

# ЛАБОРАТОРНЫЕ МАРКЕРЫ В ДИАГНОСТИКЕ ЗАБОЛЕВАНИЙ ЖЕЛУДОЧНО-КИШЕЧНОГО ТРАКТА



# ОСНОВНЫЕ ГРУППЫ ЗАБОЛЕВАНИЯ

- Заболевания желудка (острые и хронические гастриты, язвенная болезнь желудка)
- Заболевания кишечника (острый энтероколит, хронический энтерит, хронический колит)
- Заболевания печени и желчных путей (хронические гепатиты, цирроз печени, желчнокаменная болезнь, острый и хронический холецистит)
- Заболевания поджелудочной железы (острый и хронический панкреатит)

## ОСНОВНЫЕ КЛИНИЧЕСКИЕ СИНДРОМЫ

- Желтуха (надпеченочная, печеночная, подпеченочная)
- Портальная гипертензия
- Гепатолиенальный синдром
- Печеночная недостаточность, печеночная кома
- Недостаточность (внешнесекреторная) поджелудочной железы

# МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Основные методы исследования	Современные методы исследования
Исследование секреторной функции желудка (микроскопическое исследование, эксфолиативная цитология), двигательной функции ( рентгенологическое, гастроскопическое исследование).	Иммуноферментный метод использующий два различных типа моноклональных антител (сендвич-метод), исследование гормонов ( гастрин, пепсиногена I, II, гистамина).
Ректороманоскопия и колоноскопия кишечника, копрологическое исследование ( макроскопическое и микроскопическое).	Определение эластазы, секретина, вазоактивного интестинального полипептида, серотонина, гистамина
Функциональное исследование печени и поджелудочной железы, исследование ферментов, дуоденального содержимого, радиоизотопные методы, эхография, биопсия, лапароскопия.	Иммуноферментный метод, определение холицистокинин-панкреозимин, стоматостатин

# ДИАГНОСТИКА ЗАБОЛЕВАНИЙ ПЕЧЕНИ И ЖЕЛЧНЫХ ПУТЕЙ

## ИССЛЕДОВАНИЕ ФЕРМЕНТОВ ПЕЧЕНИ

**Аминотрансферазы** – ферменты, катализирующие взаимное превращение аминокислот и  $\alpha$ -кетокислот путем переноса аминогруппы.

Наибольшее клинико-диагностическое значение получило определение активности двух аминотрансфераз: аспартатаминотрансферазы (КФ.2.6.1.1; L-аспартат: 2-оксоглутарат аминотрансфераза) и аланинаминотрансферазы (КФ.2.6.1.2; L-аланин:2-оксоглутарат аминотрансфераза).

Для их обозначения используют сочетание трех или четырех символов – АСТ и АЛТ и АсАТ и АлАТ. В ряде случаев продолжают использовать устаревший термин «трансаминазы».

Специфичность аминотрансфераз определяется аминокислотами, являющимися донорами аминогруппы: аланин – для аланинаминотрансферазы и аспарагиновая кислота – для аспартатаминотрансферазы

# Распределение аминотрансфераз в тканях человека.

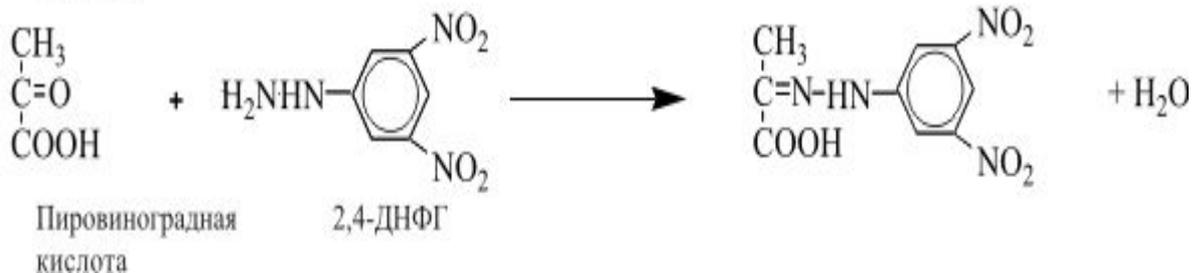
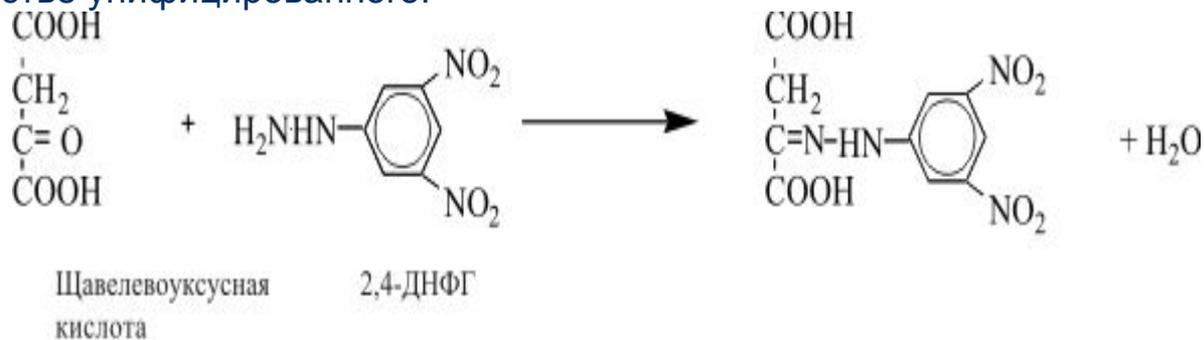
Ткани	АсАТ	АлАТ
Сердце	1166	66
Печень	612	358
Головной мозг (кора)	1230	8
Скелетная мышца	357	33
Почка		
корковый слой	192	37
мозговой слой	173	15
Поджелудочная железа	86	20
Лимфатические узлы	148	3,7
Легкое	18	5
Клетки крови	Ед/ 10 <sup>11</sup> клеток	
Эритроциты	7,4	2,0
Гранулоциты	243 ± 27	75 ± 12
Лимфоциты	75 ± 8	23 ± 3
Тромбоциты	4,0 ± 0,5	1,4 ± 0,2

## ИЗМЕНЕНИЕ АКТИВНОСТИ АМИНОТРАНСФЕРАЗ ПРИ ГЕПАТИТАХ

ГЕПАТИТ А	ГЕПАТИТ В
АлАТ-активность фермента увеличивается за неделю до появления клинических признаков	Активность аминотрансфераз повышается за несколько недель до появления желтухи
На 7-10 сутки пик ферментативной активности. Активность АлАТ выше активности АсАТ	Склонность к хроническому течению данной формы гепатита приводит к более длительному повышению активности ферментов
При неосложненном течении заболевания активность аминотрансфераз приближается к норме через 2-5 недель после появления желтухи. Снижение активности АсАТ происходит быстрее, чем АлАТ	Длительное сохранение большей активности АлАТ, свидетельствует о хронизации процесса или развитии цирроза печени.

# Методы определения активности аминотрансфераз.

- **Методы с фиксированным временем инкубации (end point).** Основаны на способности кетокислот вступать в реакцию с 2,4-динитрофенилгидразином, образовывать гидразоны кетокислот.
- Данный принцип лежит в основе хорошо известного колориметрического метода определения активности аминотрансфераз, с 1957 г., служившего у нас в стране в качестве унифицированного.



# Методы непрерывной регистрации (kinetic).

Контроль над скоростью реакции переаминирования можно осуществлять сочетанием аминотрансферной реакции с реакцией, катализируемой соответствующей субстрату дегидрогеназой. Кетокислоты, образующиеся в аминотрансферной реакции, определяют путем ферментативного превращения в соответствующие гидроксикислоты по изменению концентрации НАДН<sub>2</sub> в среде инкубации. Например, ЩУК превращается в яблочную кислоту в присутствии малатдегидрогеназы (МДГ), а ПВК превращается в молочную кислоту при участии лактатдегидрогеназы (ЛДГ):

# БИЛИРУБИН

**Билирубин** - оранжево-желтый пигмент, образующийся, в основном, при разрушении стареющих эритроцитов. В 1849 г. и назван «желтым» пигментом «гематоином». Термин «билирубин» был предложен в 1864 г.

Около 85% всего билирубина образуется из гема «старых» эритроцитов, разрушающихся в ретикулоэндотелиальных клетках печени, селезенки и костного мозга.

Остающиеся 15% образуются из предшественников эритроцитов, разрушающихся в костном мозге (так называемый неэффективный эритропоэз), и от расщепления других гемсодержащих белков.

За сутки при разрушении состарившихся эритроцитов образуется от 250 до 350 мг билирубина. Его клиренс в нормальных условиях составляет около 5 мг/кг/сут у взрослых и не меняется значительно при гемолизе.

# Токсический эффект на клетки избытка билирубина.

- При избытке содержания билирубина в крови он становится основным повреждающим фактором — ингибирует активность митохондриальных ферментов, нарушает синтез ДНК, блокирует синтез белка и процессы фосфорилирования.
- Билирубин способен блокировать работу ионных каналов, что связывают с нарушением нервной проводимости, особенно в слуховом нерве.
- Билирубин ингибирует ионный обмен и транспорт воды в почке, чем объясняют отек нервных клеток, развивающийся при билирубиновой энцефалопатии.
- Повышение уровня конъюгированного билирубина в крови является специфичным признаком заболеваний печени или желчных путей.
- Увеличение концентрации конъюгированного билирубина может происходить при нарушении энергозависимого процесса выведения билирубина, которое наблюдают при сепсисе, у больных, находящихся на длительном парентеральном питании после оперативного вмешательства.

# ФАКТОРЫ ОКАЗЫВАЮЩИЕ ВЛИЯНИЕ НА КОНЦЕНТРАЦИЮ БИЛИРУБИНА В КРОВИ

- прием пищи (концентрация билирубина после 48-часового голодания может повыситься в 2 раза, после еды – снижается на 20–25%);
- изменения уровня билирубина в течение суток могут достигать 15–30%;
- физическая нагрузка может приводить к повышению концентрации билирубина на 30%;
- прием оральных контрацептивов снижает концентрацию билирубина на 15%;
- расовые различия (концентрация билирубина в крови на 33% ниже у афро-американских мужчин, на 15% ниже у афро-американских женщин);
- при беременности концентрация билирубина снижается ко второму триместру на 33%;
- гемолитическая анемия повышает концентрацию неконъюгированного билирубина;
- гемолиз образца (возможно вмешательство в некоторых методах);
- освещение образца, так как свет способствует превращению неконъюгированного билирубина в фотоизомеры, что приводит к снижению в образце концентрации общего билирубина на 0,34 мкмоль/л

# Методы определения билирубина.

- Реакция между билирубином и диазотированной сульфаниловой кислотой, открытая Эрлихом в 1883 г., была использована для определения билирубина в сыворотке и желчи *Bergh* и *Muller* в 1916 г. В последующем данная реакция, получившая название «реакция Ван ден Берга», послужила основой для широко используемых методов определения билирубина. Обнаружение того, что в сыворотке новорожденных с желтухой реакция протекала медленно и требовала добавления спирта в качестве «акселератора», а в желчи и сыворотке взрослых она протекала быстро без дополнения этанола, привело к появлению понятия «прямой» и «непрямой» билирубин.
- С помощью хроматографии из сыворотки были выделены 3 фракции билирубина: неконъюгированный билирубин (не прямо реагирующая фракция) и билирубин моноглюкуронид и диглюкуронид (прямо реагирующие фракции). Позднее при хроматографии выявили 4 фракции билирубина: неконъюгированный билирубин ( $\alpha$ -билирубин), моноглюкуронид ( $\beta$ -билирубин) и диглюкуронид билирубина ( $\gamma$ -билирубин). Кроме того, был обнаружен билирубин, прочно связанный с белком ( $\delta$ -билирубин). Билирубин, который иногда называют билипротеином, образуется при ковалентном связывании конъюгированного билирубина с альбумином. Период его полужизни, как и у альбумина, составляет 17–20 дней.

## Ферментативные методы.

- Данная группа методов определения билирубина базируется на реакции окисления билирубина билирубиноксидазой (КФ 1.3.35) до биливердина. При  $pH$  реакционной среды около 8 и в присутствии холата и додецилсульфата натрия все фракции билирубина окисляются до биливердина. Уменьшение поглощения при 425 или 460 нм пропорционально концентрации общего билирубина в сыворотке. Прямой билирубин определяют при  $pH$  от 3,7 до 4,5. При  $pH$  10 фермент способен выборочно окислять глюкурониды билирубина.  $\delta$ -Билирубин не вступает в реакцию.

# Неинвазивный метод определения билирубина.

- Были разработаны неинвазивные методы для чрескожного определения билирубина с помощью билирубинометров. Билирубинометр (*icterometer*) представляет собой отражательный фотометр, позволяющий по окраске кожных покровов судить о концентрации билирубина в крови. Результаты определения билирубина с использованием первого поколения анализаторов зависели от окраски кожных покровов. В более поздних моделях использование нескольких длин волн устранило этот недостаток.
- Подобные анализаторы снижают потребность в исследовании крови и облегчают наблюдение за новорожденными вне стационара. Данный способ определения билирубина не может полностью вытеснить количественные лабораторные методы.
- Полученные с его помощью результаты обеспечивают быстрое получение информации, уменьшают потребность в повторных венопункциях и финансовые затраты.

# Технология «сухой» химии.

- Разработаны два подхода с использованием технологии сухой химии в виде тест-полосок. Для определения общего билирубина применена модификация диазотирующей реакции, аналогичной реакции в методе *Jendrassik-Grof*. Конъюгированный и неконъюгированный билирубин определяют после связывания со сложным гидрофобным катионоактивным полимером. Данная реакция приводит к смещению спектра отражения билирубина — неконъюгированный билирубин обладает более высокой поглощающей способностью по сравнению с конъюгированным билирубином при 460 нм. Анализатор позволяет оценить обе фракции по отражению при 400 нм и 460 нм.

# Хроматографический метод.

- Использование высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) позволяет преодолеть многие проблемы, связанные с нестабильностью билирубина и его метаболитов.
- Для калибровки используют очищенные препараты конъюгатов билирубина. В одном из методов конъюгаты билирубина определяют после их превращения в соответствующие метильные производные.
- С помощью метода ВЭЖХ обнаружили следующие соотношения между четырьмя фракциями билирубина: неконъюгированный билирубин — 27% (8–55%), билирубин моноглюкуронид — 23,9% (8–37%), билирубин диглюкуронид 13,1% (7–21%), билирубин, связанный с белками, — 36,8% (1–77%).

# *Исследуемый материал.*

- Для определения концентрации общего билирубина методами, основанными на реакции диазосочетания, используют сыворотку или плазму. Поскольку билирубин как химическое соединение чрезвычайно нестабилен и разрушается при освещении и высокой температуре, исследуемые образцы должны быть защищены от воздействия окружающего света в ходе анализа.
- Концентрация билирубина может снизиться на 30–50% за 1 ч, если образец сыворотки или плазмы подвергают воздействию прямого солнечного света. После отделения клеток крови от жидкой части и хранения сыворотки или плазмы в темноте уровень билирубина не меняется в течение 2 дней при комнатной температуре, 4 дня — при 4 С, и в течение неопределенно долгого периода при 20 С.

# Стандартизация методов.

- Существенной проблемой стандартизации является выбор надлежащего калибровочного материала.
- Наличие очевидных погрешностей и различий в результатах, получаемых различными лабораториями, является итогом отсутствия стандартизации.
- В связи с этим рекомендуют использование в качестве растворителя для стандартных растворов билирубина белковых растворов. Разработан ряд подходов к приготовлению стандартных растворов билирубина.
- Синтезированы и доступны конъюгаты билирубина. Имеются указания на то, что данные конъюгаты реагируют с диазореактивом аналогично глюкуронидам билирубина в реакциях диазотирования и таким образом могут использоваться для стандартизации методов определения прямого билирубина.

## *Погрешности.*

- Гемолиз может или завышать, или занижать результаты определения концентрации билирубина. Направленность эффекта зависит как от концентрации билирубина, так и концентрации гемоглобина в образце.
- Липемия способствует ложному завышению концентрации билирубина. Мутная сыворотка вызывает артефакты при спектрофотометрии.
- Использование пробирок, содержащих барьерный гель для получения образцов крови, не приводит к изменению концентрации билирубина после 1 нед. хранения образцов.

# Щелочная фосфатаза

- Термином «щелочная фосфатаза» (ЩФ) — фосфогидролаза моноэфиров ортофосфорной кислоты (КФ 3.1.3.1) — обозначают группу ферментов, гидролизующих эфиры фосфорной кислоты в интервале  $pH$  от 8,6 до 10,1.

Молекулярная масса в зависимости от источника фермента колеблется от 70 до 120 кДа. Источниками различных ферментных форм ЩФ являются: костная ткань, печень, почки, плацента, слизистая оболочка тонкой кишки, нейтрофилы, опухоли (гепатома).

# Методы определения общей активности щелочной фосфатазы

- Представителем классического подхода к определению активности ЩФ является метод, предложенный G. Shinowara.
- В данном методе субстратом служил  $\beta$ -глицерофосфат, реакция протекала в вероналовом буферном растворе ( $pH$  9,3). Высвобождающиеся в ходе реакции фосфатионы определяли с использованием фосфорномолибденового реактива, величину поглощения регистрировали при 600 нм.
- Примером другого подхода к определению активности ЩФ может служить метод, разработанный E. King и A. Armstrong. В нем в качестве субстрата был применен фенилфосфат, высвобождающийся в реакции фенол определяли реактивом Folin-Ciocalteu.

# Методы определения общей активности щелочной фосфатазы

- А Togari и соавт. определяли образующийся в реакции фенол с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с электрохимической детекцией. Метод оказался чувствительным — обнаруживал фенол на уровне 5 пмоль и позволял использовать малые объемы материала.
- Известный специалист в области клинической энзимологии D. Moss разработал спектрофотометрический кинетический метод. Среда содержала 0,1 моль/л бикарбонатный буферный раствор ( $pH$  10,0 при 37 °C), 5 ммоль/л  $MgCl_2$  и  $\alpha$ -нафтилфосфат в качестве субстрата. Об активности фермента судили по скорости высвобождения  $\alpha$ -нафтола, скорость реакции регистрировали при 340 нм в течение 5–10 минут.

# Методы определения общей активности щелочной фосфатазы

- Наиболее популярным для определения ЩФ субстратом оказался хромогенный, так называемый самоопределяющийся субстрат — 4-нитрофенилфосфат, или п-нитрофенилфосфат (4-НФФ, или п-НФФ), предложенный в 1946 г..
- В связи с тем, что продукт его гидролиза обладает желтой окраской при рН реакционной среды, скорость ферментативной реакции может контролироваться по образованию иона 4-феноксида.
- Метод обладает существенным преимуществом по сравнению с другими, так как позволяет проводить изучение кинетики реакции. В настоящее время данная реакция является основной для унифицированных и референтных методов определения активности ЩФ.

# Гамма-глутамилтранспептидаза

- преимущественно мембраносвязанный гликопротеин, катализирующий перенос аминокислот через клеточную мембрану, регулирующий разрушение и конъюгацию глутатиона, а также метаболизм эйкозаноидов.
- ГГТП представляет собой белок, состоящий из одной полипептидной цепи с молекулярной массой 90 кД. Фермент содержит гидрофильный и гидрофобный фрагменты. Активный центр расположен на гидрофильном участке полипептидной цепи. Гидрофобная область является частью той цепи, которой фермент прикреплен к мембране.
- Этот фермент катализирует перенос гамма-глутамилового остатка с гамма-глутамилового пептида на аминокислоту или пептид (экстернальная транспептидация), а также на иную субстратную молекулу (интернальная транспептидация) — либо реакцию гидролиза гамма-глутамилового пептида с образованием свободной гамма-глутаминовой кислоты. По-видимому, этот фермент участвует в «глутатионовом» цикле.

## *Методы определения активности ГГТП*

- Первым субстратом, примененным для определения активности гамма-глутамилтранспептидазы, был глутатион. Предложенные затем иные субстраты (гамма-глутамил-аминонитриты, гамма-глутамиланилидин и гамма-глутамил-бета-нафтиламид) оказались более удобными в использовании, так как нафтиламин или анилин, освобождающиеся в процессе ферментативной реакции, могут быть легко определены колориметрически благодаря присущей им окраске.

## Методы определения активности ГГТП

- В 1963 предложили использовать в качестве субстрата гамма-глутамил-4-нитроанилид, применили его в разработанном им *кинетическом методе*, получившем известность как стандартный способ определения (Американская ассоциация клинической химии, 1976).
- В методе был применен аммеддиоловый буфер (рН 8,6), в котором субстрат хорошо растворяется, а фермент проявляет большую активность. В качестве акцептора в этом методе использован глицилглицин.

## Методы определения активности ГГТП

- Процедура выполнения методики еще более упростилась в связи с применением *хромогенного субстрата* — *гамма-глутамил-p-нитроанилина* не поглощающего монохроматический световой поток с длиной волны 405 нм, — в отличие от образующегося в ходе ферментативной реакции *p-нитроанилина*, имеющего максимум поглощения при этой длине волны.
- В 1966 г. Кульганек и Димов предложили внести в реакционную смесь *глицилглицин*, что привело к значительному увеличению скорости реакции.

## Методы определения активности ГГТП

- Известен *флюориметрический метод* определения активности ГГТП. По сравнению со спектрофотометрическим он обладает в 20 раз более высокой чувствительностью. Метод позволяет использовать меньшие объемы проб биологической жидкости и более короткий период инкубации.

## Значение определения активности гамма-глутамилтранспептидазы в сыворотке крови

- Определение активности гамма-глутамилтрансферазы в сыворотке (плазме) крови приобрело большое значение для диагностики *заболеваний печени и гепатобилиарного тракта*. При эпидемическом гепатите повышение активности фермента отмечается примерно в 90% случаев наряду с аналогичным возрастанием активности щелочной фосфатазы (ЩФ).
- Активность ГГТП превосходит показатели нормы обычно в 5—6 раз, в то время как АсАТ — в 27, а АлАТ — иногда в 100—120 раз.
- При хроническом холангиогепатите активность энзима обычно превышает верхнюю границу нормы практически во всех случаях.
- При компенсированных циррозах печени активность ГГТП почти всегда повышена, с наступлением декомпенсации она снижается (на фоне увеличения активности трансаминазы и содержания билирубина).

## Значение определения активности гамма-глутамилтранспептидазы в сыворотке крови

- У больных *злокачественными опухолями* без метастазов в печень лишь в редких случаях было найдено относительно малое возрастание активности ГГТП, в основном связанное с имеющимися заболеваниями печени или желчных путей (неопухолевого происхождения). У 100% онкологических больных с метастазами в печень (без желтухи и с желтухой) установлено весьма значительное повышение активности фермента (в 12 и более раз превышающее норму). У всех больных с обтурационной (механической) желтухой найдена увеличенная (в 15—140 раз выше верхней границы нормы) активность ГГТП.
- У больных с рецидивирующей желчнокаменной болезнью (холециститом и холелитиазом с субиктером) повышение активности ГГТП отмечается более чем в 80% случаев, у больных с нормобилирубинемией — примерно в 50% случаев. После удаления у них желчного пузыря уровень активности энзима незначительно увеличен (у 30% больных). При заболеваниях желчных путей с явлениями обтурации, гепатитах, опухолях и метастазах в печень активность ГГТП возрастает раньше, и в значительно (в несколько раз) большей степени, чем активность щелочной фосфатазы, а нормализация энзиматической активности происходит позже.

## Значение определения активности гамма-глутамилтранспептидазы в сыворотке крови

- Желтуха всегда сопровождается увеличением активности ГГТП, высокая активность ГГТП связана с нарушением проходимости желчных протоков, менее высокая — с острым поражением паренхимы печени.
- При остром вирусном гепатите многократное исследование активности ГГТП позволяет оценить течение болезни; однако постоянное увеличение активности ГГТП указывает на развитие хронической формы заболевания.
- При увеличении активности ЩФ для уточнения возможного источника гиперферментемии полезно определять активность ГГТП, которая остается в пределах нормы, если увеличение активности ЩФ вызвано костным изоферментом, и увеличена, если источником фермента является печень.
- В дифференциальной диагностике желтух исследование активности ГГТП имеет большее значение, чем установление уровня активности щелочной фосфатазы. Этому особенно способствует определение индекса АлТ/ГГТП, позволяющего более достоверно, чем индекс АлТ/ЩФ, дифференцировать обтурационную и вирусную желтухи.

# ДИАГНОСТИКА ЗАБОЛЕВАНИЯ ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

- **Амилаза** - кальцийзависимый фермент, ионы кальция абсолютно необходимы для проявления функциональной активности.
- Полная активность проявляется только в присутствии различных анионов — хлорида, бромида, нитрата, холата, фосфата. Хлорид-ионы и бромид являются самыми эффективными активаторами.
- Активность амилазы обнаруживают во многих органах и тканях. Самая высокая концентрация отмечается в слюнных железах, которые секретируют амилазу (S-тип), осуществляющую гидролиз крахмала пищи во рту и пищеводе, ее действие заканчивается в желудке.
- В поджелудочной железе амилаза (P-тип) синтезируется ацинарными клетками и попадает в кишечник через панкреатические протоки.

# АМИЛАЗА

- Активность амилазы в крови обычно низкая и резко возрастает при остром панкреатите и сialoadenите (бактериальная инфекция слюнных желез). При остром панкреатите повышение активности амилазы в сыворотке обнаруживают через 5–8 ч после начала заболевания, максимальные значения наблюдают через 12–72 ч. Обычно активность превышает референтные значения в 4–6 раз. Активность фермента нормализуется к 3-му или 4-му дню.
- Часть амилазы выделяется с мочой, увеличение активности в сыворотке крови сопровождается увеличением активности в моче.
- Активность амилазы в моче достигает более высоких значений и сохраняется в течение более длительных периодов.
- Клиническая специфичность определения амилазы для диагностики острого панкреатита не высока — от 20 до 60%, поскольку увеличение ее активности обнаруживают при многих острых заболеваниях брюшной полости и ряде других заболеваний.

# Методы определения активности амилазы.

- *Амилокластические методы.* Трудности при использовании крахмала в качестве субстрата связаны с тем, что образцы крахмала значительно отличаются по многим параметрам, в частности по соотношению амилозы и амилопектина. В этих методах активность амилазы определяют по уменьшению концентрации субстрата реакции — крахмала. Йодометрические методы оказались наиболее популярными.

# Методы определения активности амилазы.

- *Турбидиметрические и нефелометрические методы* основаны на способности амилазы снижать мутность суспензии субстрата в результате ферментативной деградации молекулы субстрата. Использование лазерной нефелометрии привело к повышению аналитической чувствительности и точности по сравнению с обычными нефелометрами. Турбидиметрические и светорассеивающие методы выполняют путем непрерывной регистрации или фиксированного времени. Эти методы сложно стандартизировать из-за различий в свойствах субстрата.

# Методы определения активности амилазы.

- *Вискозиметрические методы.* Основаны на изменении вязкости инкубационной среды в ходе гидролиза крахмала амилазой. В настоящее время не используются.
- *Редуктометрические методы* в данную группу включены методы, в которых скорость ферментативной реакции контролируют путем определения образующихся в среде инкубации при гидролизе крахмала так называемых «редуцирующих» соединений — сахаров, декстринов.

# Выбор метода определения активности амилазы

- Использовать субстрат с известной структурой, качеством, разумной стоимостью и известными продуктами реакции.
- Реакция не должна зависеть от изменений условий реакции ( $pH$ , белок, концентрации глюкозы, соотношение между объемом среды и образца).
- Использовать непрерывный метод измерения и поддерживать кинетику нулевого порядка и lag-фазу не более 3 мин.
- Метод должен быть достаточно чувствительным при температуре 30 °C.
- Метод должен быть нечувствительным к вмешательству эндогенной глюкозы.

## Перспективные методы лабораторной диагностики острого панкреатита

- Определение эластазы в сыворотке крови, кале.
- Определение колипазы в сыворотке крови.
- Определение молекул средней массы (СМ).
- Расчет амилазо-креатининового индекса.
- Расчет коэффициента перитониальной экссудации.

## Лабораторные показатели крови при остром панкреатите

- **Изменения лабораторных показателей при разных формах ОП и в зависимости от характера морфологических изменений в ПЖ :**
  1. очень высокая протеолитическая активность липазы в крови.
  2. Предельно высокая активность трипсина и резкое снижение уровня его ингибитора.
  3. Важной особенностью формы ОП являются нарушения гемостаза, связанные с активацией фибринолиза, с соответствующими геморрагическому синдрому.

# Лабораторные показатели крови при остром панкреатите

- Активность  $\alpha$ -амилазы сыворотки является важным показателем для острого панкреатита, повышение ее уровня может быть кратковременным. Для лучшей информативности рекомендуется определение активности амилазы крови и мочи сочетать с определением активности липазы сыворотки крови, являющейся наиболее специфичным критерием, и параллельным определением концентрации креатинина в моче и сыворотке крови.
- Своеобразным диагностическим тестом в лабораторной диагностике острого панкреатита является определение активности эластазы в сыворотке крови и кале. Данный показатель остается значимым на протяжении нескольких дней даже после единичного приступа ОП.

# ЭЛАСТАЗА

- Эластаза является протеолитическим ферментом. Она имеет сродство к пептидным участкам, содержащим аланин, валин и лейцин, гидролизующих по карбоксильным группам. Синтезируется в ацинарных клетках поджелудочной железы и экскретируется в просвет двенадцатиперстной кишки вместе с другими ферментами, в виде предшественника – проэластазы, которая активируется трипсином.
- При физиологических условиях концентрация эластазы в панкреатическом соке колеблется между 170 и 360 мкг/мл, составляя около 6% от всех белков (ферментов). В просвете кишечника связывается, главным образом с желчными кислотами.

# ЭЛАСТАЗА

- Копрологическое тестирование. В отличие от других энзимов, экскретируемых поджелудочной железой, эластаза в процессе пассажа по кишечному тракту не подвергается деградации и выделяется в фекальные массы в неизменном виде, интактном состоянии. Это диагностическое свойство, позволяет рассматривать тест, как «золотой стандарт» в диагностике и оценке экзокринной функции поджелудочной железы. Следовательно снижение эластазы свидетельствует о развитии экзокринной панкреатической недостаточности. Уровень нормальных значений – более 200 мкг/мл каловых масс.
- Сывороточная эластаза. Вследствие воспалительных процессов поджелудочной железы и отеков в зоне ацинарных клеток, часть секретируемых ферментов, включая эластазу, попадает в общий кровоток. Эластаза возрастает в острый период панкреатита, что позволяе поставить диагноз этого заболевания. Концентрация фермента начинает возрастать через 6-48 часов от начала заболевания, остается повышенной в течении нескольких дней. Диагностическая чувствительность эластазы в период 48-96 часов от начала заболевания достигает 95-100% при специфичности – 96%. В сыворотке здоровых людей концентрация эластазы колеблется в пределах 0,1-4,0 нг/мл

# МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ ЭЛАСТАЗЫ

- Иммуноферментный метод, использующий два различных типа моноклональных антител – «сендвич-метод».
- Иммуноферментный метод, использующий поликлональные антитела.

# ЛИПАЗА

- Катализирует гидролиз липидов до глицерина и жирных кислот, содержится почти во всех органах и тканях, является лизосомальным ферментом. Энзим секретруется поджелудочной железой и в составе сока последней поступает в двенадцатиперстную кишку в активной форме. Из тонкой кишки липаза частично всасывается в кровь. В сыворотке крови активность низкая.
- Значительное увеличение сывороточной активности липазы отмечается при панкреатитах любого происхождения. Она повышается в течении нескольких часов после болевого приступа, достигая максимума через 12-24 часа и остается повышенной 10-12 дней. Увеличение активности липазы происходит параллельно амилазе, но повышение липазы держится дольше, чем амилаза. В моче активность липазы не обнаруживается.

# МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ ЛИПАЗЫ

- Классический метод определения активности липазы основан на определении количества образовавшихся из субстрата жирных кислот: титрование, колориметрический, энзиматический
- Турбидиметрический или нефелометрический метод основан на просветлении эмульсии субстрата.
- Иммунохимический метод, в котором липаза определяется как белок (концентрация вместо активности)
- Электрофорез в агарозе крови и секрете поджелудочной железы выявляют 3 формы фермента L1 и L2 формы описаны как изоферменты панкреатической липазы, а L3 – скорее всего, холестеролэстераза. L1 определяется у половины здоровых пациентов, L3 – есть у всех, L2 – не определяется в физиологических условиях.

# ХРОНИЧЕСКИЙ ПАНКРЕАТИТ

- Хронический панкреатит (ХП) — воспалительное заболевание поджелудочной железы, характеризующееся прогрессирующей очаговой, сегментарной или диффузной деструкцией анатомических структур, замещением тканей железы соединительной тканью и развитием различной степени выраженности функциональной недостаточности.

# Исследование в период обострения хронического панкреатита

- Перечень лабораторных методов исследования в период обострения ХП:
  1. Общий анализ крови
  2. Исследование амилазы в моче
  3. Исследование в крови амилазы
  4. Определение АсАТ, АлАТ, ЩФ, ГГТФ

# Лабораторные показатели крови при обострении хронического панкреатита

- Активность сывороточной амилазы начинает повышаться через 2—12 ч от начала обострения и достигает максимума к концу суток с последующим снижением активности и нормализацией в течение недели.
- В моче активность амилазы повышается на несколько часов позже по сравнению с кровью.
- Повышение активности сывороточной амилазы в 2—3 раза, а в сочетании с увеличением уровня липазы и трипсина, является достоверным лабораторным тестом ХП.
- Повышению активности липазы в крови при обострении хронического панкреатита, особенно при панкреатитах холангиогенной природы. В период ремиссии ХП активность липазы в крови находится в пределах нормы.
- У ряда больных наблюдаются гипербилирубинемия, увеличение в сыворотке крови содержания щелочной фосфатазы вследствие развития частичной или полной непроходимости желчных путей.
- В кале определяют активность химотрипсина и эластазы. Эти тесты применяются при снижении экзокринной функции поджелудочной железы, а также при дифференциальной диагностике синдрома малабсорбции.

# Лабораторные показатели крови при обострении хронического панкреатита

- При метастазировании опухоли в печень, сдавлении опухолью холедоха, особенно при раке головки ПЖ, наблюдается нарастающая гипербилирубинемия, а также повышение активности АлАТ, АсАТ, ЩФ, ГГТФ в сыворотке крови.
- Уровень панкреатических ферментов (амилазы, липазы, трипсина) в отдельных случаях может повышаться в 1,5—2 раза.
- При наличии злокачественной опухоли ПЖ как с метастазами, так и без них, отмечается резкое возрастание уровня онкомаркера СА 19—9. Кроме этого, проводят исследование и других маркеров опухоли — карциноэмбрионального антигена (встречается у половины больных) и  $\alpha$ -фетопротеина. Обнаружение трех маркеров опухоли ПЖ свидетельствует о неблагоприятном прогнозе болезни.
- Эндокринные опухоли ПЖ происходят из гормонопродуцирующих элементов железы. Соответственно продуцируемым инкретам эти опухоли получили название: инсулинома, гастринома, глюкагонома, соматостантинома, вилома, серотонинома.

- Таким образом, клинико-лабораторная программа диагностики представленных вариантов ХП поможет врачам в распознавании заболеваний, рациональном построении лечебных мероприятий и в установлении прогноза заболевания.

## Лабораторная методы диагностики *Helicobacter pylori*- ассоциированных заболеваний желудка и двенадцатиперстной кишки

- Гистологический метод - позволяет проводить морфологическую оценку состояния слизистой оболочки желудка.
- Цитологический метод - используются мазки-отпечатки, полученные при эндоскопии из биоптатов. Метод позволяет выявить морфологические особенности строения ядер и цитоплазмы клеток слизистой оболочки желудка. Диагностическая чувствительность цитологического метода составляет 80-90%, специфичность 100%.
- Бактериологический метод – полученные штаммы можно исследовать на предмет устойчивости к антибактериальным препаратам.
- Радионуклеидный метод – это уреазные дыхательные тесты с мочевиной, меченной изотопами.
- Биохимический метод -HP в процессе своей жизнедеятельности продуцирует уреазу, которая накапливается в слизистой оболочке желудка. Для выявления уреазы которая свидетельствует о наличии HP, предложены различные биохимические методы. В диагностические среды, обязательно включающие мочевины и индикатор, помещают гастробиоптат. Если в среде накапливается аммоний – продукт гидролиза мочевины уреазой, pH среды меняется, и индикатор изменяет цвет.

## Серологический метод исследования

- Агрессия НР и колонизация слизистой оболочки желудка вызывает системный иммунный ответ. В результате в крови больного появляются антитела IgA, IgM, IgG против различных бактериальных антигенов.
- Самым широко распространенным серологическим методом диагностики НР является метод ИФА. Метод неинвазивный и косвенный – в крови больного определяют антитела к НР, наиболее ценным является определение уровня IgG- и IgA-антител НР

# Серологический метод исследования

- Современные подходы в диагностике инфекций НР включают методы исследования, которые представляют собой различные модификации ПЦР с обнаружением генетического материала.

# Диагностика целиакии

- Относится к аутоиммунным HLA-ассоциированным заболеваниям, известная как глютен-чувствительная энтеропатия, характеризующаяся поражением тонкого кишечника, диареей, потерей веса и недостаточностью питания. Причиной этих клинических проявлений является гиперчувствительная реакция в ответ на глиадин-белок.

# Диагностика целиакии

- Современные методы серологической диагностики основываются не только на определении антител к глиадину, но и антител к эндомизию, ретикулину, к тканевой трансглутаминазе. Определение IgA и IgG антител имеет диагностическое значение.

**СПАСИБО ЗА ВНИМАНИЕ**

