

МЕДИЦИНСКИЕ ЛАБОРАТОРНЫЕ ТЕХНОЛОГИИ

РУКОВОДСТВО ПО КЛИНИЧЕСКОЙ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКЕ

Под редакцией профессора А.И. Карпищенко

Том 2



**Москва
издательская группа
«ГЭОТАР-Медиа»
2013**

УДК 616-07(035)

ББК 53.4я81

M42

Авторский коллектив: проф. *В.В. Алексеев*; канд. техн. наук *А.Н. Алипов*; канд. мед. наук *В.А. Андреев*; д-р мед. наук *В.Г. Антонов*; канд. биол. наук *М.В. Асеев*; проф. *В.Д. Бадиков*; проф. *В.С. Баранов*; проф. *А.Г. Бойцов*; д-р мед. наук *В.Н. Болехан*; канд. мед. наук *А.Б. Бутенко*; канд. мед. наук *И.И. Волков*; канд. биол. наук *А.С. Глотов*; д-р мед. наук *С.И. Глушков*; д-р биол. наук *В.Н. Горбунова*; канд. мед. наук *В.И. Государский*; д-р мед. наук *Р.А. Грашин*; *А.В. Ёлкин*; канд. биол. наук *О.А. Ефимова*; канд. мед. наук *С.Н. Жерегеля*; проф. *Е.Б. Жибурт*; канд. мед. наук *Д.Т. Жоголев*; *Н.М. Запольская*; канд. мед. наук *Ю.Ф. Захаркив*; д-р биол. наук *А.В. Зачиняева*; проф. *А.М. Иванов*; д-р биол. наук *Т.Э. Иващенко*; канд. мед. наук *М.М. Карапац*; проф. *А.И. Карпищенко*; проф. *С. А. Карпищенко*; д-р мед. наук *В.А. Кашуро*; канд. биол. наук *Л.И. Клецко*; проф. *С.С. Козлов*; проф. *Е.Н. Колосовская*; канд. физ.-мат. наук *А.А. Копылов*; канд. мед. наук *С.А. Краевой*; канд. мед. наук *А.Б. Криворучко*; проф. *В.В. Кузнецов*; д-р биол. наук *Т.В. Кузнецова*; канд. мед. наук *Т.Г. Кулибаба*; канд. мед. наук *О.Н. Листовка*; канд. биол. наук *Ю.А. Логинова*; проф. *М.Я. Малахова*; *Г.И. Маслова*; канд. мед. наук *М.Л. Медведев*; канд. мед. наук *Н.В. Михайлов*; канд. биол. наук *Н.П. Михалева*; канд. мед. наук *В.Н. Мокроусов*; д-р мед. наук *О.Л. Молчанов*; проф. *А.В. Москалев*; *Л.М. Муравник*; канд. мед. наук *П.В. Начаров*; проф. *А.Ф. Никитин*; д-р мед. наук *В.Ю. Никитин*; проф. *В.О. Никифоров*; проф. *А.А. Новик*; д-р мед. наук *В.И. Новик*; канд. биол. наук *А.А. Пендина*; проф. *Н.Г. Петрова*; д-р мед. наук *А.А. Порин*; канд. техн. наук *Н.М. Сафьянников*; проф. *В.Б. Сбоячаков*; проф. *Е.П. Сиволодский*; д-р мед. наук *С.В. Скворцов*; канд. мед. наук *В.В. Смирнов*; канд. биол. наук *А.М. Сокурова*; д-р мед. наук *А.И. Соловьев*; канд. биол. наук *И.Д. Федорова*; проф. *Л.А. Хоровская*; проф. *В.Н. Цыган*; канд. мед. наук *А.М. Чайка*; проф. *А.В. Чечеткин*; канд. биол. наук *О.Г. Чиряева*; канд. биол. наук *Е.П. Шелепина*; канд. мед. наук *Л.А. Щеголева*; проф. *В.Л. Эмануэль*.

Рецензенты: проф., президент Российской ассоциации клинической лабораторной диагностики *Д. Б. Сапрыгин*; проф., вице-президент Российской ассоциации клинической лабораторной диагностики, зав. кафедрой клинической лабораторной диагностики СПбГМУ им. акад. И. П. Павлова *В.Л. Эмануэль*.

M42 Медицинские лабораторные технологии : руководство по клинической лабораторной диагностике : в 2 т. / [В. В. Алексеев и др.] ; под ред. А. И. Карпищенко. — 3-е изд., перераб. и доп. — Т. 2. — М. : ГЭОТАР-Медиа, 2013. — 792 с. : ил.

ISBN 978-5-9704-2275-5 (т. 2)

ISBN 978-5-9704-2276-2 (общ.)

Издание состоит из двух томов. В первом volume руководства освещены вопросы химических основ лабораторных технологий, представлена роль международной системы единиц в клинико-диагностических исследованиях, рассмотрено оборудование для лабораторных исследований и описано проведение контроля качества. Подробно изложены методы исследований мочи, кала, желудочного, дуоденального и трахеобронхиального (мокрота) содержимого, транссудатов и экссудатов, цереброспinalьной, амиотической, семенной и влагалищной жидкости, лабораторные методы исследований в гематологии и лабораторная диагностика паразитарных болезней.

Во втором volume руководства представлены методы клинической биохимии, исследования системы гемостаза, лабораторные методы иммунного анализа и оценки иммунного статуса, основы техники бактериологических и вирусологических исследований, лабораторная диагностика микозов, генных болезней и эндогенной интоксикации, освещены цитогенетические и цитологические методы, а также иммуногематологические исследования при переливании крови.

Руководство предназначено врачам клинической лабораторной диагностики, врачам различных специальностей, студентам медицинских вузов и учащимся средних медицинских учебных заведений, сотрудникам организаций-производителей и дистрибуторам продукции для медицинских лабораторных исследований.

УДК 616-07(035)

ББК 53.4я81

Права на данное издание принадлежат ООО Издательская группа «ГЭОТАР-Медиа». Воспроизведение и распространение в каком бы то ни было виде части или целого издания не могут быть осуществлены без письменного разрешения ООО Издательская группа «ГЭОТАР-Медиа».

ISBN 978-5-9704-2275-5 (т. 2)
ISBN 978-5-9704-2276-2 (общ.)

© Коллектив авторов, 2013
© ООО Издательская группа «ГЭОТАР-Медиа», 2013
© ООО Издательская группа «ГЭОТАР-Медиа»,
оформление, 2013

Глава 16

МЕТОДЫ КЛИНИЧЕСКОЙ БИОХИМИИ

16.1. ФЕРМЕНТЫ

Ферменты (энзимы) — вещества белковой природы, обеспечивающие специфический высокоскоростной катализ биохимических реакций. Как правило, определенный фермент обеспечивает протекание определенной реакции в оптимальных условиях (рН, температура, концентрация субстрата, наличие активаторов и ингибиторов).

Согласно международной классификации, различают шесть классов ферментов:

- оксидоредуктазы, катализирующие окислительно-восстановительные реакции;
- трансферазы, переносящие группы атомов, отличные от атомов водорода;
- гидrolазы, расщепляющие связи с участием молекулы воды;
- лиазы, обеспечивающие образование двойных связей за счет удаления или добавления групп атомов;
- изомеразы, осуществляющие внутримолекулярный перенос групп атомов и образование изомерных форм;
- лигазы, соединяющие две молекулы с образованием связей С—С, С—О, С—S, С—N и разрывом пирофосфорной связи АТФ.

В зависимости от механизма действия выделяют ферменты с относительной и абсолютной специфичностью. Для ферментов с относительной специфичностью существенное значение имеет тип химической связи в молекуле субстрата (пищеварительные ферменты). Абсолютная специфичность действия заключается в способности фермента катализировать превращение только определенных молекул (аргиназа, уреаза).

Большинство ферментов, обеспечивающих катализ в живых организмах, находится во внутриклеточной среде (в цитоплазме и органеллах). Тем не менее о скорости синтеза ферментов и интенсивности выхода из клеток можно судить по их активности в биологических жидкостях (кровь, слюна, ЦСЖ и др.).

Наиболее важным в диагностическом процессе является исследование ферментов плазмы крови. Ферменты, которые в норме обнаруживаются в

плазме или сыворотке крови, условно можно разделить на три группы: секреторные, индикаторные и экскреторные.

Секреторные ферменты, синтезируясь в печени, в норме выделяются в плазму крови, где играют определенную физиологическую роль. Типичными представителями данной группы являются ферменты, участвующие в процессе свертывания крови, и сывороточная холинэстераза.

Индикаторные (клеточные) ферменты попадают в кровь из тканей, где они выполняют определенные внутриклеточные функции. Одни из них находятся, главным образом, в цитозоле клетки (ЛДГ, альдолаза), другие — в митохондриях (глутаматдегидрогеназа), третьи — в лизосомах (β -глюкуронидаза, кислая фосфатаза) и т. д. Большая часть индикаторных ферментов в норме определяется в сыворотке крови лишь в следовых количествах. При поражении тех или иных тканей ферменты из клеток «вымываются» в кровь; их активность в сыворотке резко возрастает, являясь индикатором степени и глубины повреждения этих тканей.

Экскреторные ферменты синтезируются главным образом в печени (лейцинаминопептидаза, щелочная фосфатаза и др.). В физиологических условиях эти ферменты в основном выделяются с желчью. Еще не полностью выяснены механизмы, регулирующие поступление данных ферментов в желчные капилляры. При многих патологических процессах выделение экскреторных ферментов с желчью нарушается, а их активность в плазме крови повышается.

Особый интерес для клинической практики представляет исследование активности индикаторных ферментов в сыворотке крови, так как по появлению в плазме или сыворотке крови ряда тканевых ферментов в повышенных количествах можно судить о функциональном состоянии и поражении различных органов (например, печени, сердечной мышцы и скелетной мускулатуры). При остром инфаркте миокарда особенно важно исследование активности креатинкиназы, АсАТ, ЛДГ и оксибутиратдегидрогеназы.

При заболеваниях печени, в частности при вирусном гепатите, в сыворотке крови значитель-

но увеличивается активность АлАТ и AcAT, сорбидегидрогеназы, глутаматдегидрогеназы и некоторых других ферментов. Большинство ферментов, содержащихся в печени, присутствует и в других органах и тканях. Однако известны ферменты, которые в определенной степени специфичны для печеночной ткани. К таким ферментам, в частности, относится γ -глутамилтранспептидаза, или γ -глутамилтрансфераза. ГГТФ служит высокочувствительным индикатором заболеваний печени. Повышение активности ГГТФ отмечается при острых инфекционных или токсических гепатитах, циррозе печени, внутри- или внепеченочной закупорке желчных путей, первичном или метастатическом опухолевом и алкогольном поражении печени. Иногда увеличение активности ГГТФ наблюдается при застойной сердечной недостаточности и редко — после инфаркта миокарда, при панкреатитах, опухолях поджелудочной железы.

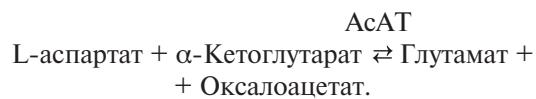
Органоспецифическими ферментами для печени также считаются гистидаза, сорбидегидрогеназа, аргиназа и орнитинкарбамоилтрансфераза. Изменения активности этих ферментов в сыворотке крови свидетельствуют о поражении печеночной ткани.

Возрастание активности ферментов сыворотки крови при многих патологических процессах объясняется, прежде всего, двумя причинами: 1) выходом ферментов в кровяное русло из поврежденных участков органов или тканей на фоне продолжающегося их биосинтеза в поврежденных тканях; 2) одновременным повышением каталитической активности некоторых ферментов, переходящих в кровь. Возможно, что повышение активности ферментов при «поломке» механизмов внутриклеточной регуляции обмена веществ связано с прекращением действия соответствующих регуляторов и ингибиторов ферментов, изменением под влиянием различных факторов строения и структуры макромолекул ферментов.

Как правило, ферменты содержатся в различных органах, и повышение их активности не может интерпретироваться однозначно. Для конкретизации динамики патологического процесса в диагностике используется определение спектра изоферментных форм, являющихся органоспецифическими. Изоферменты — это множественные формы ферmenta, катализирующие одну и ту же реакцию, но отличающиеся друг от друга по физическим и химическим свойствам (сродству к субстрату, максимальной скорости катализируемой реакции, электрофоретической подвижности).

16.1.1. Аминотрансферазы

Аспартатаминотрансфераза — AcAT (L-аспартат: 2-оксоглутарат-аминотрансфераза; К. Ф. 2.6.1.1) катализирует обратимый перенос аминогруппы с L-аспарагиновой кислоты на α -кетоглутаровую:



Аланинаминотрансфераза — АлАТ (L-аланин: 2-оксоглутарат-аминотрансфераза; К. Ф. 2.6.1.2) катализирует обратимый перенос аминогруппы с L-аланина на α -кетоглутаровую кислоту:



Унифицированный динитрофенилгидразиновый метод Райтмана—Френкеля

Принцип метода. В результате переаминирования, происходящего под действием AcAT и АлАТ, образуются щавелевоуксусная (оксалоацетат) и пировиноградная кислоты, которые с 2,4-динитрофенил-гидразином в щелочной среде образуют окрашенные гидразоны пировиноградной и щавелевоуксусной кислот.

Реактивы

1. 0,1 М фосфатный буфер, pH 7,4: а) 0,1 М раствор гидрофосфата натрия (Na_2HPO_4): 17,8 г кристаллогидрата $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ доводят до 1 л дистиллированной водой; б) 0,1 М раствор дигидрофосфата калия (KH_2PO_4): 3,4 г кристаллической соли доводят до 250 мл дистиллированной водой; в) смешивают 840 мл 0,1 М раствора Na_2HPO_4 и 160 мл 0,1 М раствора KH_2PO_4 . Величину pH буфера устанавливают под контролем pH-метра.
2. 0,05 М и 1 М растворы гидроксида натрия (NaOH).
3. Раствор 2,4-динитрофенилгидразина: 19,8 мг 2,4-динитрофенилгидразина [$\text{C}_6\text{H}_3(\text{NO}_2)_2\text{NNH}_2$] растворяют в небольшом количестве 1 М раствора соляной кислоты при нагревании на водяной бане. После охлаждения доводят объем 1 М раствором соляной кислоты до 100 мл. На следующий день реактив фильтруют. Раствор стабилен при хранении в холодильнике в посуде из темного стекла.
4. 1 М раствор соляной кислоты (HCl).
5. α -Кетоглутаровая кислота [$\text{COOH}(\text{CH})_2\text{COCOOH}$].
6. DL-аспарагиновая или L-аспарагиновая кислота ($\text{COOHCH}_2\text{CHNH}_2\text{COOH}$).

7. DL-аланин или L-аланин ($\text{CH}_3\text{CHNH}_2\text{COOH}$).
8. 0,4 М раствор гидроксида натрия (NaOH), свободного от карбонатов. Емкости с раствором NaOH закрывают пробками с поглотительными трубками, заполненными натронной известью.
9. Субстратный раствор для определения AcAT: 29,2 мг α -кетоглутаровой кислоты и 2,66 г DL-аспарагиновой кислоты (при использовании вместо DL-аспарагиновой кислоты L-аспарагиновой кислоты навеска уменьшается вдвое) растворяют в 1 М растворе гидроксида натрия. Гидроксид натрия следует прибавлять осторожно, небольшими порциями, до полного растворения составных частей и получения pH 7,4. Раствор переливают в мерную колбу вместимостью 100 мл, ополаскивая 0,1 М фосфатным буфером с pH 7,4. Доливают буферный раствор в колбу до метки, тщательно перемешивают, прибавляют 1 каплю хлороформа и сохраняют в холодильнике в замороженном виде. Перед употреблением замороженный раствор должен полностью оттаивать (повторное оттаивание не рекомендуется).
10. Субстратный раствор для определения АлАТ: 29,2 мг α -кетоглутаровой кислоты и 1,78 г DL-аланина (при использовании вместо DL-аланина L-аланина навеска уменьшается вдвое) взвешивают на аналитических весах. Дальнейшая работа проводится так же, как для субстратного раствора AcAT.
11. Калибровочный раствор пирувата натрия ($\text{CH}_3\text{COCOONa}$): 11 мг кристаллического пирувата натрия (белого цвета) растворяют в небольшом количестве дистиллированной воды, переносят в мерную колбу вместимостью 100 мл и доводят объем раствора до метки дистиллированной водой; 1 мл раствора содержит 110 мкг пирувата натрия, что соответствует 88 мкг (или 1 мкмоль) пировиноградной кислоты.

Материал для исследования. Сыворотка крови без признаков гемолиза.

Ход определения AcAT. В пробирку вносят 0,5 мл субстратного раствора для определения AcAT, нагревают при 37 °C в течение 5 мин, добавляют 0,1 мл исследуемой сыворотки крови и инкубируют при 37 °C 30 мин. Затем добавляют 0,5 мл раствора 2,4-динитрофенилгидразина и выдерживают в течение 20 мин при комнатной температуре. Добавляют 5 мл 0,4 М раствора гидроксида натрия, тщательно перемешивают и оставляют для развития окраски на 10 мин при комнатной температуре. Фотометрируют при длине волн 500–560 нм (зеленый светофильтр) в кювете с длиной оптического пути 10 мм против контрольной пробы.

Контрольную пробу ставят так же, как опытную, но сыворотку добавляют после инкубации.

Ход определения АлАТ. В пробирку вносят 0,5 мл субстратного раствора АлАТ и нагревают при 37 °C в течение 5 мин, затем добавляют 0,1 мл исследуемой сыворотки крови и инкубируют при 37 °C 30 мин. Дальнейший анализ осуществляют так же, как и при определении AcAT.

Расчет активности ферментов в сыворотке крови производят по калибровочному графику.

Построение калибровочного графика. Из калибровочного раствора пирувата натрия готовят ряд разведений (табл. 16.1).

Калибровочные пробы ставят так же, как опытные, но вместо сыворотки крови вносят разведенные калибровочные растворы. Фотометрируют против контрольной пробы, в которую вместо калибровочного раствора добавляют дистиллированную воду. Калибровочный график сохраняет линейность до величины экстинкции 0,3.

Нормальные величины: активность AcAT, АлАТ должна находиться в пределах 28–190 нмоль/(с·л) при 37 °C.

Таблица 16.1

Построение калибровочного графика для определения активности AcAT и АлАТ

№ пробирки	Калибровочный раствор пирувата натрия, мл	Вода дистиллированная, мл	Пировиноградная кислота		Активность ферmenta (AcAT, АлАТ), нмоль/(с·л)
			мкг	мкмоль	
1	0,05	0,55	4,4	0,05	278
2	0,1	0,5	8,8	0,1	556
3	0,15	0,45	13,2	0,15	834
4	0,2	0,4	17,6	0,2	1112
5	0,25	0,35	22,0	0,25	1390

Унифицированный метод определения активности AcAT по оптимизированному оптическому тесту

Принцип метода заключается в различии поглощения при длине волны 340 нм восстановленной (НАД·Н) и окисленной (НАД) форм никотинамидадениндинуклеотида. При длине волны 340 нм НАД·Н имеет максимальную абсорбцию, тогда как НАД при этой длине волны поглощения не имеет.

1. Основная реакция:



2. Индикаторная реакция:



Реактивы

1. Дигидрофосфат калия (KH_2PO_4).
2. Гидрофосфат калия (K_2HPO_4).
3. L-аспарагиновая кислота ($\text{COOHCH}_2\text{CHNH}_2\text{COOH}$) или аспартат натрия.
4. 0,1 М фосфатный буфер, pH 7,4: 1,36 г дигидрофосфата калия и 2,28 г кристаллогидрата гидрофосфата калия ($\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) растворяют в 50 мл дистиллированной воды, проверяют pH и доводят дистиллированной водой объем в мерной колбе до 100 мл. Раствор стабилен при хранении в холодильнике.
5. Субстратно-буферный раствор, pH 7,4 – 0,25 М раствор L-аспарагиновой кислоты в 0,1 М фосфатном буфере: 3,3 г L-аспарагиновой кислоты или 3,9 г аспартата натрия растворяют в 40–50 мл 0,1 М фосфатного буфера, проверяют pH и доводят фосфатным буфером объем в мерной колбе до 100 мл. При использовании L-аспарагиновой кислоты к ее навеске перед растворением в фосфатном буфере для достижения pH 7,4 добавляют 20–26 мл 1 М раствора гидроксида натрия и затем проверяют pH. Раствор можно хранить в холодильнике в течение 1 мес.
6. 15 mM раствор β -никотинамидадениндинуклеотида (динатриевая соль): 16 мг НАДН· $\text{Na}_2\text{4H}_2\text{O}$ растворяют в 1,5 мл дистиллированной воды. Раствор стабилен в течение 2 нед при хранении в холодильнике в посуде из темного стекла. Коэффициент молярного поглощения при длине волны 340 нм – не ниже $5,6 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.
7. 1 М и 5 М растворы гидроксида натрия.
8. 0,45 М раствор α -кетоглутаровой кислоты [$\text{COOH}(\text{CH})_2\text{COCOOH}$]: 200 мг α -кетоглутаровой кислоты растворяют в 2,5 мл дистиллиро-

ванной воды и добавляют 0,5 мл 5 М раствора гидроксида натрия.

9. Малатдегидрогеназа (МДГ) (L-малат: NAD^+ -оксидоредуктаза; К.Ф. 1.1.1.37) из сердца свиньи. Суспензия в 50% растворе глицерина. Специфическая каталитическая активность более 17 ммоль/(с·л). Для приготовления рабочего раствора к 20 мкл суспензии добавляют 5 мл дистиллированной воды.
10. Лактатдегидрогеназа (ЛДГ) (L-лактат: NAD^+ -оксидоредуктаза; К.Ф. 1.1.1.27) из скелетной мышцы кролика или свиньи. Суспензия в 50% растворе глицерина. Специфическая каталитическая активность не ниже 8 ммоль/(с·л). Для приготовления рабочего раствора к 40 мкл суспензии добавляют 5 мл дистиллированной воды. Раствор стабилен при хранении в холодильнике в течение 3 мес.
11. 154 mM (изотонический) раствор натрия хлорида. Все реагенты лучше готовить на бидистиллированной воде.

Специальное оборудование. Спектрофотометр с терmostатируемой кюветой.

Материал для исследования. Сыворотка крови или плазма без признаков гемолиза.

Ход определения. Перед анализом растворы реагентов и исследуемую сыворотку крови подогревают до температуры измерения.

Последовательность внесения реагентов в кювету и ход определения представлены в табл. 16.2.

Вычисляют поправку экстинкции опытной пробы с учетом контрольного опыта по формуле:

$$\left[\frac{\Delta E}{\Delta t} \right]_{\text{оп.}} - \left[\frac{\Delta E}{\Delta t} \right]_{\text{к.}} - \left[\frac{\Delta E}{\Delta t} \right]_{\text{скор.}}$$

Скорректированную величину экстинкции опытной пробы используют в дальнейших расчетах.

Расчет производят по формуле:

$$A = \frac{V_{\text{п.с.}}}{E \cdot l \cdot V_{\text{сыв.}}} \cdot \left[\frac{\Delta E}{\Delta t} \right]_{\text{скор.}},$$

где A – активность AcAT, ммоль/(с·л); $V_{\text{п.с.}}$ – объем реакционной смеси, мл; $V_{\text{сыв.}}$ – объем сыворотки крови, взятой для анализа, мл; t – время инкубации, с; $\left[\frac{\Delta E}{\Delta t} \right]$ – изменение экстинкции пробы за 1 с; E – коэффициент молярной экстинкции НАД·Н при длине волны 340 нм, $6,22 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$; l – длина оптического пути стандартной кюветы, $1 \cdot 10^{-2}$ м.

Нормальные величины: 30–420 ммоль/(с·л), или 2–25 МЕ, при 30°C .