертывающей системы крови, контроль гемостаза при лечении антикоагулянтами непрямого действия (АНД), оценка синтеза в печени факторов протромбинового комплекса.

Принцип метода состоит в определении времени свёртывания бедной тромбоцитами цитратной плазмы после добавления тканевого фактора и Ca^{++}. В качестве тканевого фактора используется тканевой тромбопластин. Тканевые тромбопластины – это водные экстракты липопротеинов тканей млекопитающих, богатые тканевым фактором. Фосфолипиды входят в состав тканевого тромбопластина. Реактивы отличаются активностью, чувствительностью и растворимостью. Для получения воспроизводимых

результатов предпочтительно пользоваться готовыми наборами реактивов. ПВ является фосфолипидзависимым тестом.

ПВ может выражаться несколькими способами:

1. Время свертывания в сек.
2. Протромбиновый индекс (ПИ, ПТИ)

$$\text{ПТИ} = \frac{\textit{Время свертывания нормальной плазмы}}{\textit{Время свертывания плазмы пациента}} \times 100\%$$

3. Протромбиновое отношение (ПО)

$$\text{ПТИ} = \frac{\textit{Время свертывания плазмы пациента}}{\textit{Время свертывания нормальной плазмы}}$$

4. Протромбин по Квику в %. Определяется по калибровочному графику.
5. МНО (Международное Нормализованное Отношение), которое представляет ПО, возведенное в степень Международного Индекса Чувствительности (МИЧ).

$$МНО = ПО^{МИЧ}$$

Время свертывания в сек, ПТИ и ПО – качественные показатели. Время свертывания в сек не определяют из-за низкой воспроизводимости результатов при смене реагентов, ПО используется как промежуточный показатель при определении МНО, а ПТИ имеет низкую информативность и определяется только в Росси и странах ближнего зарубежья. Ограничения в использовании ПТИ связаны с зависимостью параметра от исходной активности и чувствительности тканевого тромбопластина. Значения показателя одного и того же больного, измеренные в разных лабораториях, могут существенно отличаться. Референтные пределы 80-110%.

Все попытки полной замены определения ПТИ на протромбин в процентах по Квику в России не увенчались успехом. Это связано с объективными обстоятельствами. Во-первых, ряд лабораторий до сих пор приобретает не аттестованный тромбопластин. Во-вторых, многие лаборатории не имеют программируемых коагулометров. Проведение исследований на водяной бане повышает вероятность субъективных ошибок.

В настоящее время принято выражать ПВ в % по Квику. Несмотря на то, что время свертывания зависит от используемого тромбопластина, типа добавок в реагент, метода детекции (мануальная, автоматическая), типа образцов и калибровочного материала, это количественный метод, конечные результаты которого получают в соответствии с калибровочным графиком. Для построения графика готовят несколько концентраций протромбина донорской плазмы: без разведения (100%) и с разведением физраствором в несколько раз, например, в 2 (50%) и 4раза (25%). Допускаются и другие разведения, например, 75%. Если процент протромбина, указанный в паспорте плазмы-калибратора, отличается от 100, то расчет процента проводят, исходя из реальных цифр. Например, если исходное содержание протромбина по паспорту контрольной плазмы 96%, то следующие разведения составят 48% и 24% соответственно. После анализа калибровочных проб строится график в обратной системе координат, и процент протромбина определяется по графику. При ручной калибровке результаты ограничены 100% активностью и могут быть определены только по калибровочному графику, что для среднего медперсонала представляет сложность. Таким образом, лаборатории без должного оборудования обречены на ПТИ.

Коагулометры, как правило, имеют программу, которая после проведения калибровки результаты в сек переводит в % по Квику, поэтому ручное построение графика не требуется. Референтные пределы 70-130%.

ПТИ % не соответствует процентам по Квику.

Клиническая интерпретация.

Снижение активности (гипокоагуляция) - удлинение ПВ, снижение ПТИ и протромбина по Квику в %, наблюдается при недостатке факторов свертывания крови из-за естественного или индуцированного лекарствами снижения синтеза или ингибировании факторов.

1. Наследственный или приобретенный дефицит факторов, задействованных во внешнем пути активации протромбиназы (VII, X, V, II, I).
2. Дефицит витамина К (II, VII и X факторы образуются в гепатоцитах в присутствии витамина К).
3. Прием лекарственных средств - антагонистов витамина К, АНД (варфарина, фенилина) и усиливающих их действие препаратов: анаболических стероидов, клофибрата, глюкагона, тироксина, индометацина, неомицина, оксифенбутазона, салицилатов; гепарина, урокиназы.

4. ДВС-синдром.
5. Присутствие в пробе первичных и вторичных антикоагулянтов (гепарин, ПДФ).
6. Присутствие патологических ингибиторов свертывания.
7. Заболевания печени со снижением синтетической функции.

Повышение активности (гиперкоагуляция) - укорочение ПВ, рост ПТИ и протромбина по Квику в %, отражает массивное поступление тканевого фактора в кровоток (травма, некроз), активацию свертывания во время беременности или после родов, недостаток физиологических антикоагулянтов.

АНД, будучи антагонистами витамина К, влияют как на внешний, так и на внутренний путь активации протромбиназы. Однако эффект больше выражен на внешнем каскаде, и ПВ меняется больше, чем АЧТВ. При лечении АНД в начале терапии из-за большого количества флуктуаций используется ПВ, а при стабилизации лечения – МНО.

МНО – расчетный показатель, принятый ВОЗ в 1983г. для контроля лечения антикоагулянтами непрямого действия. Международный Индекс Чувствительности (МИЧ, International Normal Ratio - INR) необходим для приведения данных ПО, определяемых с различными тромбопластинами, к величине, которая была бы определена первичным стандартом тромбопластина (эталоном). Производители реактивов определяют чувствительность каждой серии тромбопластинов, сравнивая ее с эталоном, и указывают значение МИЧ в паспорте к набору. Оптимально работать с тромбопластинами, имеющими МИЧ, близкий к 1 (0,96-1,5).

При наличии гипокоагуляции МНО повышается. Использование МНО позволяет оценить степень гипокоагуляции независимо от используемого тромбопластина. В результате появляется возможность сравнивать данные, полученные в разных лабораториях. Определение МНО возможно только при использовании аттестованного по МИЧ тромбопластина. Допускается проведение анализа ручными методами. Оптимальные пределы МНО, которые должны быть достигнуты в ходе лечения антикоагулянтами непрямого действия, зависят от терапевтических целей и определяются лечащим врачом. Обычно для профилактики гиперкоагуляции МНО поддерживается в пределах 2-2,5. Высокое МНО (4,5) иногда используется в лечебных целях, но чревато возможностью возникновения кровотечения.

МНО не используется:

1. Для скрининговых исследований.
2. В начале терапии АНД.
3. При оценке функции печени.

Активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ).

Термин частичное (парциальное) обусловлен использованием в составе реактивов фосфолипидов, а не тканевого фактора. АЧТВ относится к фосфолипидзависимым тестам. Он предназначен для оценки внутреннего механизма образования протромбиназы. Во внутреннем каскаде участвуют ВМК, ПК, XII, XI, IX, VIII, X, V, II и I факторы, из них IX, X и II – витамин К- и Ca^{++}-зависимые.

Основные области применения: как скрининговый тест, контроль за лечением гепарином, первичное выявление волчаночного антикоагулянта (ВА).

Принцип метода состоит в определении времени свертывания БТП при запуске его по внутреннему механизму после добавления кальция в условиях стандартизации контактной и фосфолипидной фаз коагуляции. Контактная фаза может быть активирована веществами неорганического (каолином, сульфатидами) и органического (эллаговой кислотой) происхождения.

На результаты исследования значительно влияет состав фосфолипидов, которые являются заменителем 3-его фактора тромбоцитов ($Р_3$).Они могут быть представлены фосфолипидами мембран тромбоцитов, фосфолипидами синтетического происхождения или выделенными из тканей животных и человека, фосфолипидами растительного происхождения (из сои), смесью животных и растительных фосфолипидов, фосфолипидами из мембран эритроцитов человека (эрилид, эритрофосфатид). В зависимости от того, выявление каких нарушений приоритетно для данной лаборатории, выбираются соответствующие наборы реагентов. Так, сочетание эллаговой кислоты и соевых фосфолипидов чувствительно к дефициту факторов и присутствию гепарина, а каолина и эрилида – как к дефициту факторов, гепарину, так и к волчаночному антикоагулянту.

Метод плохо стандартизируется, результаты зависят от прибора и используемых реагентов, поэтому свойства реактивов должны быть известными. Желательно пользоваться реактивами одного производителя. В ряде случаев полезно рассчитывать отношение АЧТВ больного/АЧТВ донора (нормальной контрольной плазмы).

При проведении теста на АЧТВ воспроизводимость результатов зависит от соблюдения времени преинкубации плазмы с фосфолипидами и активатором контактной фазы перед добавлением $CaCl_2$. Время преинкубации, указанное в методике анализа, должно неукоснительно соблюдаться.

Клиническая интерпретация.

Удлинение АЧТВ (гипокоагуляция)**:**

1. Дефицит факторов внутреннего пути.
2. Наличие гемофилии (врожденный дефицит факторов VIII и IX вызывает соответственно гемофилию А и В).
3. Дефицит витамина К или лечение АНД (витамин-К-зависимые факторцы II, IX и X участвуют во внутреннем пути).
4. Лечение гепарином и другими антикоагулянтами прямого действия.
5. ДВС-синдром в фазу гипокоагуляции.
6. Заболевания печени со снижениием синтетической функции.
7. Присутствие в пробе вторичных антикоагулянтов (ПДФ и др.).
8. Присутствие патологических ингибиторов свертывания.
9. Наличие волчаночного антикоагулянта (ВА).

Гепаринотерапия и введение гепарина в тестируемую плазму ведет к дозозависимому удлинению АЧТВ. При введении терапевтических доз ОГ время свертывания в тесте АЧТВ должно удлиняться в 1,5-2,5 раза по сравнению со средним по серии, а не с АЧТВ пациента. При длительном лечении гепарином, а также после фибринолитической терапии может развиться резистентность (устойчивость) к гепарину. Она проявляется в укорочении времени АЧТВ на фоне неизменной дозы гепарина. Данный факт свидетельствует о неэффективности лечения и возрастанию риска тромбоза. Устойчивость к гепарину чаще всего связана с недостатком антитромбина, поэтому пациентам на гепаринотерапии рекомендуется определять антитромбин. Другими причинами может быть высвобождение тромбоцитами гепарин-нейтрализующих веществ или увеличение их уровня в острой фазе воспаления. Введение НМГ в настоящее время принято контролировать остаточной активностью фактора Ха, хотя АЧТВ удлиняется аналогично введению ОГ.

При лечении АНД АЧТВ рекомендуется измерять в начале лечения, а также при длительном приеме препаратов. Время свертывания, как правило, удлиняется в 2-2,5 раза по отношению к норме. При приеме оральных антикоагулянтов между цифрами АЧТВ и ПВ корреляции не выявлено.

Влияние патологических ингибиторов и волчаночных антикоагулянтов (ВА) более подробно будет рассмотрено в тесте на ВА.

Укорочение АЧТВ (гиперкоагуляция) свидетельствует о тромбофилии. Причиной может быть резистентность фактора V к протеину С, повышение уровня фактора VIII, активация факторов, физиологическое повышение свертывания крови при беременности.

Часто укорочение АЧТВ связано с нарушением работы с кровью на преаналитическом этапе.

Тромбиновое время

Тромбиновое время (ТВ) характеризует конечный этап процесса свертывания плазмы: превращение фибриногена в фибрин под действием тромбина. Тест является скрининговым на полимеризацию фибриногена/фибрина и на антикоагулянтную активность плазмы.

Принцип метода заключается в определении времени свертывания БТП при добавлении к ней стандартной концентрации тромбина. Так как тромбин непосредственно активирует фибриноген, тест не нуждается в добавлении кальция или каких-либо дополнительных реагентов. При проведении теста используется тромбин низкой или средней концентрации. Тромбин низкой концентрации вызывает образование сгустка в течение 15-20 сек. (референтные значения указаны в методике анализа). Он используется для скриниговых исследований. При работе с плазмой, содержащей гепарин, рекомендуется более высокая концентрация тромбина, так как комплекс антитромбин-гепарин, который образуется при введении гепарина, быстро нейтрализует добавленный тромбин. Тест очень чувствителен к гепарину. Сразу после внутривенного введения гепарина и в терминальной фазе ДВС-синдрома в тромбиновом тесте кровь не сворачивается. ТВ удлиняется при заборе крови через катетер, обработанный гепарином.

Для правильной интерпретации результатов теста к пробе крови, содержащей гепарин, допускается добавить протаминсульфат для нейтрализации гепарина или измерить рептилазное время. Рептилаза или батроксобин – это коагулаза из яда змеи щитомордника. Она действует аналогично тромбину, но не подвержена влиянию гепарина.

Удлинение ТВ (гипокоагуляция):

1. Снижение концентрации фибриногена до 1-0,5 г/л.
2. Качественное изменение молекулы фибриногена (дисфибриногенемия).

3. Введение антикоагулянтов прямого действия (гепарина).
4. Высокое содержание ПДФ при повышенном фибринолизе, лечении фибринолитиками, ДВС-синдроме.
5. Наличие патологических ингибиторов.

Ингибиторы, удлиняющие ТВ, делятся на ингибиторы полимеризации, которых большинство, и ингибиторы тромбина. Ингибиторы полимеризации – это аномальные иммуноглобулины, которые нарушают процесс полимеризации фибриногена. Все ингибиторы ассоциированы с основным заболеванием, например, множественной миеломой, и представлены парапротеинами или криоглобулинами. При наличии ингибиторов тромбина время свертывания в рептилазном тесте остается нормальным.

В ряде случаев удлинение ТВ наблюдается при уремии и при наличии ВА.

Определение ТВ полезно при проведении фибринолитической и гепаринотерапии.

Укорочение ТВ свидетельствует о гиперкоагуляции и риске тромбозов.

Фибриноген.

Фибриноген – это белок плазмы крови, который синтезируется в печени. Содержание фибриногена практически не зависит от пола и возраста. Хотя сам по себе он не активирует гемостаз, эпидемиологические исследования показали, что фибриноген является независимым фактором риска инфаркта миокарда и ишемического инсульта. Рост содержания фибриногена увеличивает тенденцию к тромбообразованию, усиливает агрегацию тромбоцитов, ухудшает реологические свойства крови, способствует атеросклерозу и повышает риск развития тромбозов. Однако пределы для терапевтического вмешательства пока не определены.

Фибриноген является белком острой фазы воспаления. При тяжелых бактериальных инфекциях, травме, тромбозе он может повышаться до 10г/л и более. Рост содержания фибриногена коррелирует с повышением СОЭ.

Референтные пределы 2-4 г/л.

Основные методы определения.

1. Клоттинговый метод по Клаусу является наиболее адекватным и распространенным методом и относится к функциональным тестам. Он основан на определении времени образования сгустка при добавлении к разведенной в 10-20 раз плазме тромбина в высокой концентрации. Между временем образования сгустка и концентрацией фибриногена выявлена логарифмическая зависимость. Метод требует предварительного построения калибровочного графика в соответствии с инструкцией к набору реактивов. При отсутствии программируемых коагулометров данным методом пользоваться нежелательно: небольшая погрешность в определении времени коагуляции приводит к значительным ошибкам в содержании фибриногена. К ограничениям метода относится чувствительность результатов к гипер-, дис-, гиперфибриногенемии и избытку ПДФ, которые снижают активность полимеризации фибриногена.
2. Определение фибриногена по Р.А. Рутберг. Метод основан на взвешивании высушенного фибринового сгустка после добавления к 1 мл плазмы тромбопластин-кальциевой смеси или тромбина. Метод ручной, мало чувствительный и воспроизводимый и считается устаревшим. Однако при гипо- и дисфибриногенемиях его результаты более надежные, чем при методе Клауса.
3. Другие методы (турбидиметрические, фотометрические с использованием хромогенных субстратов, иммунохимические) относятся к концентрационным, так как непосредственно определяют концентрацию фибриногена.

Увеличение содержания (гиперкоагуляция)**:** воспаление, некроз, курение, заболевания почек, коллагенозы, новообразования, атеросклероз, прием оральных контрацептивов, беременность, сахарный диабет, ожирение, стресс.

Снижение содержания (гипокоагуляция**):** врожденный дефицит, ДВС, печеночно-клеточная недостаточность, острый фибринолиз, лейкозы, инфекционный мононуклеоз, действие лекарственных препаратов (рептилаза, фибраты, фенобарбитал, стрептокиназа, урокиназа, актилизе и др.), физическая нагрузка.

Дисфибриногенемия характеризуется наличием функционально дефектной молекулы фибриногена в плазме крови. Наследственные дисфибриногенемии встречаются редко. Они протекают чаще бессимптомно, иногда с тенденцией к кровоточивости или тромбозам. Приобретенная дисфибриногенемия наблюдается у пациентов с тяжелыми заболеваниями печени. Дисфибриногенемии характеризуются следующими лабораторными показателями:

- увеличением тромбинового и рептилазного времени,
- расхождением результатов при измерении уровня фибриногена функциональным тестом (по Клаусу, низкое) и концентрационным (более высокое или нормальное).

Дополнительные тесты.

Оценка системы фибринолиза. Фибринолитическая активность.

Для оценки системы фибринолиза можно проводить тесты, которые позволяют измерить концентрацию тех или иных факторов (плазминоген, α_2-антиплазмин, концентрацию плазмин-антиплазминового комплекса и др.). Однако наиболее общее представление о системе фибринолиза может быть получено при проведении традиционного функционального теста – оценки фибринолитической активности крови (ФАК). Тест отличает простота исполнения и отсутствие специального оборудования. Недостатком является невозможность автоматизации. Результат теста на ФАК зависит от уровня фибриногена, качества полимеризации фибрина и наличия гепарина.

В настоящее время используется две модификации теста.

1. Спонтанный эуглобулиновый фибринолиз. При осаждении белков плазмы крови слабой, как правило, уксусной кислотой, происходит осаждение так называемой эуглобулиновой фракции, которая содержит фибриноген, факторы свертывания, плазминоген и его активаторы, но практически свободна от ингибиторов фибринолиза. При таком мягком осаждении белки не теряют своих свойств. После растворения осажденных белков в буферном растворе, добавлении $CaCl_2$ и образовании после этого фибринового сгустка время лизиса сгустка отражает ФАК. Референтные пределы 2-4 часа.
2. XIIa-зависимый фибринолиз (или Хагеман-зависимый фибринолиз, ф. XII - фактор Хагемана) отличается от спонтанного тем, что при осаждении белков в реакционную смесь добавляют каолин. Каолин является активатором ф. XII и внутреннего пути фибринолиза. Время проведения анализа резко сокращается, так как лизис сгустка составляет 4-12 мин.

При выборе метода оценки ФАК необходимо учитывать особенности патологии пациента. Так, при скрининговых исследованиях, при обследованиях беременных и других пациентов с тромбофилией, адекватным будет определение XIIa-зависимого фибринолиза. Для пациентов с ДВС-синдромом, после операций на органах внутренней секреции или с метастазирующими опухолями, а также при других состояниях с возможностью гиперфибринолиза, более подходит определение спонтанного эуглобулинового фибринолиза: при активации фибринолиза время лизиса сгустка сокращается, а достоверно визуально отследить растворение сгустка за период времени менее 4-х минут практически невозможно.

Активация фибринолиза (укорочение времени лизиса сгустка, гипокоагуляция) наблюдается при уменьшении концентрации фибриногена, гипо- и дисфибриногенемиях, панкреатитах и панкреонекрозах, операциях на органах внутренней секреции и легких, акушерских осложнениях, введении адреналина, пирогенных реакциях, метастазирующих опухолях, ДВС-синдроме, снижении уровня ингибиторов плазминогена, лечении фибринолитиками и активаторами плазминогена.

Ингибирование фибринолиза (удлинение времени лизиса сгустка, гиперкоагуляция) наблюдается при гиперфибриногенемии, врожденном дефиците плазминогена или его аномалиях, снижении плазминогена и его активаторов при повышенном потреблении или сниженном синтезе (тромбозы, васкулиты, сепсис, заболевания печени, ДВС-синдром), беременности.

Тест может применяться для контроля эффективности лечения фибринолитиками.

Оценка антикоагуляционного звена гемостаза.

Противосвертывающая система, которая ограничивает процессы свертывания крови, представлена несколькими белками. К основным физиологическим антикоагулянтам относятся антитромбин (АТ, ранее антитромбин III), и система протеина С («си»). Эти системы имеют различный механизм действия: АТ ингибирует ферменты свертывания, а система протеина С инактивирует кофакторы ферментов, поэтому исследования должны включать анализ обеих систем. Дефицит или дефект как одного, так и другого антикоагулянта являются подтвержденными факторами риска развития тромбозов.

Антитромбин.

Антитромбин – это гликопротеид с ОММ 58000Д, который синтезируется в печени. В связи с низкой ОММ (<70000Д) он легко выводится через почки. АТ ингибирует сериновые протеазы, в первую очередь тромбин (ф. IIa) и ф. Xa. В присутствии гепарина активность АТ увеличивается в тысячи раз. Противосвертывающее действие гепарина реализуется через АТ, без которого гепарин не оказывает антикоагулянтного эффекта. По литературным данным, на долю АТ приходится 75-90% всего антикоагулянтного потенциала.

Методы определения.

1. Клоттинговые методы. Это скриниговые функциональные методы, которые оценивают активность АТ по ингибирующему действию на тромбин. Тест калибруется по нормальной донорской плазме и оценивается в процентах. Референтные значения составляют от 75 до 125%.

2. Методы с хромогенным субстратом позволяют оценить амидолитическую активность АТ, которая может не соответствовать его биологической активности. Однако простота и доступность метода получили широкое распространение в КДЛ.
3. Иммунохимические методы определяют концентрацию антитромбина.

Снижение активности (гиперкоагуляция).

Врожденное: дефицит или аномалии АТ.

Приобретенное:

Заболевания печени (снижение синтеза).

Выраженная протеинурия (повышенное выведение АТ через почки).

Злокачественные новообразования (активация коагуляции, рост потребления).

Прием оральных контрацептивов, кортикостероидов, лечение L-аспарагиназой.

Беременность и поздние токсикозы беременности (гестозы).

Массивное образование тромбина (ДВС, сепсис, терминальные состояния).

Лечение большими дозами гепарина.

Большинство случаев дефицита АТ является приобретенным. Следует иметь в виду, что при снижении АТ <60% резко повышается риск развития тромбозов, поэтому всем пациентам с тромбофилиями и указанными выше состояниями необходимо определять активность АТ. Перед лечением большими дозами гепарина, в том числе ДВС-синдрома, контроль АТ исключительно полезен, так как при падении уровня АТ гепарин не оказывает эффекта. Установлено, что восстановление уровня антикоагулянтов при остром и подостром ДВС-синдроме свидетельствует о благоприятном прогнозе заболевания.

Повышение активности (гипокоагуляция): острый вирусный гепатит, холестаз, прием анаболических стероидов, лечение АНД.

Система протеина С.

Основными белками системы протеина С являются протеин С и его кофактор протеин S. Это витамин К-зависимые сериновые протеазы, которые синтезируются в печени. Действие системы протеина С направлено на инактивацию факторов VIIIa и Va - ускорителей процесса свертывания плазмы. При активации системы протеина С также ингибируется PAI-1, что приводит к запуску фибринолиза. Белки системы протеина С в физиологических условиях активируются тромбином. Для активации необходимо наличие фосфолипидов и Ca^{++}, что характерно для всех витамин К-зависимых факторов. В условиях in vitro система запускается протаком – активатором из яда змеи щитомордника.

Тесты системы протеина С включают оценку общей активности системы протеина С, определение активности протеина С, протеина S, фактора Va.

Методы определения.

Оценка системы протеина С может проводиться с помощью клоттинговых и иммунохимических методов, а также с использованием хромогенных субстратов.

Скрининговый метод оценки общей активности системы протеина С.

Метод разработан на основе модифицированного теста АЧТВ. При наличии в плазме активированного протеина С (АПС) время свертывания плазмы здорового человека удлиняется за счет инактивации факторов VIIIa и Va. Активация проводится добавлением протака. При проведении теста измеряется время свертывания плазмы пациента с АПС и без АПС. В некоторых модификациях метода время свертывания плазмы пациента сравнивается со временем свертывания нормальной донорской плазмы. В методике анализа приводится формула для расчета нормализованного отношения и критерии оценки теста в цифровом выражении, которые зависят от используемых реагентов.

У ряда пациентов практически отсутствует удлинение АЧТВ при добавлении АПС. В связи с этим был введен термин «резистентность к активированному протеину С».

Снижение активности системы протеина С обусловлено одной из трех причин: дефицитом протеина С, дефицитом протеина S или резистентностью фактора Va к АПС. Структурное изменение молекулы ф. V ведет к невозможности его полной инактивации под действием АПС. Для дифференциальной диагностики нарушений проводят тесты, указанные выше, в полном объеме.

Несмотря на то, что на долю системы протеина С приходится всего 10-15% всей антикоагуляционной активности крови, снижение уровня протеина С и его кофакторов до 50% от нормы приводит к появлению рецидивирующих венозных тромбозов, ювенильных тромбозов, которые появляются в молодом возрасте, и тромбэмболий. Гомозиготная недостаточность протеина С вызывает развитие фульминантной пурпуры у детей, практически несовместимой с жизнью. Гетерозиготный дефицит проявляется ранними тромбозами.

Снижение активности (гиперкоагуляция). Различают наследственные и приобретенные факторы, снижающие активность системы протеина С.

Наследственные факторы: мутации в генах протеина С, протеина S, фактора V. Мутация фактора V Лейден, наиболее распространенная среди европейского населения, вызывает резистентность к АПС.

Приобретенные факторы: наличие волчаночных антикоагулянтов, беременность, избыток фактора VIII, возраст старше 50 лет, ДВС-синдром, заболевания печени, сепсис, лечение L-аспарагиназой, дефицит витамина К, лечение варфарином и другими АНД.

Антикоагулянты непрямого действия снижают синтез всех витамин-К-зависимых факторов, в том числе протеина С и протеина S. Варфарин, назначенный пациентам с низкой активностью протеина С, провоцирует тромбозы и некрозы кожи. Перед назначением варфарина, особенно пожилым и лицам с ранними тромбозами, необходимо проводить тест на общую активность системы протеина С. При низкой активности системы варфарин рекомендуется вводить постепенно, начиная с малых доз, или заменить фракционированным гепарином.

Оценка уровня тромбинемии.

Процессы свертывания крови у человека идут постоянно, но они носят локальный характер. При активации процессов свертывания происходит повышенная генерация тромбина, который в физиологических условиях запускает процесс превращения растворимого фибриногена в нерастворимый фибрин. Очевидная оценка уровня коагуляции по количеству тромбина привлекательна, но недоступна, так как тромбин имеет короткий срок жизни, и определить его количество в плазме практически невозможно. Уровень тромбинемии, и, соответственно, активность процессов свертывания, оценивают по продуктам, которые образуются при активации протромбина и превращении тромбином фибриногена в фибрин.

При активации протромбина образуются различные продукты, но обязательным является формирование тромбина и фрагмента F1+2, между которыми существует стехиометрическое соотношение. По уровню F1+2 можно отслеживать как гиперкоагуляцию (рост), так и гипокоагуляцию (снижение). Время жизни фрагмента F1+2 составляет 30 мин. При взаимодействии тромбина с антитромбином образуются тромбин-антитромбиновые комплексы (ТАТ), которые также могут быть использованы в качестве маркера тромбинемии. Однако наиболее доступный способ оценки уровня тромбинемии - определение веществ, которые образуются при активации и разрушении фибриногена и фибрина.

При активации тромбином фибриногена от последнего отщепляются два фибринопептида А (ФПА), два фибринопептида В (ФПВ) и образуется фибрин-мономер. Определение ФПА достаточно давно используется как маркер активации гемостаза, однако он быстро выводится почками. Фибрин-мономер формирует фибрин-олигомеры и полимеры растворимого фибрина, которые под действием фибрин-стабилизирующего фактора (XIII) превращаются в нерастворимый фибрин (рис.3). Далее фибриновый сгусток лизируется плазмином с образованием Д, Е, Д-Е и Д-Д-фрагментов фибрина - Д-димеров. При высокой активности плазмина, снижении уровня антиплазминов и высоком уровне фибриногена плазмин может расщеплять фибриноген с образованием Д, Е, и Д-Е-фрагментов. Все эти продукты называются продуктами деградации фибрина/фибриногена (ПДФ). Их количество можно измерять иммунологическими методами с использованием поликлональных антител.

У здорового человека уровень ПДФ очень мал и не всегда определяется обычными лабораторными тестами. Кроме того, ПДФ утилизируются фагоцитами. При активации свертывания крови уровень ПДФ возрастает, происходит расширение пула фибриногена, и одновременно активируется фибринолиз. Продукты начинают взаимодействовать между собой, образуя растворимые фибрин-мономерные комплексы (РФМК), которые препятствуют полимеризации фибриногена и тем самым выполняют роль вторичных антикоагулянтов. Из всех ПДФ единственным фрагментом, который образуется только из фибрина тромба, являются Д-димеры.

Доступные методы определения составляющих ПДФ.

Паракоагуляционные тесты.

К паракоагуляционным тестам относятся орто-фенентролиновый, этаноловый и протаминсульфатный. Они основаны на образовании геля или хлопьев при добавлении к плазме крови пациента с тромбинемией орто-фенантролина, 50% этанола или протаминсульфата. В настоящее время о-фенантролиновый тест используется как полуколичественный. Остальные методы считаются мало чувствительными, плохо воспроизводимыми и устаревшими.

Определение РФМК орто-фенантролиновым методом.

Метод основан на появлении хлопьев паракоагулята при добавлении о-фенантролина к бедной тромбоцитами плазме пациентов. Время появления хлопьев отражает степень тромбинемии: чем выше уровень РФМК, тем раньше появляются хлопья. Тест ручной полуколичественный. Реагенты отечественные. **Повышение РФМК** (гиперкоагуляция) наблюдается во всех случаях тромбинемии: при тромбофилии, тромбозах и тромбэмболях, беременности, высоком уровне фибриногена, ДВС-синдроме. Тест может применяться для оценки эффективности и достаточности проводимой антикоагулянтной терапии по конечному результату – ликвидации тромбинемии. Для подтверждения или исключения наличия тромбов метод применяться не может.

Растворимый фибрин (РФ).

Иммунологические тест-системы для определения РФ выпускаются зарубежными производителями. Так как реакция основана на взаимодействии фибрин-мономеров с антителами к ним, тест реально определяет фибрин-мономеры, которые образуются только из фибриногена. Их уровень резко повышается при генерализации процессов свертывания, то есть при ДВС-синдроме. Во всех остальных ситуациях фибрин-мономеры либо полимеризуются, либо присоединяются к другим ПДФ и в свободном виде встречаются в крайне низких концентрациях. Поэтому данный метод подходит исключительно для диагностики и мониторинга ДВС-синдрома.

*Д-димеры***.**

Это специфические продукты деградации фибрина, входящего в состав тромба. Концентрация Д-димеров пропорциональна активности фибринолиза и количеству лизированного фибрина, то есть размеру тромба.

Для определения концентрации Д-димеров применяются иммунологические методы с использованием моноклональных антител. Производятся наборы реагентов для ИФА-диагностики, латексной агглютинации, иммунодиффузии, иммунотурбидиметрии.

Повышение уровня Д-димеров наблюдается при тромбозе глубоких вен, ТЭЛА, ДВС, тромбофилии, беременности (увеличение в 3-4 р.), лечении тромболитиками, обширных гематомах, а также при онкологических заболеваниях, инфекциях, воспалении, болезнях печени, в возрасте старше 80 лет, при наличии ревматоидного фактора, при заживлении ран.

Снижение уровня Д-димеров наблюдается при лечении антикоагулянтами прямого и непрямого действия.

Для Д-димеров наиболее характерна отрицательная диагностическая значимость (около 100%). Метод может использоваться для исключения диагноза тромбоза, так как отрицательный результат с высокой долей вероятности позволяет исключить этот диагноз.

Выявление эффектов волчаночного антикоагулянта (ВА).

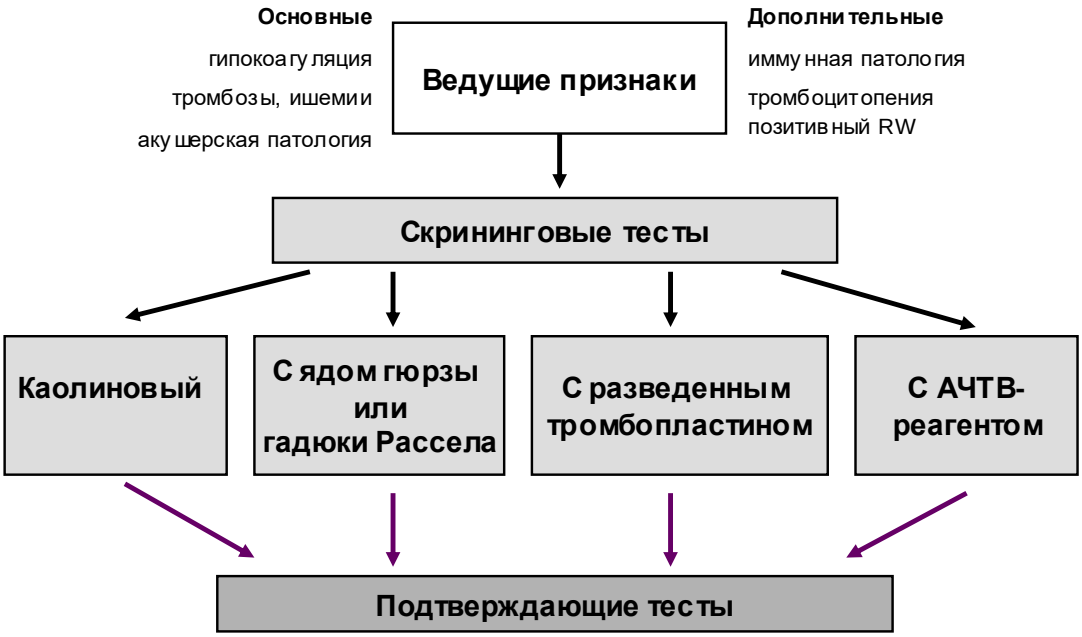
Волчаночные антикоагулянты (Lupus Anticoagulants, LA) – это иммуноглобулины классов А, М и G, действие которых направлено против фосфолипид-белковых комплексов. Так как фосфолипиды неотделимы от процессов свертывания, антитела к ним замедляют процессы свертывания плазмы во всех флосфолипид-зависимых тестах без снижения активности отдельных факторов. Понятие относительно виртуальное, так как ВА не выделены и не идентифицированы. Их присутствие оценивают по оказанному эффекту - удлинению времени свертывания БТП в фосфолипидзависимых тестах (АЧТВ, ПТ). ВА обнаруживаются при АФС, СКВ и других коллагенозах, вирусных инфекциях, лечении некоторыми фармакологическими препаратами. В основе появления ВА лежит аутоиммунная патология.

Анализ на ВА назначают при наличии клинической симптоматики (артериальные или венозные тромбозы, особенно в детском и молодом возрасте, относительная тромбоцитопения и др.). В настоящее время на ВА обследуют беременных женщин, так как почти половина спонтанных абортов на ранних сроках беременности связана с наличием АФС. Алгоритм выявления ВА представлен на рис. 8.

В условиях обычной КДЛ для выявления эффекта ВА, как правило, проводятся скриниговые тесты, которые выявляют эффекты ВА, то есть удлинение времени свертывания в фосфолипидзависимых тестах: каолиновом времени свертывания БТП, тесте с разведенным тромбопластином, тесте с ядом гюрзы или гадюки Рассела, тесте с использованием тромбопластина с высокой чувствительностью к ВА. Наиболее часто используются последние два теста.

Рис. 8. Алгоритм выявления волчаночного антикоагулянта

(З.С. Баркаган, А.П. Момот)



Для исследования на ВА используется корректно полученная бедная тромбоцитами плазма (БТП). Использование гепаринизированной и замороженной плазмы не допускается. Все тесты проводятся клоттинговым методом. Мануальное проведение тестов возможно, но точность анализов возрастает при работе на коагулометре. Оценка тестов основана на сравнении показателей коагуляции пациента и здорового донора, поэтому анализ плазмы больного проводится параллельно с анализом нормальной плазмы.

Основные скриниговые тесты.

Тесты с разведенным ядом гюрзы или гадюки Рассела. Коагулазы этих змей – фосфолипидзависимые активаторы фактора X. Удлинение времени свертывания плазмы пациента по сравнению с контрольной (донорской) плазмой может быть связано с ВА. Для теста рассчитывают так называемое нормализованное отношение (НО, NR), которое учитывает степень замедления свертывания плазмы. Расчет показателя и интерпретация результатов зависят от используемых реагентов и указаны в методике анализа

Тест с АЧТВ-реагентом, чувствительным к ВА. Чувствительность АЧТВ-реагентов к ВА зависит от входящих в состав набора фосфолипидов. Использование АЧТВ-реагентов, нечувствительных к ВА, практически не удлиняет время свертывания плазмы пациентов, имеющих ВА. Использование АЧТВ-реагентов, чувствительных к ВА, существенно удлиняет время свертывания плазмы пациентов при наличии ВА по сравнению с донорской плазмой. Расчет степени замедления свертывания плазмы и интерпретация полученных результатов зависят от используемых реагентов и указаны в методике анализа.

Удлинение времени свертывания БТП может быть связано не только с эффектом ВА, но также с дефицитом или патологическим ингибированием факторов. Поэтому рекомендуется проводить подтверждающие тесты, которые устанавливают, что гипокоагуляция в скриниговых тестах обусловлена наличием ВА. Для этого необходимо иметь пул донорской плазмы и раствор мембран разрушенных тромбоцитов или эритрофосфатида.

1. При дефиците факторов добавление 10% донорской плазмы укорачивает время АЧТВ, а добавление 50% объема донорской плазмы нормализует время.

2. При наличии ВА нормализация времени свертывания БТП наступает после добавления мембран разрушенных тромбоцитов или эритрофосфатида.
3. При патологическом ингибировании факторов наблюдается отсутствие коррекции гипокоагуляции в обоих случаях (при добавлении мембран и плазмы) (табл. 9). Ингибирование факторов в большинстве случаев связано с образованием антител класса IgG. Антитела обычно появляются при аутоиммунных заболеваниях, при лечении антибактериальными препаратами, после беременности, у пожилых и при проведении кровозамещающей терапии.

Табл.9.

Тесты, подтверждающие наличие ВА.

Патология	Тест на ВА	Коррекция тромбоцитами или эритрофосфатидом	Коррекция плазмой
Наличие ВА	+	+	-
Дефицит факторов	+	-	+
Ингибирование факторов	+	-	-

Наличие ВА не является синонимом антифосфолипидного синдрома или системной красной волчанки (СКВ). Для диагностики АФС необходимо измерить уровень антител к мембранным фосфолипидам и к гликопротеидам, связанным с фосфолипидами. Только при повышении содержания обеих групп антител, выявлении ВА и наличии клинической симптоматики возможна постановка диагноза АФС. СКВ диагностируется другими методами.

Лабораторная диагностика и мониторинг ДВС-синдрома.

Для подтверждения диагноза и объективной оценки эффективности проводимой терапии в лаборатории используются следующие группы тестов (табл. 10).

Таблица 10

Доступные лабораторные тесты при ДВС-синдроме

Тест	*Патология*
Подсчет тромбоцитов	Тромбоцитопения (< 150 000), не доходящая до критической
Концентрация фибриногена	Относительное или абсолютное снижение (< 1,5 г/л)
Уровень тромбинемии (РФМК) растворимый фибрин, Д-димер, этаноловый тест)	Повышение (ДВС развивается на фоне тромбинемии)
Уровень антикоагулянтов	Снижение
Фибринолитическая активность (эуглобулиновый фибринолиз)	Активация на фоне снижения плазмина
АЧТВ, ПВ, ТВ	Фазовые изменения (чаще удлинение)

1. Подсчет количества и оценка функции тромбоцитов, так как для синдрома характерна прогрессирующая, тромбоцитопения с повышением агрегации тромбоцитов. При подсчете тромбоцитов в гематологическом анализаторе необходимо просматривать гистограммы тромбоцитов и эритроцитов. Такая необходимость связана с появлением при ДВС-синдроме большого количества фрагментов эритроцитов.

2. Оценка уровня тромбинемии, выбор тестов для которой определяется возможностями лаборатории. Могут быть использованы тесты на растворимый фибрин (РФ), РФМК, фибринопептиды А, Д-димеры и другие. Следует отметить, что повышение РФ наблюдается только при ДВС-синдроме, в то время как уровень РФМК бывает повышенным при большом перечне патологии, а Д-димеры образуются при активации фибринолиза и расщеплении фибрина сгустка.
3. Оценка уровня антикоагулянтов: антитромбина и протеина С. При лечении пациента в фазе гиперкоагуляции наиболее актуально определение активности антитромбина до и в процессе лечения, так как гепарин без антитромбина не действует, а нарастание содержания АТ в процессе лечения свидетельствует о благоприятном течении заболевания.
4. Измерение концентрации фибриногена, содержание которого прогрессивно снижается. При низком уровне фибриногена его концентрацию лучше определять не клоттинговыми, а другими методами, включая метод по Рутберг.
5. Оценка фибринолитической активности (ФАК). ФАК следует определять методом эуглобулинового фибринолиза, так как тест на XIIa-зависимый фибринолиз с активацией контактной фазы будет малоинформативным из-за короткого времени растворения сгустка (4-12 мин) и невозможности отследить степень активации процесса.
6. Другие коагуляционные тесты (ПВ, АЧТВ, ТВ) могут иметь разнонаправленные значения в зависимости от фазы заболевания. Они используются для общей оценки коагуляции. При лечении гепарином время в тестах может быть удлинено за счет присутствия гепарина. Гепарин можно инактивировать протаминсульфатом, а тест на тромбиновое время заменить тестом на рептилазное время, которое не пролонгируется гепарином.

Суммарный средний индекс тромбогенности (ССИТ).

Суммарный средний индекс тромбогенности (тромбофилии) ССИТ – суммарный средний показатель, рассчитанный из величин любого числа показателей функционирования системы гемостаза по звеньям. Для расчета берутся средние величины нормы и величина, полученная у больного. Рассчитывается индекс каждого показателя (ИТj), приведенный к единице, так, чтобы величины ниже единицы указывали на гипокоагуляцию, а выше единицы – на гиперкоагуляцию. Для этого показатель средней нормы (N) делится на показатель больного (А), или наоборот. Все индексы суммируются и делятся на количество показателей в данном звене гемостаза (nj) – получается индекс тромбогенности по конкретному звену (ИТi). Затем суммируются индексы по звеньям, и сумма делится на количество исследованных звеньев(ni). В результате получают суммарный средний индекс тромбогенности.

$$ИТj = \frac{N}{A} \qquad ИТi = \frac{\sum ИТj}{nj} \qquad ССИТ = \frac{\sum ИТi}{ni}$$

ССИТ является интегральным показателем сбалансированности функционирования системы гемостаза.

Далее приводится пример расчета ССИТ коагулограммы пациента (таблица 11).

В таблице представлены 7 измеренных показателей, каждый из которых отражает отдельное звено гемостаза. На основе референтных значений были рассчитаны средние показатели по норме, например, для АЧТВ: (35+45):2=40 (сек). Далее следовало рассчитать индекс каждого показателя. Для этого необходимо определиться, в каком случае делить показатель пациента на среднее значение нормы, а в каком случае среднее значение нормы делить на показатель пациента. В соответствии с условиями расчета все параметры, которые указывают на гиперкоагуляцию, должны быть >1, а на гипокоагуляцию - <1. Направление сдвигов для соответствующего показателя коагулограммы (гипокоагуляция – гиперкоагуляция) указаны для каждого теста (см. описание тестов).

Таблица 11.

Пример коагулограммы для расчета ССИТ

Показатель	Значение пациента	Норма	Среднее нормы	Индекс показателя
АЧТВ (внутренний путь активации)	29 сек	35-45	40	1,38
Протромбин по Квику % (внешний путь активации)	98%	70-130	100	0,98

Тромбиновое время (конечный этап свертывания)	32 сек	28-32	30	0,94
Фибриноген	4,1 г/л	2-4	3	1,37
Антитромбин (антикоагулянт)	80%	75-125	100	1,25
XIIa-зависимый фибринолиз(оценка фибринолитической системы	14 мин	4-12	8	1,75
РФМК (уровень тромбинемии)	6 мг%	До 4 мг%		2

Сумма: 9,67

ССИТ 1,38

АЧТВ. При гиперкоагуляции время свертывания снижается, а при гипокоагуляции повышается. Следовательно, для того, чтобы получить при гиперкоагуляции значение > 1, надо среднее время нормы разделить на время свертывания плазмы пациента. 40:29=1,38

Протромбин по Квику. Чем выше коагуляция, тем больше процент протромбина. Поэтому для получения при гиперкоагуляции цифры > 1, необходимо процент протромбина пациента разделить на среднее значение нормы. 98:100=0,98

Тромбиновое время. При гиперкоагуляции время свертывания плазмы снижается, а при гипокоагуляции повышается. Следовательно, для того, чтобы получить при гиперкоагуляции значение > 1, надо среднее значение нормы разделить на время свертывания плазмы пациента: 30:32=0,94

Фибриноген. Чем больше концентрация фибриногена, тем выше коагуляция. Поэтому для получения при гиперкоагуляции цифры > 1 необходимо концентрацию фибриногена пациента разделить на среднее значение нормы: 4,1:3=1,37.

Антитромбин. При гиперкоагуляции процент активности антитромбина снижается, а при гипокоагуляции повышается. Следовательно, для того, чтобы получить при гиперкоагуляции значение > 1, надо среднее значение нормы разделить на процент активности антитромбина пациента: 100:80=1,25

Фибринолиз. При гиперкоагуляции время фибринолиза повышается, а при гипокоагуляции снижается. Следовательно, для того, чтобы получить при гиперкоагуляции значение > 1, надо время фибринолиза пациента разделить на среднее значение нормы: 14:8=1,75.

РФМК. Для РФМК значения в пределах нормы обозначаются как 1, а повышенные как 2.

В данном примере на каждое звено коагуляции приходится 1 тест, поэтому все индексы суммируются и делятся на число тестов (7): (1,38+0,98+0,94+1,37+1,25+1,75+2):7=1,32.

При сбалансированной системе гемостаза колебания ССИТ находятся в пределах 0,9-1,1.

Расчет ССИТ помогает в интерпретации результатов коагулограммы. В данном примере ССИТ 1,38 свидетельствует о нарушении баланса и преобладании у пациента процессов гиперкоагуляции. При оценке конкретных тестов становится понятно, что гиперкоагуляция связана с активацией внутреннего пути свертывания плазмы (индекс АЧТВ 1,38), относительным снижением содержания антитромбина и снижением активности фибринолиза (индекс ФАК 1,75). Рост РФМК обусловлен активацией гемостаза.

ССИТ исключительно полезен для интерпретации анализов коагулограммы, так как позволяет определить результирующую сдвигов в системе гемостаза. Наличие соответствующей компьютерной программы, которая позволяет рассчитывать ССИТ автоматически при введении результатов коагулологических исследований, значительно упрощает задачу. Расчет индекса без компьютерной программы при помощи калькулятора очень трудоемок и практически невыполним. Видимо, именно поэтому такой полезный показатель редко используется в практике КДЛ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В кратком учебном пособии невозможно подробно описать механизмы гемостаза и диагностику всех видов патологии свертывающей системы крови. Тем не менее, в работе кратко изложены механизмы гемокоагуляции, обозначены основные нарушения, связанные со свертывающей системой крови, а также указаны лекарственные препараты, которые наиболее широко используются для лечения патологии гемостаза.

В разделе методов исследования основное внимание уделялось тем тестам, которые могут быть определены в условиях обычной клинико-диагностической лаборатории. Для каждого теста указан принцип определения, а также основные причины снижения или повышения показателя. Для ряда тестов указаны заболевания и состояния, при которых исследование показателя имеет наибольшее диагностическое значение. Учебное пособие направлено, в первую очередь, на помощь в практической работе. Повысить квалификацию в области гемостаза поможет литература, указанная в библиографии.

I Перечень вопросов для проверки конечного уровня знаний:

1.Виды лабораторных тестов системы гемостаза.

2.Основные биохимические показатели системы гемостаза.

3.Коагулограмма, общая характеристика.

4.Основные этапы исследования гемостаза.

5. Методы исследования гемостаза.

6.Оценка функцтонального состояния птромбоцитов.

II Самостоятельная работа обучающихся:

Составить ментальную карту по теме: «Лабораторные тесты системы гемостаза».

III Список используемой литературы:

Обязательная:

1.Е.С. Северин «Биохимия», Москва 2004;

2.Е.С. Северин «Биохимия с упражнениями и задачами», Москва 2008;

Дополнительная:

1. Баркаган З.С. «Очерки антитромботической фармакопрофилактики и терапии». «Ньюдиамед», М., 2000.
2. Баркаган З.С., Момот А.П. «Диагностика и контролируемая терапия нарушений гемостаза». «Ньюдиамед», М., 2001.
3. Баркаган З.С., Момот А.П., Тараненко И.А. Шойхет Я.Н. «Основы пролонгированной профилактики и терапии тромэмболий антикоагулянтами непрямого действия». «Ньюдиамед», М., 2003.
4. Бернд Пётч, Катарина Мадленер, Елена Сушко. «Гемостазиология. Рациональная диагностика и терапия». «Здоровье», Киев, 2006.
5. Воробьев П.А. «Синдромы диссеминированного внутрисосудистого свертывания крови». «Ньюдиамед», М., 1996.
6. Грицюк А.И., Иванова Н.В., Шевчук М.И., Ивашковский А.И., Сопина Н.В. «Лабораторная диагностика гемостазиопатий», Киев, 1987г
   Киевский медицинский институт им.ак.А.А.Богомольца.

Методические рекомендации.

7. Долгов В.В., Свирин П.В. «Лабораторная диагностика нарушений гемостаза». ООО «Издательство Триада», 2005.
8. «Исследование гемостаза». Пособие для врачей-лаборантов. НПО «Ренам», 2004.
9. Момот А.П. «Патология гемостаза. Принципы и алгоритмы клинико-лабораторной диагностики». Форма Т, С-П, 2006.
10. «Полезные факты о коагуляции». Roche Diagnostics, Diagnostica Stago.
11. Пособие по изучению адгезивно-агрегационной функции тромбоцитов. НПО «Ренам», М., 1999.
12. Руководство по гематологии. Под редакцией академика А.И. Воробьева. Т 3. «Ньюдиамед», М., 2005.
13. Сидельникова В.М., Шмаков Р.Г. «Механизмы адаптации и дизадаптации гемостаза при беременности». «Триада Х», М., 2004.
14. Фред Дж. Шиффман. «Патофизиология крови». «Бином», М., 2001.

Тема: Роль железа в организме. Интестинальная абсорбция железа. Пулы железа в организме. Транспорт и депонирование железа. Регуляция обмена железа. Железо-дефицитные состояния. Гемохроматоз.

I Научно-методическое обоснование темы:

В гемсодержащих белках железо находится в составе гема. В негемовых железосодержащих белках железо непосредственно связывается с белком. К таким белкам относят трансферрин, ферритин, окислительные ферменты рибонук-леотидредуктазу и ксантиноксидазу, железофлавопротеины NADH-дегидрогеназа и сукцинат-дегидрогеназа.

В организме взрослого человека содержится 3 - 4 г железа, из которых только около 3,5 мг находится в плазме крови. Гемоглобин имеет примерно 68% железа всего организма, ферритин - 27%, миоглобин - 4%, трансферрин - 0,1%, на долю всех содержащих железо ферментов приходится всего 0,6% железа, имеющегося в организме. Источниками железа при биосинтезе железосодержащих белков служат железо пищи и железо, освобождающееся при постоянном распаде эритроцитов в клетках печени и селезёнки.

В нейтральной или щелочной среде железо находится в окисленном состоянии - Fe^{3+}, образуя крупные, легко агрегирующие комплексы с ОН-, другими анионами и водой. При низких значениях pH железо восстанавливается и легко диссоциирует. Процесс восстановления и окисления железа обеспечивает его перераспределение между макромолекулами в организме. Ионы железа обладают высоким сродством ко многим соединениям и образуют с ними хелатные комплексы, изменяя свойства и функции этих соединений, поэтому транспорт и депонирование железа в организме осуществляют особые белки. В клетках железо депонирует белок ферритин, в крови его транспортирует белок трансферрин.

Всасывание железа в кишечнике

В пище железо в основном находится в окисленном состоянии (Fe^{3+}) и входит в состав белков или солей органических кислот. Освобождению

железа из солей органических кислот способствует кислая среда желудочного сока. Наибольшее количество железа всасывается в двенадцатиперстной кишке. Аскорбиновая кислота, содержащаяся в пище, восстанавливает железо и улучшает его всасывание, так как в клетки слизистой оболочки кишечника поступает только Fe^{2+}. В суточном количестве пищи обычно содержится 15 - 20 мг железа, а всасывается только около 10% этого количества. Организм взрослого человека теряет около 1 мг железа в сутки.

Количество железа, которое всасывается в клетки слизистой оболочки кишечника, как правило, превышает потребности организма. Поступление железа из энтероцитов в кровь зависит от скорости синтеза в них белка апоферритина. **Апоферритин** "улавливает" железо в энтероцитах и превращается в **ферритин**, который остаётся в энтероцитах. Таким способом снижается поступление железа в капилляры крови из клеток кишечника. Когда потребность в железе невелика, скорость синтеза апоферритина повышается. Постоянное слущивание клеток слизистой оболочки в просвет кишечника освобождает организм от излишков железа. При недостатке железа в организме апоферритин в энтероцитах почти не синтезируется. железо, поступающее из энтероцитов в кровь, транспортирует белок плазмы крови трансферрин (рис. 1).

Транспорт железа в плазме крови и его поступление в клетки

В плазме крови железо транспортирует белок трансферрин. Трансферрин - гликопротеин, который синтезируется в печени и связывает только окисленное железо (Fe^{3+}). Поступающее в кровь железо окисляет фермент ферроксидаза, известный как медьсодержащий белок плазмы крови церулоплазмин. Одна молекула трансферрина может связать один или два иона Fe^{3+}, но одновременно с анионом CO_3^{2-} с образованием комплекса трансферрин-2 (Fe^{3+}-CO_3^{2-}). В норме трансферрин крови насыщен железом приблизительно на 33%.

Трансферрин взаимодействует со специфическими мембранными рецепторами клеток. В результате этого взаимодействия в цитозоле клетки образуется комплекс Ca^{2+}-кальмодулин-ПКС, который фосфорилирует рецептор трансферри-на и вызывает образование эндосомы. АТФ-зависимый протонный насос, находящийся в мембране эндосомы, создаёт кислую среду внутри эндосомы. В кислой среде эндосомы железо освобождается из трансферрина. После этого комплекс рецептор - апотрансферрин возвращается на поверхность плазматической мембраны клетки. При нейтральном значении pH внеклеточной жидкости апотрансферрин изменяет свою конформацию, отделяется от рецептора, выходит в плазму крови и становится способным вновь связывать ионы железа и включаться в новый цикл его транспорта в клетку. Железо в клетке используется для синтеза железосодержащих белков или депонируется в белке ферригине.

Рис. 1. Поступление экзогенного железа в ткани. В полости кишечника железо освобождается из белков и солей органических кислот пищи. Усвоению железа способствует аскорбиновая кислота, восстанавливающая железо. В клетках слизистой оболочки кишечника избыток поступившего железа соединяется с белком апоферритином с образованием ферритина, при этом ферритин окисляет Fe^{2+} в Fe^{3+}. Поступление железа из клеток слизистой оболочки кишечника в кровь сопровождается окислением железа ферментом сыворотки крови ферроксидазой. В крови Fe^{3+} транспортирует белок сыворотки крови трансферрин. В тканях Fe^{2+} используется для синтеза железосодержащих белков или депонируется в ферритине.

Ферритин - олигомерный белок с молекулярной массой 500 кД. Он состоит из тяжёлых (21 кД) и лёгких (19 кД) полипептидных цепей, составляющих 24 протомера. Разный набор прогомеров в олигомере ферритина определяет образование нескольких изоформ этого белка в разных тканях. Ферритин представляет собой полую сферу, внутри которой может содержаться цо 4500 ионов трёхвалентного железа, но обычно содержится менее 3000. Тяжёлые цепи ферритина окисляют Fe^{2+} в Fe^{3+}, Железо в виде гидроксидфосфата находится в центре сферы, оболочка которой образована белковой частью молекулы. Оно поступает внутрь и освобождается наружу через каналы, пронизывающие белковую оболочку апоферритина, но железо может откладываться и в белковой части молекулы ферритина. Ферритин содержится почти во всех тканях, но в наибольшем количестве в печени, селезёнке и костном мозге. Незначительная часть ферритина экскретируется из тканей з плазму крови. Поскольку поступление ферэитина в кровь пропорционально его содержанию в тканях, то концентрация ферритина в крови - важный диагностический показатель запасов железа в организме при железодефидитной анемии. Метаболизм железа в организме представлен на рис. 2.

Регуляция поступления железа в клетки

Содержание железа в клетках определяется соотношением скоростей его поступления, использования и депонирования и контролируется двумя молекулярными механизмами. Скорость поступления железа в неэритроидные слетки зависит от количества белков-рецепторов трансферрина в их мембране. Избыток железа в клетках депонирует ферритин. Синтез шоферритина и рецепторов трансферрина регулируется а уровне трансляции этих белков и зависит от содержания железа в клетке.

На нетранслируемом 3'-конце мРНК рецептора трансферрина и на нетранслируемом 5'-конце мРНК апоферритина имеются шпилечные петли - железочувствительные элементы IRE (рис. 3 и 4). Причём мРНК рецептора трансферрина имеет 5 петель, а мРНК апоферритина - только 1.

Эти участки мРНК могут взаимодействовать с регуляторным IRE-связывающим белком. При низких концентрациях железа в клетке IRE-связывающий белок соединяется с IRE мРНК апоферритина и препятствует присоединению белковых факторов инициации трансляции (рис. 3, А). В результате этого снижаются скорость трансляции апоферритина и его содержание в клетке. Вместе с тем при низких концентрациях железа в клетке IRE-связывающий белок связывается с железочувствительным элементом мРНК рецептора трансферрина и предотвращает её разрушение ферментом РНК-азой (рис. 4, А). Это вызывает увеличение количества рецепторов трансферрина и ускорение поступления железа в клетки.

При повышении содержания железа в клетке в результате его взаимодействия с IRE-связывающим белком происходит окисление SH-групп активного центра этого белка и снижение сродства к железочувствительным элементам мРНК. Это приводит к двум последствиям:

- во-первых, ускоряется трансляция апоферритина (рис. 3, Б);
- во-вторых, IRE-связывающий белок освобождает шпилечные петли мРНК рецептора трансферрина, и она разрушается ферментом РНК-азой, в результате снижается скорость синтеза рецепторов трансферрина (рис. 4, Б). Ускорение синтеза апоферритина и торможение синтеза рецепторов трансферрина вызывают снижение содержания железа в клетке.

В целом эти механизмы регулируют содержание Fe в клетках и его использование для синтеза железосодержащих белков.

Нарушения метаболизма железа

Железодефицитная анемия может наблюдаться при повторяющихся кровотечениях, беременности, частых родах, язвах и опухолях ЖКТ, после операций на ЖКТ. При железодефицитной анемии уменьшается размер эритроцитов и их пигментация (гипохромные эритроциты малых размеров). В эритроцитах уменьшается содержание гемоглобина, понижается насыщение железом трансферрина, а в тканях и плазме крови снижается концентрация ферритина. Причина этих изменений - недостаток железа в организме, вследствие чего снижается синтез гема и ферритина в неэритроидных тканях и Hb в эритроидных клетках.

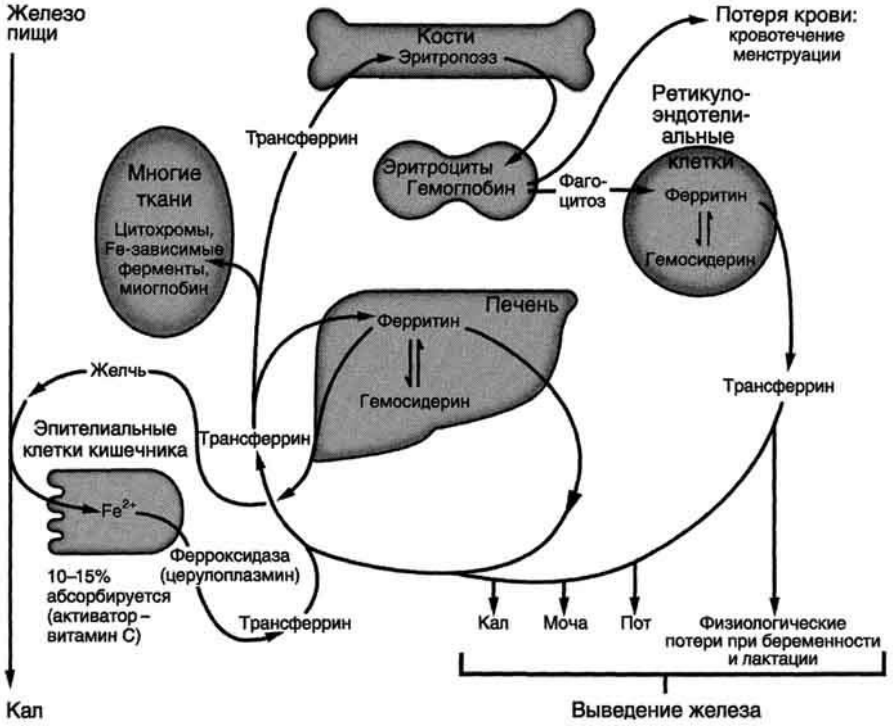


Рис. 2. Метаболизм железа в организме.

Гемохроматоз. Когда количество Fe в клетках превышает объём ферритинового депо, железо откладывается в белковой части молекулы ферритина. В результате образования таких аморфных отложений избыточного Fe ферритии превращается в гемосидерин. **Гемосидерин** плохо растворим в воде и содержит до 37% железа Накопление гранул гемосидерина в печени, поджелудочной железе, селезёнке и печени приводит к повреждению этих органов - гемохроматозу. Гемохроматоз может быть обусловлен наследственным увеличением всасывания Fe в кишечнике, при этом содержание Fe в организме больных может достигать 100 г. Это заболевание наследуется по аутосомнорецессивному типу, причём около 0,5% европеоидов гомозиготны по гену гемохроматоза. Накопление гемосидерина в поджелудочной железе приводит к разрушению р-клеток островков Лангерганса и, как следствие этого, к сахарному диабету. Отложение гемосидерина в гепатоцитах вызывает цирроз печени, а в миокардиоцитах - сердечную недостаточность. Больных наследственным гемохроматозом лечат регулярными кровопусканиями, еженедельно или один раз в месяц в зависимости от тяжести состояния больного.

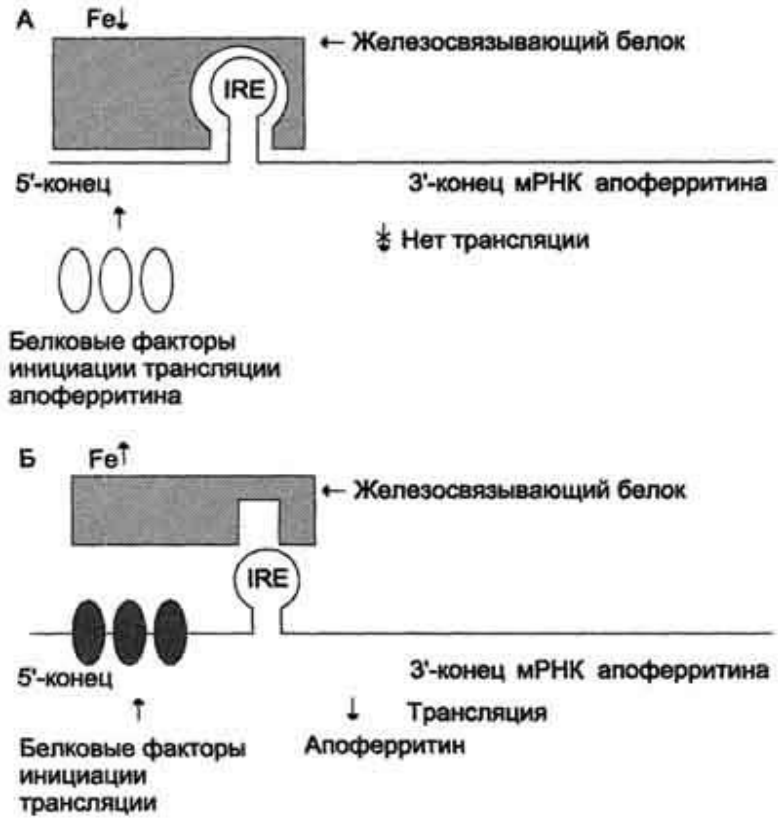


Рис. 3. Регуляция синтеза апоферритина. А - при снижении содержания железа в клетке железосвязывающий белок обладает высоким сродством к IRE и взаимодействует с ним. Это препятствует присоединению белковых факторов инициации трансляции к мРНК, кодирующей апоферритин, и синтез апоферритина прекращается; Б - при повышении содержания железа в клетке оно взаимодействует с железосвязывающим белком, в результате чего снижается сродство этого белка к IRE. Белковые факторы инициации трансляции присоединяются к мРНК, кодирующей апоферритин, и инициируют трансляцию апоферритина.

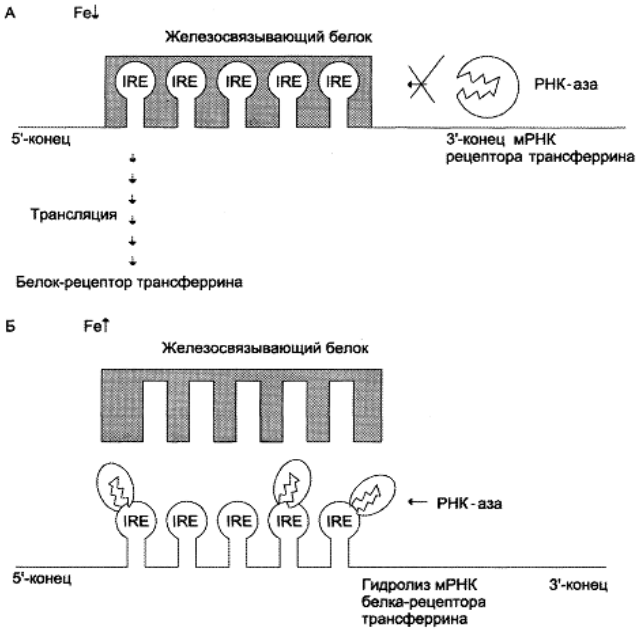


Рис. 4 Регуляция синтеза рецептора трансферрина. А – при низком содержании в клетке железодефицитный белок обладает высоким сродством к IRE мРНК, кодирующей белок рецептор трансферрина. Присоединение железосвязывающего белка к IRE мРНК предотвращает ее разрушение и РНК-азой и синтез белка-рецептора трансферрина продолжается;

Б – при высоком содержании железа в клетке сродство железосвязывающего белка к IRE снижается, и мРНК становится доступной для действия РНК-азы, которая ее гидролизует. Разрушение мРНК ведет к снижению синтеза белка-рецептора трансферрина.

К гемохроматозу могут привести частые переливания крови, в этих случаях больных лечат препаратами, связывающими железо.

II Цель деятельности обучающихся на занятии

Обучающийся должен знать:

16. Железо, его роль в организме;
17. В каких процессах участвует железо;
18. Как осуществляется всасывание железа в кишечнике;
19. Ферритин – депо железа в организме;
20. **Регуляция синтеза апоферритина;**
21. Трансферрин – транспортная форма железа;
22. **Регуляция синтеза рецептора трансферрина;**
23. Роль церулоплазмина в обмене железа;
24. Как осуществляется транспорт железа в плазме крови и его поступление в клетки;
25. Как регулируется процесс поступления железа в клетки;

26. Нарушения метаболизма железа (железодефицитная анемия и гемохроматоз, причины развития);
27. Гемосидерин, характеристика.

Обучающийся должен уметь:

1. Механизм поступления железа в организм и его распределение;
2. В виде схемы показать регуляцию синтеза апоферритина и рецептора трансферрина;

IIIСодержание обучения:

Основные вопросы:

1. Железо, биологическая роль;
2. Содержание железо в организме;
3. Распределение железа в организме;
4. Как осуществляется всасывание железа в кишечнике;
5. Ферритин – депо железа в организме;
6. Трансферрин – транспортная форма железа;
7. Роль церулоплазмина в обмене железа;
8. Как осуществляется транспорт железа в плазме крови и его поступление в клетки;
9. Как регулируется процесс поступления железа в клетки;
10. Гемосидерин, характеристика.

IV Перечень лабораторных работ, наглядных пособий и средств ТСО.

Наглядные пособия: Рисунки: 1. Поступление экзогенного железа в ткани., 2. Метаболизм железа в организме, 3. Регуляция синтеза апоферритина., 4 Регуляция синтеза рецептора трансферрина.

VI Перечень вопросов для проверки исходного уровня знаний:

1. Железо, биологическая роль;
2. Содержание железо в организме;
3. Распределение железа в организме;
4. Как осуществляется всасывание железа в кишечнике;
5. Ферритин – депо железа в организме;
6. Трансферрин – транспортная форма железа;
7. Роль церулоплазмина в обмене железа;
8. Как осуществляется транспорт железа в плазме крови и его поступление в клетки;
9. Как регулируется процесс поступления железа в клетки;
10. Гемосидерин, характеристика.

VII Перечень вопросов для проверки конечного уровня знаний:

1. Железо, его роль в организме;
2. Содержание железо в организме;
3. Распределение железа в организме;
4. В каких процессах участвует железо;
5. Как осуществляется всасывание железа в кишечнике;
6. Ферритин – депо железа в организме;
7. **Регуляция синтеза апоферритина;**
8. Трансферрин – транспортная форма железа;
9. **Регуляция синтеза рецептора трансферрина;**
10. Роль церулоплазмина в обмене железа;
11. Как осуществляется транспорт железа в плазме крови и его поступление в клетки;
12. Как регулируется процесс поступления железа в клетки;
13. Нарушения метаболизма железа (железодефицитная анемия и гемохроматоз, причины развития);
14. Гемосидерин, характеристика;
15. Механизм поступления железа в организм и его распределение;
16. В виде схемы показать регуляцию синтеза апоферритина и рецептора трансферрина;

IX Самостоятельная работа обучающихся:

Составить ситуационную задачу по теме: «Роль железа в организме».

Вопросы для самостоятельного обучения: составление тестов, задач и кроссвордов по данной теме.

X Список используемой литературы:

Обязательная:

1. Е.С. Северин «Биохимия», Москва 2003.
2. Е.С. Северин «Биохимия с упражнениями и задачами», Москва 2008, С. 645

Дополнительная:

1. Конспект лекций;
2. Интернет-источник.

Тема: Миогенная дифференцировка МСК. Транскрипционные факторы. Типы мышечных волокон, метаболические особенности различных типов волокон. Белки мышечной ткани.

I Научно-методическое обоснование темы:

Мышечная ткань взрослого человека составляет 40–42% (у пожилых людей – 30%, у детей – 35%) от массы тела. Основная динамическая функция мышц – обеспечить подвижность путем сокращения и последующего расслабления. При сокращении мышц осуществляется работа, связанная с превращением химической энергии в механическую.

К мышечной ткани относятся (типы):

▪ скелетная мускулатура (поперечно-полосатые относятся мышцы языка и верхней трети пищевода, внешние мышцы глазного яблока и некоторые другие);

▪ сердечная мышца;

▪ гладкая мускулатура.

Отличаются они друг от друга морфологически, биохимически, функционально, а также в зависимости от путей развития.

Морфологически миокард относится к поперечно-полосатой мускулатуре, но по ряду других признаков он занимает промежуточное положение.

МОРФОЛОГИЧЕСКАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ ПОПЕРЕЧНО-ПОЛОСАТОЙ МЫШЦЫ

Поперечно-полосатая мышца состоит из многочисленных удлиненных волокон, миобластов (многоядерных клеток гигантских размеров), покрытых эластичной оболочкой - сарколеммой (рис. 1). Двигательные нервы входят в различных точках в мышечное волокно и передают ему электрический импульс, вызывающий сокращение. Диаметр функционально зрелого поперечно-полосатого мышечного волокна обычно составляет от 10 до 100 мкм, а длина волокна часто соответствует длине мышцы.

Миобласты состоят из миофибрилл, функциональной единицей которых является саркомер. Миофибриллы расположены по длине волокна в полужидкой саркоплазме (толщиной менее 1 мкм), обладающих поперечной исчерченностью (зависящая от оптической неоднородности белковых веществ).
Выделяют белые и красные (с высоким содержанием миофибрилл и миоглобина, обеспечивают более быстрые мышечные сокращения, тонического характера) мышечные волокна.

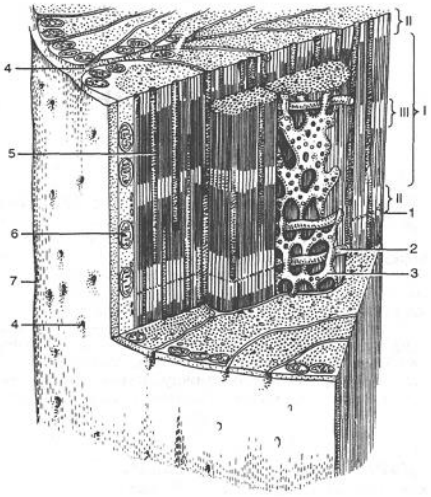


Рис. 1. Структура волокна скелетной мышцы (по Гассельбаху).
I - А-диск; II - I-диск; III - Н-зона; 1 - Z-линия; 2 - Т-система; 3 - саркоплазматическая сеть; 4 - устье Т-системы; 5 - гликоген; 6 - митохондрия; 7 - сарколемма

В саркоплазме мышечных волокон обнаруживается и ряд других структур: митохондрии, микросомы, рибосомы, трубочки и цистерны саркоплазматической сети, различные вакуоли, глыбки гликогена и включения липидов, играющие роль запасных энергетических материалов, и т.д. (рис. 1).

При рассмотрении миофибриллы под электронным микроскопом видны два типа вытянутых нитей: темные и светлые полосы или диски (А и I диски).

Один тип — это толстая нить, соответствующая А диску **(анизотропный диск**). Центральная зона А диска (Н зона) при этом кажется менее оптически плотной, чем остальная его часть. В центре диска А расположена **линия М**, которую можно наблюдать только в электронном микроскопе.

Второй тип — тонкая нить, расположена в I диске и проходит в А диск, не достигая Н зоны. **Диск I (**изотропный диск**)**, с очень слабым двойным лучепреломлением. В фазово-контрастном микроскопе они кажутся более светлыми, чем диски А. Длина дисков I около **1 мкм**. Каждый из них разделен на две равные половины Z-мембраной, или Z-линией.

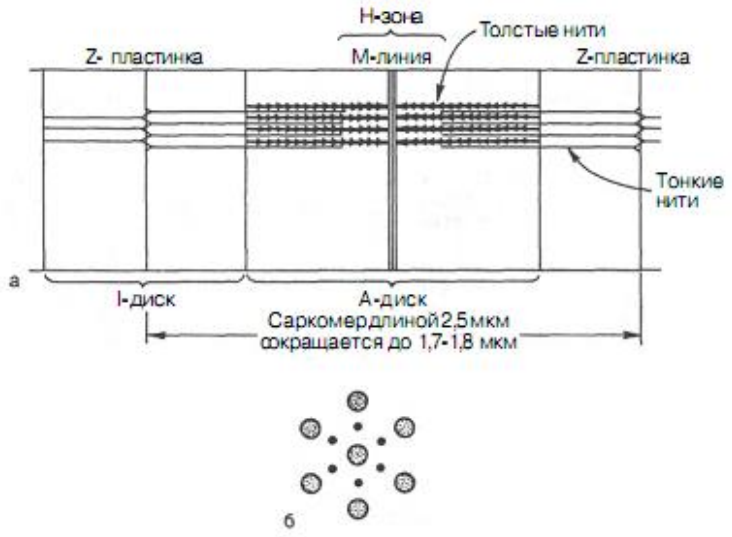
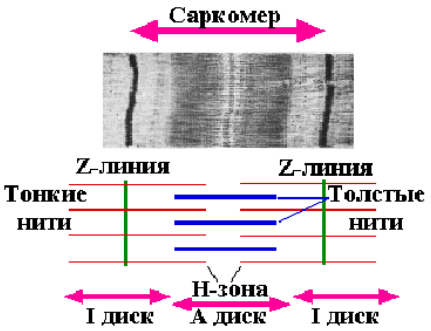


Рис. 2. Строение саркомера скелетной мышцы.

а - схематическое изображение структуры саркомера; б - расположение толстых и тонких нитей (поперечное сечение).



Толстые нити состоят из белка **миозина**, и тонкие - как правило, из второго компонента актомиозиновой системы – белка **актина**. Тонкие (актиновые) нити начинаются в пределах каждого саркомера у Z-линии, тянутся через диск I, проникают в диск А и прерываются в области зоны Н (рис. 2).

Согласно модели, предложенной Э. Хаксли и Р. Нидергерке, а также Х. Хаксли и Дж. Хенсон, при сокращении миофибрилл одна система нитей проникает в другую, т.е. нити начинают, как бы скользить друг по другу, что и является причиной мышечного сокращения.

ХИМИЧЕСКИЙ СОСТАВ ПОПЕРЕЧНО-ПОЛОСАТОЙ МЫШЦЫ

В мышечной ткани взрослых животных и человека содержится от 72 до 80% воды. Около 20–28% от массы мышцы приходится на долю сухого остатка, главным образом белков. Помимо белков, в состав сухого остатка входят гликоген и другие углеводы, различные липиды и др.

Таблица 1. Химический состав поперечно-полосатой мышц млекопитающих

Компонент	В процентах от сырой массы	Компонент	В процентах от сырой массы
Вода	72-80	креатинин	0,003-0,005
Плотные вещества	20-28	АТФ	0,25-0,40
В том числе:		карнозин	0,2-0,3
белки	16,5-20,9	карнитин	0,02-0,05
гликоген	0,3-3,0	ансерин	0,09-0,15
фосфоглицериды	0,4-1,0	свободные аминокислоты	0,1-0,7
холестерин	0,06-0,2	молочная кислота	0,01-0,02
креатин + креатин-фосфат	0,2-0,55	зола	1,0-1,5

Данилевский впервые разделил экстрагируемые из мышц белки на 3 класса: растворимые в воде, экстрагируемые 8–12 % раствором хлорида аммония и белки, извлекаемые разбавленными растворами кислот и щелочей.

Около 25 % массы мышц составляют белки. **В настоящее время их делят на три основные группы:** ▪ миофибриллярные (сократительные) белки (35% от общего количества мышечного белка); ▪ белки саркоплазмы (45%);▪ белки стромы (20%). Эти группы белков резко отличаются друг от друга по растворимости в воде и солевых средах с различной ионной силой.

МИОФИБРИЛЛЯРНЫЕ (СОКРАТИТЕЛЬНЫЕ) БЕЛКИ

К группе миофибриллярных белков относятся миозин, актин и актомиозин – белки, растворимые в солевых средах с высокой ионной силой, и так называемые регуляторные белки: тропомиозин, тропонин, α- и β-актинин, образующие в мышце с актомиозином единый комплекс. Перечисленные миофибриллярные белки тесно связаны с сократительной функцией мышц.

1. **Миозин** (рис. 3) основа толстых нитей, составляет 50–55% от сухой массы миофибрилл. Молекулярная масса ≈ 500 кДа. Представление о миозине как о главном белке миофибрилл сложилось в результате работ **А.Я. Данилевского, О. Фюрта, Э. Вебера** и ряда других исследователей. Однако всеобщее внимание к миозину было привлечено лишь после опубликования работ **В.А. Энгельгардта и М.Н. Любимовой (1939–1942**). В этих работах впервые было показано, что миозин обладает АТФ-азной активностью, т.е. способностью катализировать расщепление АТФ на АДФ и H_3PO_4. Химическая энергия АТФ, освобождающаяся в ходе данной ферментативной реакции, превращается в механическую энергию сокращающейся мышцы. Молекула миозина имеет вытянутую часть, состоящую из двух спиралей, накрученных одна на другую. Каждая спираль имеет на одном конце глобулярную головку и называется тяжёлой цепью. Возле головок спиралей располагается по 2 лёгких цепи. При обработке ферментами молекула миозина распадается на 2 больших фрагмента: **тяжёлый меромиозин** (обе головки и часть двойной спирали) и **лёгкий меромиозин** (остальная часть двойной спирали).

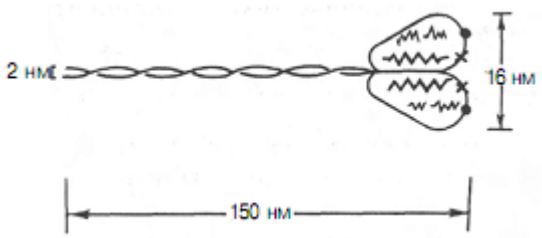


Рис. 3. Строение молекулы миозина.
Объяснение в тексте.

Тяжелые цепи образуют длинную закрученную α-спираль («хвост» молекулы), конец каждой тяжелой цепи совместно с легкими цепями создает глобулу («головка» молекулы), способную соединяться с **актином**. Легкие цепи, находящиеся в «головке» миозиновой молекулы, принимают участие в проявлении АТФ-азной активности миозина, гетерогенны по своему составу. Количество легких цепей в молекуле миозина у различных видов животных и в разных типах мышц неодинаково.

Толстые нити (толстые миофиламенты) в саркомере образование, полученное путем соединения большого числа определенным образом ориентированных в пространстве молекул миозина (рис.4).

Рис. 4. Строение толстого миозинового филамента.
Функции миозина:
▪ структурная — около 400 молекул миозина соединяются между собой «хвост» в «хвост» и образуют толстую нить;
▪ каталитическая — головка миозина способна расщеплять АТФ;
▪ контактная — соединяется с актином своими головками, которые в таком случае называются «поперечные мостики».
2. Актин - белок тонких нитей, составляющий 20% от сухой массы миофибрилл, был открыт **Ф. Штраубом в 1942 г**. Молекулярная масса — 42 кДа. Известны две формы актина: **глобулярный актин** (**G-актин**, globular) и **фибриллярный актин** (**F-актин**) в виде двойной спирали. Молекула G-актина состоит из одной полипептидной цепочки (глобула), в образовании которой принимают участие 374 АМК остатка. При повышении ионной силы до физиологического уровня G-актин полимеризуется в F-актин (фибриллярная форма). На электронных микрофотографиях волокна F-актина выглядят как две нити бус, закрученных одна вокруг другой (рис. 5).

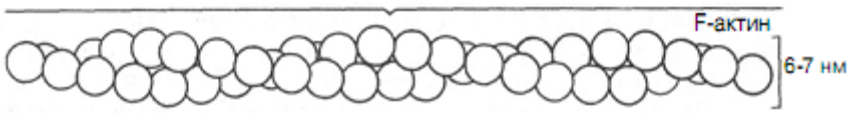


Рис. 5. Схематическое изображение F-актина

Актомиозин образуется при соединении миозина с F-актином. Актомиозин, как естественный, так и искусственный, т.е. полученный путем соединения in vitro высокоочищенных препаратов миозина и F-актина, обладает АТФ-азной активностью, которая отличается от таковой миозина, она значительно возрастает в присутствии стехиометрических количеств F-актина. **Фермент актомиозин** активируется ионами **Mg** $^{2+}$ и ингибируется этилендиаминтетраацетатом (**ЭДТА**) и высокой концентрацией **АТФ**, тогда как миозиновая АТФ-аза ингибируется ионами Mg^{2+}, активируется ЭДТА и не ингибируется высокой концентрацией АТФ. Оптимальные значения pH для обоих ферментов также различны.

3. Тропомиозин (открыт **К. Бейли в 1946 г**.) - белок тонких нитей. Молекулярная масса—65 кДа. Состоит из двух α-спиралей в форме палочки. Располагается в бороздках, идущих вдоль обеих сторон актина. Каждая его молекула лежит на 7 молекулах актина. На долю тропомиозина приходится около 4–7% всех белков миофибрилл.

4. Тропонин – глобулярный белок тонких нитей, открытый **С. Эбаси в 1963 г**.; его мол.масса 80кДа. Состоит из 3 субъединиц: С-кальцийсвязывающий, обеспечивает связь с тропомиозином (Тн-С); I-ингибиторная (Тн-I), которая блокирует преждевременное соединение головок миозина с актином, может ингибировать АТФ-азную активность; Т-для связывания с тропомиозином (Тн-Т).

В скелетных мышцах взрослых животных и человека тропонин (Тн) составляет лишь около 2% от всех миофибриллярных белков

Тропонин, соединяясь с тропомиозином, образует комплекс, названный **нативным тропомиозином**. Этот комплекс прикрепляется к актиновым филаментам и придает актомиозину скелетных мышц позвоночных чувствительность к ионам Ca^{2+} (рис. 6).

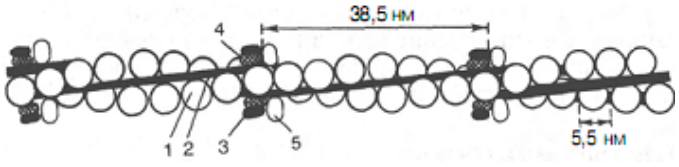


Рис. 6. Структура тонкого филамента. 1 - актин; 2 - тропомиозин; 3 - тропонин С;

4 - тропонин I; 5 - тропонин Т.

Установлено, что тропонин (его субъединицы Тн-Т и Тн-I) способен фосфорилироваться при участии цАМФ-зависимых протеинкиназ. Вопрос о том, имеет ли отношение фосфорилирование тропонина in vitro к регуляции мышечного сокращения, остается пока открытым.

5. α-актинин. Входит в Z-линию и фиксирует там тонкие нити. **6. β-актинин.** Регулирует длину тонких нитей.**7. М-белок.** Входит в М-линию и фиксирует там толстые нити. **8. С-белок.** Регулирует длину толстых нитей. **9. Десмин.** Содержится между Z-линиями соседних миофибрилл, обеспечивая совпадение границ всех их саркомеров.

Белки саркоплазмы - протеины, растворимые в солевых средах с низкой ионной силой. **Глобулин Х** представляет собой смесь различных белковых веществ со свойствами глобулинов. В состав белков группы **миогена** входит ряд протеинов, наделенных ферментативной активностью: например, ферменты гликолиза. **Дыхательный пигмент миоглобин** и разнообразные белки-ферменты, локализованные главным образом в митохондриях и катализирующие процессы тканевого дыхания, окислительного фосфорилирования, а также многие стороны азотистого и липидного обмена. **Парвальбумины** (кальмодулин и кальсеквестрин и др.), которые способны связывать ионы Ca^{2+}.

Таким образом, к белкам саркоплазмы можно отнести: миоглобин, ферменты гликолиза, кальмодулин и кальсеквестрин, способные обратимо связываться с ионами Ca^{2+}.

Белки стромы. Это коллаген и эластин. Известно, что строма скелетных мышц, остающаяся после исчерпывающей экстракции мышечной кашицы солевыми растворами с высокой ионной силой, состоит в значительной мере из соединительнотканных элементов стенок сосудов и нервов, а также сарколеммы и некоторых других структур.

Небелковые азотистые экстрактивные вещества

В скелетных мышцах содержится ряд важных азотистых экстрактивных веществ: адениновые нуклеотиды (АТФ, АДФ и АМФ), нуклеотиды неаденинового ряда, креатинфосфат, креатин, креатинин, карнозин, ансерин, свободные аминокислоты и др.

1.**Креатина и креатинфосфат** – составляют до 60% небелкового азота мышц. Они участвуют в химических процессах, связанных с мышечным сокращением.

Синтез креатина происходит в печени, откуда с током крови он заносится в мышечную ткань где, фосфорилируясь, превращается в креатинфосфат. В синтезе креатина участвуют три аминокислоты: аргинин, глицин и метионин.

Карнозин (открыт В.С. Гулевичем в 1900 г.) **и ансерин** (метилированное производное карнозина ансерин) – специфические азотистые имидазолсодержащие дипептиды скелетной мускулатуры позвоночных. Они увеличивают амплитуду мышечного сокращения, предварительно сниженную утомлением. Работами акад. С.Е. Северина показано, что они не влияют непосредственно на сократительный аппарат, но увеличивают эффективность работы ионных насосов мышечной клетки.

Свободные аминокислоты мышц: глутаминовая кислота (до 1,2 г/кг), глутамин (0,8–1,0 г/кг).

А также в состав мембран мышечной ткани входят: ряд фосфоглицеридов: фосфатидилхолин, фосфатидилэтаноламин, фосфатидилсерин; фосфоглицериды принимаютучастие в обменных процессах; мочевина, мочевая кислота, аденин, гуанин, ксантин и гипоксантин – встречаются в небольшом количестве и являются либо промежуточными, либо конечными продуктами азотистого обмена.

Безазотистые вещества: 1.**Гликоген** - концентрация колеблется от 0,3 до 2% и выше. На долю других представителей углеводов приходятся десятые и сотые доли процента. 2. Следы свободной глюкозы; 3.очень мало гексозофосфатов; 4. триглицериды; 5. холестерин; 6.карбоновые кислоты (лактат, ПВК и др., образуются в процессе метаболизма глюкозы).

Состав неорганических солей в мышцах разнообразен. Из катионов больше всего **калия (**внутри миобластов**) и натрия (**в межклеточном веществе). Значительно меньше в мышцах магния, кальция и железа; микроэлементов: кобальт, алюминий, никель, бор, цинк и др.

ХИМИЧЕСКОГО СОСТАВА СЕРДЕЧНОЙ МЫШЦЫ И ГЛАДКОЙ МУСКУЛАТУРЫ

Сердечная мышца по содержанию ряда химических соединений занимает промежуточное положение между скелетной мускулатурой и гладкими мышцами.

ПОКАЗАТЕЛЬ	**СКЕЛЕТНЫЕ МЫШЦЫ**	**ГЛАДКАЯ МУСКУЛАТУРА**
БЕЛКОВЫЙ АЗОТ	БОЛЬШЕ (30–31 МГ/Г)	МЕНЬШЕ (20,3 МГ/Г)
МИОФИБРИЛЛЯРНЫЕ БЕЛКИ	БОЛЬШЕ	МЕНЬШЕ
БЕЛКИ СТРОМЫ	МЕНЬШЕ	ВЫШЕ (И МИОКАРДЕ)
МИОАЛЬБУМИН	МЕНЬШЕ	БОЛЬШЕ (И В МИОКАРДЕ)
АТФ НА 1 Г ТКАНИ, МАКРОЭРГОВ	бОЛЬШЕ НА 4,43 МКМОЛЬ	МЕНЬШЕ 1,38МКМОЛЬ (2,6 МКМОЛЬ, В МИОКАРДЕ)
АНСЕРИН И КАРНОЗИН	БОЛЬШЕ	СЛЕДЫ (В МИОКАРДЕ И ГЛАДКОЙ МУСКУЛАТУРЕ)
ФОСФОГЛИЦЕРИДЫ	МЕНЬШЕ	БОЛЬШЕ (В МИОКАРДЕ)
ФОФСОШЛИПИДЫ	БОЛЬШЕ	МЕНЬШЕ

Особенности гладких мышц: 1.в сократительном аппарате содержат **кальдесмон**, выполняющий функцию тропонина; **2.** их миозиновая АТФ-азная активность в 10 раз ниже; **3.**их миозин может соединяться с актином только при условии фосфорилирования лёгких цепей;

Гладкие мышцы — медленные, но способны длительно поддерживать напряжение. Кроме того, они похожи на сердечную мышцу тем, что сокращаются непроизвольно.

Известно, что **миозин, тропомиозин и тропонин** сердечной мышцы и гладкой мускулатуры заметно отличаются по своим физико-химическим свойствам от соответствующих белков скелетной мускулатуры.

ИЗМЕНЕНИЕ ХИМИЧЕСКОГО СОСТАВА МЫШЕЧНОЙ ТКАНИ В ОНТОГЕНЕЗЕ

Показатели	**Мышцы эмбрионов**	**Мышцы взрослого живот-го**
вода	Больше	Меньше
Общий белка	Меньше	Больше
миозин и актомиозин	Ниже	Выше
белки стромы, миоальбумин, глобулины	Выше	Ниже
нуклеопротеины, РНК и ДНК	Более высокое	Низкое
АТФ и КФ	Меньше	Больше

Ансерин и карнозин появляются в мышечной ткани в строго определенный период онтогенеза. Время их появления тесно связано с мышечной функцией и совпадает с формированием рефлекторной дуги, обеспечивающей возможность двигательного рефлекса, появлением Ca^{2+}-чувствительности актомиозина и началом работы ионных насосов.

В ходе онтогенеза изменяется изоферментный спектр ЛДГ.

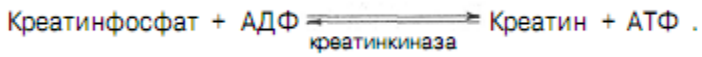
экстракты из скелетных мышц	фермент
3–5-месячного эмбриона	ЛДГ3 и ЛДГ2 приходится соответственно 40 и 31%
у взрослых особей	ЛДГ5 и ЛДГ4 активнее
В процессе развития плода	повышается активность изофермента I гексокиназы и снижается активность изофермента II

ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ БИОХИМИЯ МЫШЦ

При сокращении мышц происходит переход химической энергии в механическую. Это осуществляется за счет энергии, освобождающейся при гидролизе АТФ с образованием АДФ и неорганического фосфата. В поперечно-полосатой мышце сокращение зависит от концентрации ионов Ca^{2+}, регулируемой саркоплазматическим ретикулумом (СПР) – специализированной системой мембран, накапливающей Ca^{2+} в состоянии покоя и высвобождающей его при воздействии на мышечное волокно нервного импульса.

Пути ресинтеза АТФ:

1. **Креатинкиназный путь** Трансфосфорилированием АДФ с креатинфосфатом. Данная реакция катализируется ферментом **креатинкиназой.**



Данный путь чрезвычайно быстрым и максимально эффективным (за счет каждой молекулы КФ образуется молекула АТФ). Применив специфический ингибитор креатинкиназы (**1-фтор-2,4-динитро-фенол**), а также с помощью агентов, препятствующих окислительному фосфорилированию АДФ в АТФ, Т. Кейн и соавт. (1962) смогли продемонстрировать прямой распад АТФ с одновременным приростом неорганического фосфата и АДФ при одиночном сокращении изолированной мышцы лягушки.

2.**Миокиназный путь** (незнач. кол-во АТФ). Аденилаткиназная реакция:

$$2АДФ \underset{\text{аденилаткиназа}}{\rightleftharpoons} АТФ + АМФ\ .$$

Запасы креатинфосфатат (КФ) в мышце невелики, а доступность энергии КФ имеет ценность для работающей мышцы только в том случае, если расход его постоянно возмещается синтезом АТФ в процессе метаболизма.

Регенерация богатых энергией фосфорных соединений происходит за счет 2-х процессов – **гликолиза**, и **окислительного фосфорилирования** (ОФ). При достаточном снабжении O_2 мышца, несмотря на анаэробный механизм сокращения, в конечном итоге работает за счет энергии, образующейся при окислении (в цикле Кребса) как продуктов распада углеводов, так и ряда других субстратов тканевого дыхания, в частности жирных кислот, а также ацетата и ацетоацетата. КФ в мышечной ткани (в частности, в миокарде) способен выполнять не только роль как бы депо легкомобилизуемых макроэргических фосфатных групп, но также роль транспортной формы макроэргических фосфатных связей, образующихся в процессе тканевого дыхания и связанного с ним ОФ. Предложена схема переноса энергии из митохондрий в цитоплазму клетки миокарда (рис. 7).

АТФ–АДФ-транслоказа (локализованной на внутренней мембране митохондрий) транспортеирует матричную АТФ и передает ее в активный центр кератинкиназы (расположеный на внешней стороне внутренней мембраны). В межмембранном пространстве (в присутствии Mg^{2+}) при наличии в среде креатина образуется равновесный тройной фермент-субстратный комплекс **креатин–креатинкиназа–АТФ–Mg^{2+},** который затем распадается с образованием **КФ и АДФ–Mg^{2+}**.

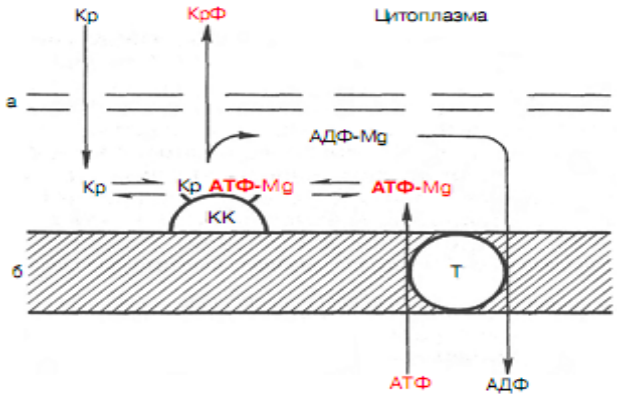


Рис.7. Перенос энергии из митохондрий в цитоплазму клетки миокарда (схема по В.А. Саксу и др.). Объяснение в тексте.
а - наружная мембрана; б - внутренняя мембрана; Кр - креатин; Крф - креатинфосфат; КК - креатинкиназа; Т - транслоказа.

КФ диффундирует в цитоплазму, где используется в миофибриллярной креатинкиназной реакции для рефосфорилирования АДФ, образовавшегося при сокращении. Возможно не только в сердечной мышце, но и в скелетной мускулатуре имеется подобный путь транспорта энергии из митохондрий в миофибриллы.

<u>Источники энергии мышечного сокращения</u>

В состоянии покоя. Свободные жирные кислоты (СЖК) и кетоновые тела (КТ).
При умеренной нагрузке. СЖК + КТ + глюкоза крови.
Преобладает аэробный метаболизм, аэробный путь ресинтеза АТФ.

При интенсивной мышечной работе скорость расщепления гликогена или глюкозы с образованием молочной кислоты увеличивается в сотни раз. Соответственно содержание лактата в мышечной ткани может повышаться до 1,0–1,2 г/кг и более. С током крови значительное количество лактата поступает в печень, где ресинтезируется в глюкозу и гликоген (глюконеогенез) за счет энергии окислительных процессов.

При максимально интенсивной работе – функционирует креатинкиназный путь, а через 20с – присоединяется и гликолиз (максимум через 40–80 с).
При максимальной нагрузке. СЖК + КТ + глюкоза крови + гликоген мышц.
Преобладает гликолитичекий путь.

Ресинтез АТФ в **миокарде** должен происходить намного интенсивнее, чем в скелетной мускулатуре. Для сердечной мышцы теплокровных животных и человека основным путем образования богатых энергией фосфорных соединений является путь ОФ, связанный с поглощением O_2.

Механизмы энергообеспечения мышечного сокращения

1. Основной регулятор энергетики мышечной клетки-это отношение [АТФ]/[АДФ]·[Фн]. В покое концентрация АТФ высокая, а АДФ — низкая, в результате чего тормозится активность ключевых ферментов гликолиза, ЦТК и работа ДЦ. С началом работы мышц концентрация АТФ падает, а АДФ возрастает, что приводит к активации вышеназванных процессов.

2. Накапливающийся при работе мышц лактат поступает из крови в печень, где путём глюконеогенеза превращается в глюкозу, которая поступает в кровь, далее в мышцы, где восстанавливает запас гликогена (глюкозо-лактатный цикл).

3. Аденилаткиназная (миокиназная) реакция: 2 АДФ ↔ АТФ + АМФ.
АТФ используется для мышечного сокращения, а АМФ стимулирует гликолиз.
4. Креатинкиназная реакция: Креатин + АТФ↔КФ + АДФ.

Покоящиеся мышцы содержат в 10–20 раз больше КФ, чем АТФ, но КФ, в отличие от АТФ, не может использоваться мышцами для сокращения.

КФ: 1. транспортная форма энергии в мышцах;

2. с АДФ участвует в образовании АТФ.

Запаса КФ хватает только на 10 с, но за это время запускаются 1–3-й механизмы. Особенно эта система важна для миокарда, так как он очень чувствителен к недостатку кислорода. В **сердечной мышце аэробное окисление** веществ неуглеводной природы при работе имеет большее значение, чем при сокращении скелетной мышцы. Только 30–35% O_2, поглощаемого сердцем в норме, расходуется на окисление углеводов и продуктов их превращения. **Главным субстратом дыхания в сердечной мышце являются жирные кислоты**. Окисление неуглеводных веществ обеспечивает около 65–70% потребности миокарда в энергии. Из свободных жирных кислот в сердечной мышце особенно легко подвергается окислению олеиновая кислота.

БИОХИМИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ В МЫШЦАХ ПРИ ПАТОЛОГИИ

Общие симптомы для большинства заболеваний мышц (прогрессирующие мышечные дистрофии, атрофия мышц в результате их денервации, тенотомия, полимиозит, некоторые авитаминозы и т.д.)	• резкое снижение в мышцах содержания миофибриллярных белков; • возрастание концентрации белков стромы и некоторых саркоплазматических белков, в том числе миоальбумина; • снижение уровня АТФ и креатинфосфата; • снижение АТФазной активности контрактильных белков (миозина): • уменьшение количества имидазолсодержащих дипептидов.
При прогрессирующих мышечных дистрофиях и других заболеваниях, связанных с распадом мышечной ткани	• часто отмечаются сдвиги в фосфолипидном составе мышц: значительно снижается уровень фосфатидилхолина и фосфатидилэтаноламина, концентрация сфингомиелина и лизофосфатидилхолина повышается

Ионофор (компонент Ca^{2+}-регулирующей системы СПР)- протеолипид, экстрагируемый из сети; известно, что он ускоряет действие АТФазы как насоса.

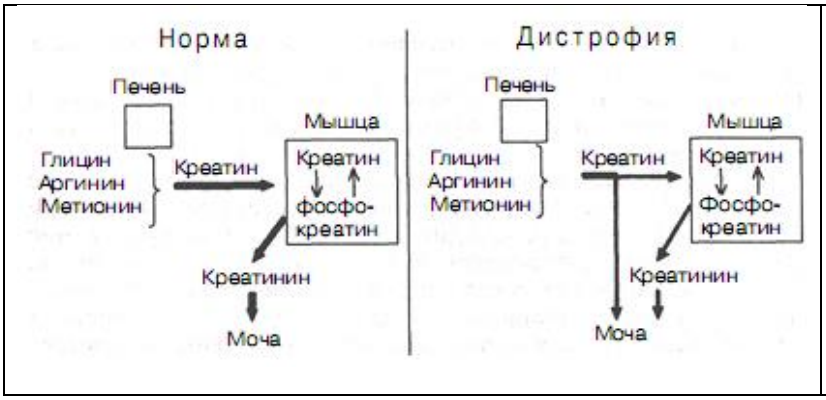


Рис. 9. Схематическое изображение происхождения креатинурии при прогрессирующей мышечной дистрофии (по Д.Л. Фердману).

Для многих форм патологии мышечной ткани характерны нарушение метаболизма креатина и его усиленное выделение с мочой (**креатинурия**).

Креатинурия у больных миопатией является результатом нарушения в скелетной мускулатуре процессов фиксации (удержания) креатина и его фосфорилирования. Если нарушен процесс синтеза КФ, то не образуется и креатинина; содержание последнего в моче резко снижается. В результате креатинурии и

нарушения синтеза креатинина резко повышается **креатиновый показатель** (креатин/креатинин) мочи. Данный механизм представлен на рис. 9.

При миопатиях изменяется активности ферментов в мышцах: уменьшается активность ферментов, локализованных в саркоплазме; незначительно изменяется активность ферментов, связанных с митохондриями; заметно возрастает активность лизосомальных ферментов. При многих заболеваниях мышечной системы наступают сдвиги в системе цАМФ: снижается содержание цАМФ в мышечной ткани, повышается активность **фосфодиэстеразы** и нарушается способность аденилатциклазы активироваться под влиянием адреналина и фторида натрия.

Нарушение метаболизма сердечной мышцы при ИБС

При ишемии миокарда последовательно развиваются следующие изменения:

1. снижается ОФ и повышается анаэробный обмен;
2. происходит накопление гликогена за счет повышения кноцентрации катехоламинов и цАМФ;
3. наблюдается раннее ускорение гликогенолиза и гликолиза;
4. высокий уровень цАМФ способствует активации фосфорилазы и переход ее в **фосфорилазу а** и активация **фосфофруктокиназы** – ключевого фермента гликолиза.

Но, постепенно, запасы гликогена истощаются, гликолиз замедляется вследствие внутриклеточного ацидоза, который ингибирует фосфофруктокиназу. Содержание АТФ и КФ в клетке резко снижается в результате нарушения ОФ в митохондриях.

Одно из первых проявлений этого состояния – **нарушение мембранной проницаемости**. Что способствует выходу из клетки ионов, в том числе ионов $К^+$, а также ферментов. Дефицит энергетических ресурсов и нарушение ионного состава, существенные изменения различных мембранных «резервуаров», обеспечивающих контроль за уровнем внутриклеточного Са, обусловливают торможение функциональной активности мышечных клеток и их постепенную гибель. В этот же период выявляются изменения состава белков миокарда (резкое снижение содержания миофибриллярных белков и накопление белков стромы).

Нарушение обмена углеводов, белков и липидов (свободные жирные кислоты не окисляются, а преимущественно включаются в ТАГ) при инфаркте миокарда находит отражение в жировой инфильтрации миокарда.

В диагностике инфаркта миокарда используют, в динамике, активность креатинкиназы, АсАТ и ЛДГ в сыворотке крови. Повышение активности указанных ферментов, особенно креатинкиназы, является постоянным и наиболее высоким. Важно также исследование в сыворотке крови изоферментных спектров креатинкиназы (повышение активности изофермента МВ) и ЛДГ (увеличение активности изоферментов $ЛДГ_1$ и $ЛДГ_2$). В последние годы четко показано, что определение в сыворотке крови миокардиально специфичных белков (миоглобин, тропонин Т и др.) – весьма чувствительный ранний тест повреждения миокарда.

II Цель деятельности обучающихся на занятии

Обучающийся должен знать:

1. Мышечную ткань и ее типы;
2. Из каких компонентов состоит поперечно-полосатая мышца;
3. Какие химические компоненты входят в состав поперечно-полосатой мускулатуры;
4. Классификация белков мышечной ткани;
5. Какие белки относятся к миофибриллярным белка?
6. Миозин, строение и его функции;
7. Актин и актомиозин, строение и механизм действия;
8. Тропомиозин и тропонин и другие миофибриллярные белки;
9. Белки саркоплазмы: миоглобин, ферменты гликолиза, тканевого дыхания, парвальбумин, кальмадулин и др.;
10. Белки стромы (коллаген и эластин);
11. Какие небелковые азотистые вещества входят в состав мышечной ткани;
12. Безазотистые вещества мышечной ткани;
13. Особенности химического состава миокарда;
14. Особенности химического состава гладкой мускулатуры;
15. Источники энергии для мышечного сокращения;
16. Особенности энергообеспечения в миокарде;
17. Особенности биохимических изменений в мышцах при патологии.

Обучающийся должен уметь:

1. в виде схемы показать строение саркомера скелетных мышц.
2. написать реакцию, катализируемую креатинкиназой.

IIIСодержание обучения:

Основные вопросы:

1. Мышечную ткань и ее типы;
2. Компоненты поперечно-полосатой мышцы;
3. Химические компоненты поперечно-полосатой мускулатуры;
4. Классификация белков мышечной ткани;
5. Миофибриллярные белки мышечной ткани;
6. Миозин, строение и его функции;
7. Актин и актомиозин, строение и механизм действия;
8. Тропомиозин и тропонин и другие миофибриллярные белки;
9. Белки саркоплазмы: миоглобин, ферменты гликолиза, тканевого дыхания, парвальбумин, кальмадулин и др.;
10. Белки стромы (коллаген и эластин);
11. Небелковые азотистые вещества мышечной ткани;
12. Безазотистые вещества мышечной ткани;
13. Особенности химического состава миокарда;
14. Особенности химического состава гладкой мускулатуры;
15. Источники энергии для мышечного сокращения;
16. Особенности энергообеспечения в миокарде;
17. Особенности биохимических изменений в мышцах при патологии;
18. Схема строения саркомера скелетных мышц;
19. Креатинкиназная реакция.

IV Перечень лабораторных работ, наглядных пособий и средств ТСО.

Тестовые задания:

выберите правильный ответ

А) Интенсивно работающую мышцу обеспечивают энергией:

1) аэробное дихотомическое окисление глюкозы
2) анаэробное дихотомическое окисление глюкозы
3) окисление кетоновых тел
4) окисление жирных кислот

Ответ: 2;

Б) Резкое повышение концентрации белка в ликворе характерно для:

1.Энцефалит
2. Острая черепно-мозговая травма
3. геморрагический инсульт
4. Острый гнойный менингит
5. Опухоль мозга

Ответ: 4.

Для каждого вопроса, пронумерованного цифрой, подберите соответствующий ответ, обозначенный буквенным индексом. Один и тот же ответ может быть использован несколько раз.

А) 1) миофибриллярные белки
2) саркоплазматические белки

А. Миозин Б. Миоглобин
В. Актин
Г. Мышечные глобулины
Д. Тропомиозин

Ответ: 1А, В, Д; 2Б, Г.

Б) 1) соединения, временно связывающие аммиак в ткани мозга
2) соединения – медиаторы ЦНС
3) соединение – предшественник тормозного медиатора ЦНС
4) соединение, метаболизм которого нарушается при болезни Паркинсона
5) соединение, метаболизм которго нарушается при маниакально-депрессивном психозе и некоторых формах шизофрении
6) основной медиатор лимбической системы и ретикулярной формации
7) соединения – медиаторы периферической нервной системы

А. Глицин Б. Дофамин
В. Глутамат Г. α-кетоглутарат
Д. Серотонин
Е. Норадреналин
Ж. ГАМК
З. Ацетилхолин

Ответ: 1В, Г; 2А, Б, Д, Е, Ж, З; 3Б, 4Б, 5Д, 6Д, 7Е, З.

Для каждого вопроса выберите сочетание правильных ответов.

А) Выберите и расставьте в соответствующем порядке ферменты, при участии которых происходит мобилизация гликогена в мышцах.

1. Фосфорилаза активная
2. Протеинкиназа активная (димер C_2)
3. Глюкозо-6-фосфатаза
4. Аденилатциклаза активная
5. Аденилатциклаза неактивная
6. Фосфорилаза неактивная
7. Протеинкиназа неактивная (тетрамер $R_2 – C_2$)

Ответ: 5, 4, 7, 2, 6, 1

Б)Установите правильную последовательность возникновения нервного импульса.

1. «Следовая» деполяризация мембраны
2. Поток K^+ из нервной клетки
3. Деполяризация мембраны
4. Потенциал покоя на мембране
5. Реполяризация мембраны
6. «Следовая» гиперполяризация мембраны
7. Инверсия заряда на мембране (потенциал действия)
8. Поток Na^+ внутрь клетки

Ответ: 4, 3, 8, 7, 2, 5, 1, 6, 4.

Для каждого вопроса определите: 1) верно или неверно каждое из приведенных утверждений; 2) если верны оба утверждения, имеется ли между ними причинная связь.

А) Трупное окоченение обусловлено истощением запасов АТФ, потому что при трупном окоченении не происходит диссоциация комплекса актин – миозин.

Ответ: +, +, +.

Ситуационные задачи:

Задача 1. Токсическое действие аммиака на клетки мозга объясняется, в частности, нарушением образования нейромедиаторов. Синтез какого из известных Вам нейромедиаторов будет нарушен в первую очередь?

Ответ: Будет нарушен обмен, в первую очередь, γ-аминомасляной кислоты (ГАМК), поскольку глутаминовая кислота, из которой она образуется, будет использоваться по преимуществу на связывание аммиака с образованием глутамина.

Задача 2. Если препарат скелетной мышцы обработан смесью йодацетата (ингибитор глицеральдегиддегидрогеназы) и ротенона (ингибитор цепи переноса протонов и электронов), то мышца теряет способность сокращаться в ответ на электростимуляцию. Если препарат скелетной мышцы обработан только ротеноном, то способность к сокращению сохраняется. Объясните результаты.

Подготовьте к предстоящему занятию протокол лабораторных работ: выпишите кратко принципы методов и техники их выполнения, показатели нормы, оставляя место для расчетов и выводов.

Ответ: В первом случае блокируется субстратное фосфорилирование (в гликолизе) и окислительное фосфорилирование (в цепи переноса электронов), в результате чего нарушается синтез АТФ, необходимый для акта мышечного сокращения. Во втором случае в миоците сохраняется возможность синтеза АТФ путем субстратного фосфорилирования (при гликолизе), поэтому мышца реагирует на электростимуляцию.

Наглядные пособия:

Рисунки: 1. Структура волокна скелетной мышцы (по Гассельбаху), 2. Строение саркомера скелетной мышцы, 3. Строение молекулы миозина, 4. Строение толстого миозинового филамента, 5. Схематическое изображение F-актина, 6. Структура тонкого филамента, 7. Перенос энергии из митохондрий в цитоплазму клетки миокарда (схема по В.А. Саксу и др.), 9. Схематическое изображение происхождения креатинурии при прогрессирующей мышечной дистрофии (по Д.Л. Фердману); Таблица 1. Химический состав поперечно-полосатой мышц млекопитающих

IX Самостоятельная работа обучающихся:

Составление тестов, кроссвордов и задач по данной теме.

Вопросы для самостоятельного обучения:

2. Изменение химического состава мышечной ткани в онтогенезе;
3. Функциональная биохимия;
4. Нарушения метаболизма миокарда при ИБС.

X Список используемой литературы:

Обязательная:

3. Е.С. Северин «Биохимия», Москва 2004;
4. Е.С. Северин «Биохимия с упражнениями и задачами», Москва 2008;
5. Таганович А.Д., Кухта В.К., Морозкина Т.С., Олецкий Э. И. Биологическая химия//Краткий курс лекций для иностранных учащихся стоматологического факультета, Минск 2005, С.114-118

Дополнительная:

6. Интернет ресурсы
7. Материал конспектов занятия