**Лабораторные методы исследования пигментного обмена**

Печень среди внутренних органов занимает особое положение: она обеспе-

чивает метаболический гомеостаз организма. Печеночные клетки (гепатоциты) выполняют чрезвычайно важные функции, в частности, участвуют в биосинтезе многочисленных белков (белковообразовательная функция), в обеспечении различных органов и тканей энергетическими субстратами (высшими жирными кислотами, глюкозой, кетоновыми телами), осуществляют обезвреживающую функцию.

В организме в процессе метаболизма образуются многочисленные промежуточные и конечные продукты, обладающие токсическим действием. Кроме того, в организм извне с пищей, водой, воздухом поступают различные токсические вещества. Их эффективное обезвреживание и удаление из организма обеспечивает нормальное функционирование различных систем, органов и тканей.

Обезвреживание токсических эндогенных и экзогенных веществ происходит почти во всех органах и тканях, однако, наибольшую роль в этих процессах играет печень.

***Обезвреживанием*** называют различные по химическим механизмам ферментативные процессы превращения ядовитых соединений в продукты,лишенные токсичности или обладающие меньшей токсичностью и удаляемые из организма тем или иным путем.

**Токсинами или ядами** являются различные по химической природе и происхождению вещества, способные в определенных концентрациях повреждать различные структуры клеток, вызывая в них обратимые или необратимые изменения функций. Клеточными структурами, с которыми взаимодействуют токсины, могут быть различные белки, в том числе и ферментные, транспортные, рецепторные, клеточные мембраны и т.д.

Механизмы обезвреживания различных по строению и свойствам токсических веществ в печени довольно многообразны. Наиболее существенную роль в определении механизма обезвреживания играет, во-первых, химическое строение обезвреживаемых соединений (наличие в молекулах тех или иных функциональных групп), и, во-вторых, физико-химические свойства (полярность, гидрофильность, растворимость в воде и липидах).

Одним из эндогенных токсических веществ,обезвреживание и выведение которого происходит в печени, является конечный продукт метаболического превращения гемсодержащих белков, билирубин. Его синтез и дальнейшие превращения происходят в три фазы: **допеченочную, печеночную и постпеченочную.** Каждая их них характеризуется определенными химическими превращениями в различных органах и тканях.

**Допеченочная фаза** состоит из 2-х стадий: стадии образования из гемоглобина и других гемсодержащих белков в клетках ретикуло-гистиоцитарной системы неконъюгированного билирубина и стадии транспорта кровью билирубина в печень.

***На первой стадии*** гемоглобин под действием гемоксигеназы превращается в вердоглобин путем окислительного разрыва одной метиновой связи в протопорфириновом кольце гема. Вердоглобин, теряя ион железа и связь с белком глобином, превращается в пигмент зеленого цвета биливердин. Последний восстанавливается ферментом биливердинредуктазой в неконъюгированный билирубин – пигмент рубинового цвета (отсюда и название билирубина).

Неконъюгированный билирубин (НБ) полярное гидрофобное соединение из клеток ретикуло-гистиоцитарной системы (макрофагов) поступает в кровоток, но так как он нерастворим в воде, происходит связывание НБ белком крови альбумином. В составе комплекса билирубин-альбумин пигмент становится растворимым в водной среде крови и в таком виде транспортируется в печень (***2-я стадия- транс-порт неконъюгированного*** ***билирубина кровью в гепатоциты***). У здоровых людей концентрация неконъюгированного билирубина в сыворотке крови колеблется от 1,7 до 17 мкмоль/л.

**Печеночная фаза** превращения билирубина состоит из 3-стадий (3,4 и 5 стадии).

***На третьей стадии*** происходит захват неконъюгированного билирубина гепатоцитами и внутриклеточный его транспорт в мембраны эндоплазматической сети. В этом процессе участвует белок, связывающий органические анионы, в том числе билирубин, желчные кислоты, лекарственные вещества и т.д.

***Четвертая стадия*** представляет собой реакцию конъюгации неконъюгированного билирубина ферментом УДФ-глюкуронилтрансферазой, которая осуществляет присоединение к одной молекуле билирубина двух остатков глюкуроновой кислоты. Донором глюкуроновой кислоты в этом процессе является УДФ~глюкуроновая кислота. Продуктом реакции является диглюкуронидбилирубин (конъюгированный билирубин), водорастворимое соединение, выводимое из гепатоцитов в желчные канальцы. Часть конъюгированного билирубина из гепатоцитов поступает в кровь: концентрация конъюгированного билирубина в сыворотке крови у здоровых людей не превышает 4,7 мкмоль/л.

***Пятая стадия*** – секреция конъюгированного билирубина из гепатоцитов в желчные пути. Этот процесс протекает с затратой энергии и нарушения этой стадии могут быть как врожденными, так и приобретенными.

**Постпеченоочная фаза** превращений билирубина представлена одной, шестой стадией – экскрецией конъюгированного билирубина с желчью в кишечник, бактериальным его превращением в продукты, выделяемые с испражнениями и с мочой.

Экскретированный с желчью в кишечник билирубин подвергается бактериальному ферментативному восстановительному превращению вначале в мезобилирубин, затем в мезобилирубиноген (уробилиноген). В подвздошной и толстой кишке часть мезобилирубиногена (уробилиногена) всысывется в кровь и по воротной вене поступает в печень, в которой полностью окисляется до бесцветных дипирролов. Поэтому в норме в общий круг кровообращения и в мочу уробилиноген не поступает. При повреждениях печеночных клеток (острые гепатиты, обострение хронического активного гепатита, активная фаза цирроза печени, метастазы рака в печень) окисление уробилиногена до дипирролов нарушается и тогда он поступает в нижнюю полую вену, далее в общий круг кровообращения и выделяется почками с мочой.

В норме большая часть бесцветных мезобилиногенов, образующихся в толстом кишечнике, восстанавливается до стеркобилиногена (который часто называют уробилином), который окисляется в окрашенный в коричневый цвет стеркобилин и выделяется с испражнениями. Небольшая часть стеркобилиногена всасывается в нижних отделах прямой кишки в систему нижней полой вены и в дальнейшем выводится с мочой (до 4 мг/сут).

Таким образом, в норме моча содержит следы стеркобилиногена (уробилина), но не содержит уробилиноген. ***Появление*** уробилиногена в моче может быть при гемолизе эритроцитов, при котором в кишечник с желчью поступает большое количество билирубина. Это приводит к повышенному образованию уробилиногена, который после всасывания в кровь, не полностью окисляется в печени (перегрузка уробилиногеном) до дипирролов.

**Диагностическое значение определения билирубина и продуктов его превращения в крови и моче**

Биохимическая диагностика заболеваний печени обычно начинается с иссследования пигментного обмена. При высокой концентрации в крови билирубина развивается характерный симптом- желтуха, желтое окрашивание слизистых оболочек и кожи.

Различают **допеченочную, печеночную и постпеченочную желтухи.** По типубилирубина в крови различают **неконъюгированную, конъюгированную и смешанную гипербилирубинемии** или желтухи.

**Допеченочные желтухи** всегда обусловлены неконъюгированной гипербилирубинемией. Они развиваются либо при повышенном гемолизе эритроцитов (гемолитические желтухи), либо при распаде незрелых клеток эритроцитарного ряда в костном мозге вследствие неэффективного эритропоэза (дизэритропоэтические желтухи).

Для допеченочных неконъюгированных желтух характерно увеличение экскреции с калом стеркобилиногена и стеркобилина и отсутствие в моче билирубина. Моча и кал интенсивно окрашены стеркобилином.

**Печеночные желтухи** могут быть вызваны **неконъюгированной, конъюгированной и смешанной гипербилирубинемией.**

**Умеренная неконъюгированная гипербилирубинемия** печеночного типа наблюдается у пациентов вследствие генетически обусловленного дефекта захвата, внутриклеточного транспорта неконъюгированного билирубина гепатоцитами и частичного дефекта конъюгации билирубина из-за снижения активности УДФ-глюкуронилтрансферазы. Этот синдром называется синдромом (болезнью) Жильбера-Мейленграхта. Для него типично умеренное повышение в крови концентрации некоъюгированного билирубина; изменения в моче и кале обычно отсутствуют.

**Значительная неконъюгированная гипербилирубинемия** наблюдается при редкой у взрослых людей желтухе (синдроме) Криглера-Найяра. Это заболевание обусловлено либо полным отсутствием активности УДФ-глюкуронилтрансферазы, либо выраженным дефицитом этого фермента в печеночных клетках. В сыворотке крови при полном отсутствии активности фермента концентрация неконъюгированванного билирубина достигает 350 и выше мкмоль/л, при дефиците фермента- ниже 350 мкмоль/л.

При печеночной неконъюгированной гипербилирубинемии содержание стеркобилиногена и стеркобилина в кале и моче, в отличие от допеченочной неконъюгированной гипербилирубинемии, либо снижено, либо нормальное.

**Конъюгированная гипербилирубинемия** при желтухе печеночного типа наблюдается у больных с внутрипеченочным холестазом (**гепатоканаликулярная желтуха)**. Наиболее часто такая желтуха развивается при хроническом холестатическом гепатите, циррозах печени, первичном билиарном циррозе, холестазе 111 триместра беременности и приеме некоторых лекарственных веществ.

Другой причиной развития конъюгированной гипербилирубинемии является врожденная аномалия секреции конъюгированного билирубина гепатоцитами (синдром Дабина-Джонсона и синдром Ротора).Уровень конъюгированного билирубина в сыворотке крови достигает 30-80 мкмоль/л.Для такой желтухи характерно выделение с мочой билирубина (при отсутствии уробилиногена).

**Смешанные печеночные гипербилирубинемии** развиваются у больных с органическими повреждениями гепатоцитов (**гепатоцелллярные желтухи)** при острых гепатитах, обострениях хронического гепатита, активных циррозах печени. В крови повышается концентрация как неконъюгированного, так и конъюгированного билирубина. Поврежденные печеночные клетки не обеспечивают полного захвата неконъюгированного билирубина крови, его конъюгации, секреции в желчные пути. Это способствует развитию смешанной гипербилирубинемии. Абсорбированный в кишечнике мезобилирубиноген в поврежденных гепатоцитах не подвергается полному окислению, поступает в нижнюю полую вену и, далее, в общий круг кровообращения с выделением почками с мочой. При смешанной печеночной желтухе (гепатоцеллюлярной желтухе, которую часто называют паренхиматозной) развивается билирубинурия, определяющая окраску мочи.

**При постпеченочных (обструктивных)** желтухах, обусловленных механическим препятствием оттоку желчи из общего печеночного или общего желчного протоков, в сыворотке крови повышение общего билирубина в основном происходит за счет конъюгированного билирубина, который в большом количестве выделяется почками с мочой. Моча таких больных приобретает оранжево-зеленый цвет и при встряхивании образует обильную пену из-за содержания в моче кроме билирубина желчных кислот.

Нарушение экскреции билирубина в кишечник вызывает обесцвечивание кала. Уровень стеркобилиногена в моче и кале снижен, при полной обтурации желчных протоков стеркобилиноген (уробилин) в моче не обнаруживается.

**Методы определения билирубина в сыворотке крови**

Тетрапиррольная молекула билирубина под действием соляной кислоты расщепляется на два дипиррольных соединения, которые подвергаются реакции диазотирования диазобензолсульфоновой кислотой с образованием продукта розово-фиолетового диазобилирубина. Интенсивность окраски прямо пропорциональна концентрации билирубина в сыворотке крови. Конъюгированный билирубин реагирует быстро (дает прямую реакцию), неконъюгированный билирубин реагирует с диазореактивом после добавления кофеинового реактива (непрямая реакция).