

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 α -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.

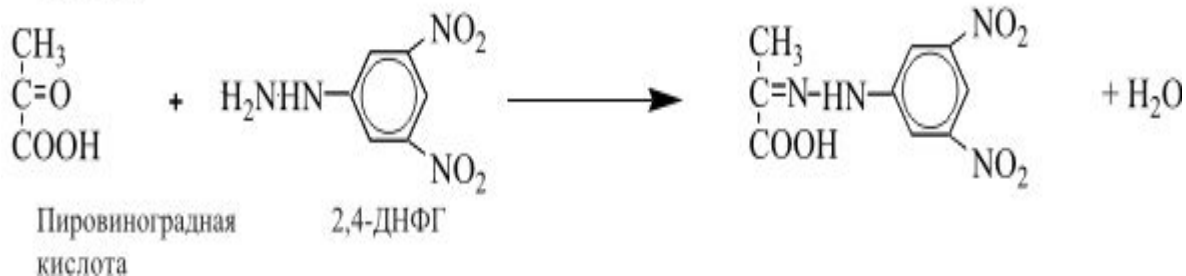
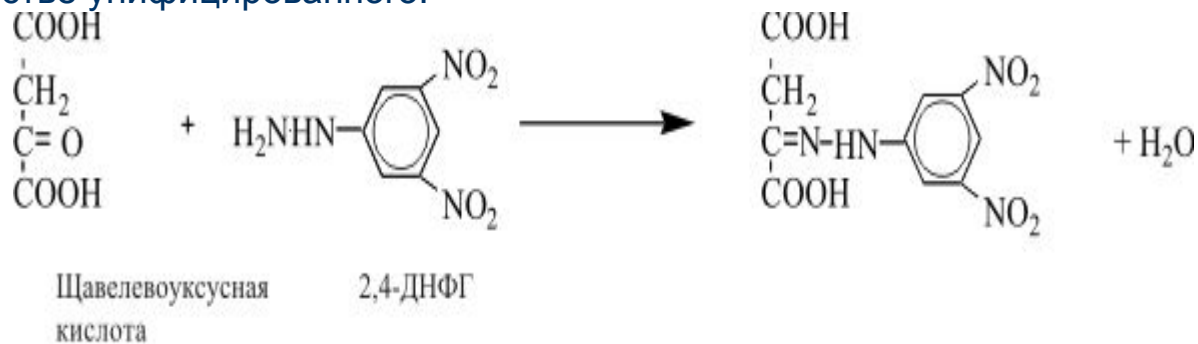
Ткани	АсАТ	АлАТ
Сердце	1166	66
Печень	612	358
Головной мозг (кора)	1230	8
Скелетная мышца	357	33
Почка		
корковый слой	192	37
мозговой слой	173	15
Поджелудочная железа	86	20
Лимфатические узлы	148	3,7
Легкое	18	5
Клетки крови	Ед/ 10 ¹¹ клеток	
Эритроциты	7,4	2,0
Гранулоциты	243 ± 27	75 ± 12
Лимфоциты	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 НАДН₂ 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 (α -билирубин), моноглюкуронид (β -билирубин) и диглюкуронид билирубина (γ -билирубин). Кроме того, был обнаружен билирубин, прочно связанный с белком (δ -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. δ -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 β -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 α -нафтилфосфат в качестве субстрата. Об активности фермента судили по скорости высвобождения α -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 α -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.
- Повышении 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 α -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, винома, 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

