

**БІОХІМІЧНІ  
МЕТОДИ  
ДОСЛІДЖЕННЯ  
КРОВІ ТВАРИН**

**МІНІСТЕРСТВО АГРАРНОЇ ПОЛІТИКИ УКРАЇНИ**  
**ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ ВЕТЕРИНАРНОЇ МЕДИЦИНИ**  
**ЦЕНТРАЛЬНА ДЕРЖАВНА ЛАБОРАТОРІЯ ВЕТЕРИНАРНОЇ**  
**МЕДИЦИНИ**  
**БІЛОЦЕРКІВСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ АГРАРНИЙ УНІВЕРСИТЕТ**

***ЗАТВЕРДЖЕНО***

*Наказ Державного департаменту  
ветеринарної медицини Міністерства  
аграрної політики України  
№ 115 від 07.10.2004 р.*

*Голова Державного департаменту  
ветеринарної медицини*  
\_\_\_\_\_ **П.І. Вербицький**

**БІОХІМІЧНІ МЕТОДИ**  
**ДОСЛІДЖЕННЯ КРОВІ ТВАРИН**

**МЕТОДИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ**

для лікарів хіміко-токсикологічних відділів державних  
лабораторій ветеринарної медицини України, слухачів  
факультетів підвищення кваліфікації та студентів  
факультету ветеринарної медицини

Київ – 2004

**УДК 619:616-008.8.-074:636 (07)**

Рекомендовано вченою радою Білоцерківського  
державного аграрного університету  
(Протокол № 9 від 11.06.2004 р.)

Укладачі: **В.І. Левченко, Ю.М. Новожицька, В.В. Сахнюк,  
М.Я. Тишківський, В.І. Головаха, В.П. Москаленко,  
Н.В. Вовкотруб, А.В. Розумнюк, О.Ю. Голуб,  
Н.В. Тишківська, Л.Г. Слівінська,  
В.П. Фасоля, І.А. Жила**

**Біохімічні методи дослідження крові тварин:** Методичні рекомендації для лікарів хіміко-токсикологічних відділів державних лабораторій ветеринарної медицини України, слухачів факультетів підвищення кваліфікації та студентів факультету ветеринарної медицини / В.І. Левченко, Ю.М. Новожицька, В.В. Сахнюк та ін. – Київ, 2004. – 104 с.

У методичних рекомендаціях описані біохімічні методи дослідження крові тварин і коротка інтерпретація показників при різних патологічних станах організму.

Рецензенти: доктор ветеринарних наук, професор, член-кореспондент  
УААН, директор Інституту біології тварин УААН  
**В.В. Влізло;**  
кандидат ветеринарних наук, завідувач кафедри фізіології  
та патологічної фізіології Білоцерківського ДАУ  
**В.Л. Тарасевич**

© БДАУ, 2004

---

---

## ВСТУП

На сучасному етапі розвитку гуманної та ветеринарної медицини діагностична інформативність клінічних та патолого-анатомічних показників при багатьох захворюваннях є недостатньою. Тому необхідно глибоко вивчати біохімічні процеси, які забезпечують життєздатність живої матерії, а також її зміни, що відбуваються в ній при патології.

Виявлення кількісного вмісту різних компонентів у біологічних рідинах і тканинах здорових тварин та їх зміни при захворюваннях дозволяє за допомогою лабораторних досліджень провести своєчасну діагностику (навіть за відсутності клінічного прояву хвороби), вивчити патогенез та перевірити ефективність терапевтичних заходів. Крім того, біохімічні дослідження дають змогу контролювати повноцінність годівлі та стан здоров'я тварин. При виявленні змін біохімічних показників на ранніх стадіях їх вдається відновити за допомогою профілактичних та коригуючих заходів, збалансованої годівлі.

Отже, *клінічна біохімія* – це наука, яка вивчає біохімічні процеси при різних хворобах тварин, що сприяє глибокому пізнанню суті та патогенезу хвороби, дає змогу діагностувати ранні стадії розвитку патологічного процесу, науково обґрунтовувати методи лікування хворих і контролювати його ефективність, прогнозувати перебіг і закінчення хвороби.

У методичних рекомендаціях “Біохімічне дослідження крові тварин” наведені уніфіковані методи дослідження, що використовуються в лабораторіях ветеринарної медицини, навчальних і наукових закладів. Оволодіння ними забезпечить можливість ранньої діагностики багатьох захворювань тварин.

## 1. МІЖНАРОДНА СИСТЕМА ОДИНИЦЬ ВИМІРЮВАННЯ

При вивченні явищ і предметів навколишнього середовища часто доводиться вимірювати ті чи інші фізичні величини, які характеризують їх. Значення і роль вимірювань у науці досить чітко сформулював Д.І. Менделєєв: “*Наука починається тоді, коли починають вимірювати*”. Вимірювання відіграють важливу роль як у розвитку науки, так і в техніці. Завдяки їм вдалося зробити надзвичайно важливі відкриття у медицині, біології, фізиці, астрономії, математиці, економіці, психології.

Необхідність проведення різних вимірювань виникла з розвитком людства. Проте, ці вимірювання були досить примітивними (час вимірювали у добах, місяцях, роках; відстань – у кроках, ліктях, днях шляху) і часто залежали від суб’єктивних факторів, зокрема від уважності та вміння людини, що вимірює або спостерігає за явищем.

З розвитком науки, особливо після епохи інквізиції, гостро постало питання щодо введення різних фізичних величин (довжини, швидкості, прискорення, маси, щільності, сили, тиску та ін.) і створення приладів для їх вимірювання. Однак, вибір одиниць та стандартів (еталонів) для вимірювань протягом тривалого історичного періоду був хаотичним, що призвело до появи великої кількості різних одиниць вимірювання однієї величини. Наприклад, у 18 столітті в Європі існувало більше сотні різних футів, близько 50 різних миль (одиниць довжини) та 120 різних фунтів (одиниць вимірювання маси). Не тільки окремі країни, а й провінції в межах однієї держави користувалися різними одиницями.

З розвитком торгівлі, промисловості і науки виникли незручності від наявності множинності та неточності одиниць. Наукові дослідження дозволили сформулювати ідею прив’язаності одиниці довжини та інших величин до постійних явищ природи, подібно до того, як це завжди робилося при виборі одиниць часу. Виникла гостра необхідність створення метричної системи мір, яка б не мала національного характеру, а могла бути прийнята як міжнародна.

Метрична система мір зародилася у Франції в середині 18 століття і базувалася на одиницях довжини – *метр* (довжина однієї десятимільйонної частки четвертої частини земного меридіана) та маси – *кілограм*. Одиниці інших величин були похідними від метра (м) і кілограма (кг).

Поняття про систему одиниць було розширено німецьким математиком К.Гауссом (1832 р.), який за основні одиниці запропонував взяти: одиницю довжини – міліметр, одиницю маси – міліграм, одиницю часу – секунду. Однак, для практичного використання ці величини були незручними.

У 1873 р. Комітет по електричних еталонах Великобританії розробив і запропонував систему одиниць, в основі якої були сантиметр, грам, секунда (система СГС).

У 1901 р. італійський фізик Дж. Джорджі запропонував систему, основними одиницями якої були метр, кілограм, секунда та одиниця електричної енергії (система МКС). Четверта одиниця цієї системи – ампер – була вибрана лише у 1950 р.

У 1919 р. Міжнародне бюро мір і ваги у Франції розробило систему МТС – метр, тонна, секунда.

Необхідність створення єдиної метричної системи одиниць для всіх галузей науки, техніки і господарства не раз обговорювалася на багатьох міжнародних конференціях по вимірах і вазі. Проте світові війни перешкодили цій роботі; вона відновилася лише після другої світової війни.

У 1954 р. X Генеральна конференція по вимірах і вазі ухвалила рішення прийняти наступні основні одиниці: довжини – *метр*; маси – *кілограм*; часу – *секунду*; сили струму – *ампер*; термодинамічної температури – *градус Кельвіна*; сили світла – *свічу*.

У жовтні 1960 року XI Генеральна конференція по вимірах і вазі, в якій взяли участь 32 країни, в остаточному варіанті прийняла нову систему, що отримала назву – Міжнародна (інтернаціональна) система одиниць (SI – Systeme International). З 01.01.1963 р. вона почала впроваджуватися в Україні.

**Міжнародна система одиниць** – це когерентна (погоджена) система одиниць, в основі якої є 7 основних, дві додаткові і ряд похідних одиниць, кількість котрих не обмежена.

Система SI складається з трьох типів одиниць: а) основні; б) похідні; в) додаткові, а також ряду префіксів, за допомогою яких можуть бути утворені десяткові кратні і часткові одиниці.

За основу в SI були вибрані 7 основних одиниць (табл. 1).

Таблиця 1 – Основні одиниці SI

№ п/п	Величина	Назва одиниці	Позначення одиниці
1	Довжина	метр	м
2	Маса	кілограм	кг
3	Час	секунда	с
4	Кількість речовини	моль	моль
5	Термодинамічна одиниця	кельвін	К
6	Сила електричного струму	ампер	А
7	Сила світла	кандела	кд

Перемножуючи основну одиницю на саму себе або поєднуючи дві і більше основних одиниць шляхом простого множення або ділення, можна сформуванати велику кількість одиниць, які відомі як похідні одиниць SI. Наприклад, похідною одиницею об'єму є кубічний метр, молярної концентрації – моль на кубічний метр (табл. 2).

Таблиця 2 – Деякі похідні одиниці SI

Величина	Назва похідної одиниці	Позначення одиниці
Площа	квадратний метр	$m^2$
Об'єм	кубічний метр	$m^3$
Швидкість	метр за секунду	$m/s$ ( $m \times s^{-1}$ )
Молярна концентрація	моль на кубічний метр	$mol/m^3$
Густина	кілограм на кубічний метр	$kg/m^3$

Деяким похідним одиницям SI присвоєні спеціальні назви, більша частина яких – це прізвища учених, які зробили значний внесок в окремі галузі науки. Наприклад, сила вимірюється у герцах (Гц), тиск – у паскалях (Па), енергія – у джоулях (Дж), освітленість – у люксах (Лк), радіоактивність – у беккерелях (Бк).

У багатьох випадках одиниці SI незручні, оскільки вони є або малими, або великими (незручно, наприклад, визначати діаметр еритроцита в метрах). Для усунення цих утруднень SI включає ряд префіксів, за допомогою яких можна утворити десяткові кратні або часткові одиниці SI (табл. 3).

Префікси можна додавати до основних і похідних одиниць SI, а також до одиниць, які допускаються до тимчасового використання. Два префікси до однієї основи додавати не дозволяється. Оскільки одна основна одиниця SI – кілограм – має у своїй назві префікс SI – "кіло", то для утворення кратних і часткових одиниць необхідно використовувати часткову одиницю – грам (0,001 кг), а префікси додавати до цього слова, наприклад, міліграм (мг), мікрограм (мкг), нанограм (нг), пікограм (пг) і т.д.

Таблиця 3 – Префікси SI

Множник	Префікс	Позначення префікса	Множник	Префікс	Позначення префікса
$10^1$	дека-	да	$10^{-1}$	деци-	д
$10^2$	гекто-	г	$10^{-2}$	санти-	с
$10^3$	кіло-	к	$10^{-3}$	мілі-	м
$10^6$	мега-	М	$10^{-6}$	мікро-	мк
$10^9$	гіга-	Г	$10^{-9}$	нано-	н
$10^{12}$	тера-	Т	$10^{-12}$	піко-	п
$10^{15}$	пета-	П	$10^{-15}$	фемто-	ф
$10^{18}$	екса-	Е	$10^{-18}$	атто-	а

У лабораторній практиці концентрацію різних речовин раніше виражали в мікрограмах, міліграмах або грам-процентах. Наприклад, якщо в 100 мл крові міститься 10 г гемоглобіну, то результат має такий вираз: 10 г%, або 10 г /100 мл. У SI концентрація речовини, відносна молекулярна маса (ВММ) якої відома, виражається в моль/м<sup>3</sup>. Це основна одиниця. Окрім неї, ВООЗ допускається використання у знаменнику іншої одиниці об'єму – літра, а в чисельнику – похідні від моля, одержані за допомогою префіксів: мілімоль (ммоль), мікромоль (мкмоль), наномоль (нмоль) і т.д. Для перерахунку масової концентрації в концентрацію речовини числове значення необхідно перемножити на коефіцієнт, наведений у додатку А. Наприклад, кількість кальцію, виражену в одиницях маси (12 мг в 100 мл сироватки крові), необхідно перерахувати в одиниці концентрації (ммоль/л). Перевідний коефіцієнт становить 0,25. Тоді 12 × 0,25 = 3 ммоль/л. Якщо перевідний коефіцієнт невідомий, користуємося формулою:

$$a_{si} = \frac{a \times 10}{M},$$

де  $a$  – результат у мкг, мг або г в 100 мл;  $10$  – коефіцієнт для перерахунку в л;  
 $M$  – відносна молекулярна маса.

Якщо відносна молекулярна маса речовини невідома, то вона виражається в одиницях концентрації маси. В основних одиницях SI вона виражається в кілограмах на метр кубічний (кг/м<sup>3</sup>). ВООЗ допускає використання в чисельнику часткових основної одиниці маси (грам, міліграм, мікрограм і т.д.), а в знаменнику замість м<sup>3</sup> лише один об'єм – літр. Наприклад, кількість білка у сироватці крові раніше виражали так: 8 г% або 8 г/100 мл. У SI величина одержує вираз 80 кг/м<sup>3</sup>, а ВООЗ допускає такий запис: 80 г/л. Подібним чином виражається вміст гемоглобіну (120 г/л, а не 12 г/100 мл чи 12 г%).

Активність ферментів прийнято виражати кількістю перетвореного ним субстрату (утвореного продукту) у перерахунок на 1 г біологічного матеріалу за визначену одиницю часу. Як міжнародна одиниця активності ферменту (Од), прийнята така кількість ферменту, яка в оптимальних умовах каталізує перетворення 1 мкмоль субстрату за 1 хв (1 Од = мкмоль/хв = 16,67 нмоль/с). У перерахунку на 1 г субстрату ця величина виражається таким чином: Од/л = мкмоль/л (додаток Б).

У Міжнародній системі одиниць SI за одиницю активності ферменту прийнято *катал*, який дорівнює кількості ферменту, що перетворює



1 моль субстрату за 1 с (кат = моль/с). У перерахунку на 1 л біологічного матеріалу цю розмірність виражають таким чином: кат/л = моль/с · л.

Співвідношення міжнародної одиниці (Од) і каталу є таким: 1 Од = 16,67 нкат. Частіше необхідно співвідносити такі одиниці, як Од/л і мккат/л; Од/л = мккат/л × 60. Наприклад, активність лужної фосфатази 1,9 мккат/л у міжнародних одиницях буде становити: 1,9 × 60 = 114 Од/л.

Інколи допускається використання позасистемних одиниць. Наприклад, для позначення активності трансфераз методом Райтмана-Френкеля у ммоль/год×л співвідношення з міжнародною одиницею можна виразити наступним чином:

$$\text{Од} / \text{л} = \frac{\text{ммоль} / \text{год} \times \text{л} \times 1000}{60} = \text{ммоль} / \text{год}.$$

Для визначення активності  $\alpha$ -амілази застосовують такий вираз: г/год×л. Результати морфологічного дослідження крові в SI виражаються в об'ємі 1 м<sup>3</sup>, але ВООЗ дозволяє в об'ємі 1 л. Тоді, наприклад, кількість еритроцитів 5 млн/мкл у SI матиме наступний вираз: 5×10<sup>15</sup>/м<sup>3</sup> (5×10<sup>15</sup>·м<sup>3</sup>). Проте, поруч з цим дозволяється наступний запис: 5×10<sup>12</sup>/л (5×10<sup>12</sup> × л<sup>-1</sup>). Можна використовувати префікс – тера (Т): 1 × Т = 10<sup>12</sup>, тоді кількість еритроцитів виражатиметься так: 5×Т/л. Кількість лейкоцитів 5 тис./мкл можна записати в SI як: 5×10<sup>12</sup>/м<sup>3</sup>, або 5 × 10<sup>9</sup>/л, або 5 × Г/л (Г – гіга; Г = 10<sup>9</sup>).

## 2. ДОСЛІДЖЕННЯ БІЛКОВОГО ОБМІНУ

### 2.1. Визначення загального білка в сироватці крові рефрактометричним методом

Вміст загального білка визначають рефрактометрично або біуретовою реакцією, а окремі фракції білка методами: нефелометричним (турбідиметричним), електрофорезом (в поліакриламідному гелі, на папері), імуоелектрофорезом. Залежно від методу, можна визначити від 5 до 130 фракцій білка. При визначенні загального білка в сироватці крові рефрактометром спочатку слід перевірити нульову точку приладу, для чого 1–2 краплі дистильованої води наносять на поліровану поверхню вимірювальної призми. Межі світла й тіні мають знаходитися на візирній лінії і проходити через позначку 1,333 шкали приладу. Потім призму витирають і на неї наносять 1–2 краплі сироватки крові. Межа світла й тіні зміщується. Підводять візирні лінії на цю межу, і за цифро-

ми шкали рефрактометра по таблиці визначають кількість загального білка (додаток В).

*Зниження* вмісту загального білка в сироватці крові – *гіпопротеїнемія* – спостерігається при недостатньому надходженні білків в організм, зниженні секреторної функції шлунка, кишечника, підшлункової залози, порушенні синтезу білка в печінці при її хворобах (гепатит, гепатоз, цироз), при втраті білків із сечею внаслідок захворювань нирок (нефроз, гломерулонефрит), кровотечах, утворенні ексудатів, трансудатів, злоякісних пухлинах та ін.

Таблиця 4 – Уміст загального білка і білкових фракцій у сироватці крові тварин

Вид тварин	Загальний білок, г/л	Білкові фракції, у процентах			
		альбуміни	глобуліни		
			альфа-	бета-	гамма-
Велика рогата худоба	72–86	38–50	12–20	10–16	25–35
Вівці	65–75	40–50	13–20	7–12	20–35
Свині	70–85	35–45	14–20	16–20	17–25
Коні	65–80	35–50	14–18	15–26	15–30
Собаки	62–80	45–58	10–16	20–25	10–14
Кури	43–60	31–35	17–19	11–13	30–35

*Підвищення* вмісту загального білка – *гіперпротеїнемія* – буває рідше. Вона може бути відносною – при згущенні крові внаслідок втрати рідини при зневодненні та абсолютною – при надмірному згодовуванні кормів, багатих на протеїн, при гепатиті, хронічних інфекціях, а також внаслідок появи патологічних білків – парапротеїнів.

## 2.2. Визначення білкових фракцій сироватки крові

Для діагностики різних патологічних процесів важливе значення має визначення білкових фракцій – альбумінів та глобулінів. Порушення оптимального співвідношення між ними називається *диспротеїнемією*. Найбільш вираженою вона буває при ураженні органів, де синтезуються білки.

Частіше зменшується кількість альбумінів (*гіпоальбумінемія*), які виконують важливі функції підтримання колоїдно-осмотичного тиску крові, регуляції водного обміну, зв'язування та транспортування вуглеводів, ліпідів, гормонів, вітамінів, пігментів, мінеральних речовин. *Гіпоальбумінемія* розвивається внаслідок білкового голодування, при

хворобах печінки (гепатит, гепатоз, абсцеси, цироз і пухлини), а також при різних внутрішніх хворобах, коли настає вторинне ураження печінки (пневмонії, кетоз, перикардит, міокардоз, лейкоз, туберкульоз, сальмонелоз, колибактеріоз та ін.). Гіпоальбумінемія є типовою ознакою нефрозів.

*Збільшення* кількості альбумінів буває рідко, в основному при патологічних станах, що супроводжуються зневодненням. При змінах кількості альбумінів порушується їхнє співвідношення з глобулінами (змінюється альбуміно-глобуліновий коефіцієнт, який у здорових тварин коливається у межах від 0,8 до 1).

Кількість *альфа-глобулінів* (білків “гострої фази”) збільшується при гострих запальних процесах (ревматизм, пневмонія, нефрит, артрит) та при загостренні хронічних захворювань. Зменшення кількості альфа-глобулінів спостерігається рідко, найчастіше при тяжких дистрофічних процесах у печінці.

*Збільшення* кількості *бета-глобулінів* спостерігається при хронічних інфекціях, хворобах нирок (нефроз, нефрит), цирозі печінки. До складу фракції бета-глобулінів входить фібриноген, підвищення вмісту якого буває при катаральній бронхопневмонії і крупозній пневмонії, лейкозі, септичному ендокардиті, а зниження – при хворобах печінки.

Основна маса антитіл міститься у фракції гамма-глобулінів (імуноглобулінів), які забезпечують гуморальний захист організму, тому їх кількість у сироватці крові характеризує морфологічну зрілість і функціональну повноцінність імунореактивної системи. Низький рівень імуноглобулінів (*гіпогаммаглобулінемія*) буває у новонароджених, при хронічних кровотечах, ентеритах, нефрозах і захворюваннях, які супроводжуються ураженням імунної системи (міелома, лімфолейкоз, хвороба Гамборо).

*Гіпергаммаглобулінемія* спостерігається при всіх імунологічних реакціях, які супроводжуються посиленням синтезом глобулінів (вакцинації), і зумовлена підвищенням вмісту імуноглобулінів майже всіх класів та неспецифічних антитіл, при багатьох бактеріальних інфекціях (стрепто-, стафіло- і пневмококових), хронічному гепатиті, цирозі печінки, деяких паразитарних хворобах.

### ***2.2.1. Визначення білкових фракцій сироватки крові нефелометричним (турбідиметричним) методом***

*Принцип методу.* Різні білкові фракції сироватки крові осаджуються фосфатними розчинами певної концентрації.

*Обладнання:* фотоелектроколориметр (КФК-2, КФК-3); хімічні пробірки; піпетки на 1, 2, 5 мл; мірні колби на 500 і 100 мл.

*Реактиви:* 1) натрію гідроокис (NaOH), хч, чда;

2) калій фосфорнокислий однозаміщений (KН<sub>2</sub>РO<sub>4</sub>), хч, чда.

*Приготування розчинів.* 1. Основний фосфатний розчин: у 400 мл дистильованої води (мірна колба на 500 мл) розчиняють 33,5 г натрію гідроокису (NaOH). Після охолодження до кімнатної температури в колбу вносять 226,8 г калію фосфорнокислого однозаміщеного (KН<sub>2</sub>РO<sub>4</sub>), перемішують до повного його розчинення і доводять дистильованою водою до об'єму 500 мл.

2. Робочі фосфатні розчини готують із основного – в мірні колби на 100 мл відбирають основного розчину: 92,4 мл (№ 1), 74,9 (№ 2), 58,8 (№ 3), 48,7 мл (№ 4) і доводять дистильованою водою до мітки.

*Хід визначення.* На кожну пробу сироватки крові у штатив ставлять 6 пробірок, які позначають цифрами 0, 1, 2, 3, 4 і 5. У пробірку № 0 вносять 5 мл дистильованої води, в пробірки № 1, 2, 3, 4 – по 5 мл відповідних робочих фосфатних розчинів, а у пробірку № 5 – 0,5 мл сироватки крові, 0,75 мл дистильованої води та 3,75 мл основного фосфатного розчину (табл. 5). Пробірку № 5 закривають пробкою і перемішують, перевертаючи 5–6 разів. У подальшому з цієї пробірки переносять по 0,5 мл суміші у пробірки № 4, 3, 2, 1 і 0.

Таблиця 5 – Основні етапи виконання роботи

Реактиви, мл	Пробірки					
	0	1	2	3	4	5
Робочі розчини:						
№ 1	–	5	–	–	–	–
№ 2	–	–	5	–	–	–
№ 3	–	–	–	5	–	–
№ 4	–	–	–	–	5	–
Сироватка крові	–	–	–	–	–	0,5
Дистильована вода	5	–	–	–	–	0,75
Основний фосфатний розчин	–	–	–	–	–	3,75

Вміст пробірок ретельно, але обережно перемішують, не допускаючи утворення піни або бульбашок повітря. Через 15 хвилин визначають оптичну густину (E) вмісту пробірок на фотоелектроколориметрі при довжині хвилі 590 нм в кюветі товщиною шару 10 мм у зворотній послідовності проти контролю: спочатку в пробірці № 4, а потім у пробірках № 3, 2 і 1 проти контрольного розчину (пробірка № 0).

Розрахунок проводять за схемою:

1.  $E$  пробірки № 1 –  $E$  пробірки № 2 =  $E$  альбумінів;

2.  $E$  пробірки № 2 –  $E$  пробірки № 3 =  $E$  альфа-глобулінів;

3.  $E$  пробірки № 3 –  $E$  пробірки № 4 =  $E$  бета-глобулінів;

4.  $E$  пробірки № 4 =  $E$  гамма-глобулінів.

Приймаючи суму  $E$  альбумінів і  $E$  всіх глобулінових фракцій за 100 %, вираховують вміст кожної фракції крові у відносних величинах (процентах). Знаючи концентрацію загального білка в сироватці крові, можна провести перерахунок білкових фракцій в абсолютні величини (г/л).

*Наприклад:*  $E$  пробірки 1 = 0,800;  $E$  пробірки 2 = 0,400;  $E$  пробірки 3 = 0,300;  $E$  пробірки 4 = 0,200. Тоді  $E$  альбумінів дорівнює  $0,800 - 0,400 = 0,400$ ;  $E$  альфа-глобулінів дорівнює  $0,400 - 0,300 = 0,100$ ;  $E$  бета-глобулінів дорівнює  $0,300 - 0,200 = 0,100$ ;  $E$  гамма-глобулінів =  $0,200$ . Сума оптичної густини ( $E$ ) становить:  $0,400 + 0,100 + 0,100 + 0,200 = 0,800$ . Відносний вміст альбумінів становить:  $0,800 - 100$  %;  $0,400 - x$  %;  $x = 50$  %; альфа-глобулінів –  $0,100 \times 0,100 : 0,800 = 12,5$  %; бета-глобулінів –  $0,100 \times 0,100 : 0,800 = 12,5$  %; гамма-глобулінів –  $0,200 \times 0,100 : 0,800 = 25$  %.

Похибка методу  $\pm 4$  %.

### 2.3. Визначення загальної кількості імуноглобулінів

Білки, що мають молекулярну будову, яка типова для антитіл, незалежно від їхньої біохімічної та фізико-хімічної структури, називаються *імуноглобулінами* (Ig). Вони є носіями основної маси антитіл, тобто речовин, які виконують функцію захисту тварин від вірусів, бактерій, паразитів і генетично чужорідних елементів (білки, еритроцити, тканини). Імуноглобуліни синтезуються плазматичними клітинами, що трансформуються з В-лімфоцитів. Поділяються вони на п'ять класів: Ig A, Ig M, Ig G, Ig E, Ig D. Ig G – мають властивості повних антитіл; Ig M – беруть участь у первинній імунній відповіді; Ig A – забезпечують локальний захист від інфекцій у різних секретах (слиз, слюзи та ін.); Ig E – відіграють важливу роль у розвитку алергічних реакцій.

Захист новонародженого приплоду сільськогосподарських тварин від несприятливих факторів зовнішнього середовища в перші дні життя забезпечується за рахунок імуноглобулінів, що надходять в організм з молозивом (пасивний, колостральний імунітет), тому їх у сироватці крові до випоювання його мало (до 4 г/л). У сироватці крові дводенних телят має бути не менше 18 г/л імуноглобулінів (оптимальна величина – більше 20 г/л). Оскільки у сільськогосподарських тварин імуноглобуліни не проходять через плаценту, а надходять з

молозивом, то у підтриманні їхнього рівня важливе значення має кількість Ig у молозиві, а їх уміст залежить від віку, годівлі та утримання самок. У молозиві самок старшого віку міститься значно більше імуноглобулінів, ніж у молодих, що позначається на стійкості новонароджених проти захворювань. Імуноглобуліни молозива всмоктуються з кишечника в лімфатичні судини у незміненому вигляді протягом 24–36 год, зокрема: Ig G – 27 год, Ig M – 16, Ig A – 22 год після народження. Проте, у більшості телят абсорбція Ig закінчується через 12–20 год, у деяких – через 6 год. Тому раннє (не пізніше однієї години після народження) згодовування молозива новонародженим є запорукою стабільного колострального імунітету.

У кролів, лабораторних гризунів, собак і котів імуноглобуліни від матері передаються потомству через плаценту та молозиво, у приматів – через плаценту.

### ***2.3.1. Визначення загальної кількості імуноглобулінів у сироватці крові***

*Принцип методу.* При взаємодії сироватки крові, яка містить імуноглобуліни, з розчином натрію сульфату (цинку сульфату) змінюється структура білкових молекул і розчин мутніє, а інтенсивність помутніння пропорційна концентрації Ig.

*Обладнання:* КФК-2 або КФК-3, пробірки, піпетки на 0,1 мл і 5 мл, кювети 5 мм.

*Реактиви:* натрій сірчистоокислий безводний ( $\text{Na}_2\text{SO}_3$ ), ч.

*Хід визначення.* У дві пробірки вносять по 3,8 мл 18 %-ного розчину натрію сульфату і додають по 0,1 мл дослідної сироватки крові. Через 10–15 хв вміст пробірок фотометрують на КФК-2 або КФК-3 при довжині хвилі  $400 \pm 5$  нм у кюветі з робочою товщиною 5 мм. Контролем є 18 %-ний розчин натрію сульфату.

Із отриманих показників оптичної густини двох пробірок визначають середній і результат записують згідно з калібрувальною таблицею (табл. 6). Якщо оптична густина розчину вища за 1,3–1,5, то сироватку крові необхідно розвести ізотонічним розчином натрію хлориду в 2 рази і повторити вимірювання.

Для побудови калібрувальної кривої використовують стандартну сироватку тварин або людини, в якій заздалегідь відома сумарна кількість імуноглобулінів. Можна також використовувати таблицю М.О. Костини (1983; табл. 6).

Таблиця 6 – **Визначення загальної кількості імуноглобулінів у сироватці крові та молозиві**

Оптична густина	Вміст Ig, мг/мл	Оптична густина	Вміст Ig, мг/мл	Оптична густина	Вміст Ig, мг/мл
0,1	2,28	0,185	4,61	0,80	17,8
0,11	2,60	0,19	4,72	0,85	19,0
0,12	2,92	0,195	4,83	0,90	20,2
0,125	3,03	0,20	4,94	0,95	21,2
0,13	3,14	0,25	5,80	1,0	22,3
0,135	3,37	0,30	6,80	1,05	23,4
0,14	3,60	0,35	8,00	1,1	24,6
0,145	3,70	0,40	9,00	1,15	25,8
0,15	3,80	0,45	10,00	1,2	26,8
0,155	3,93	0,5	11,4	1,25	28,0
0,16	4,06	0,55	12,4	1,3	29,0
0,165	4,17	0,6	13,6	1,35	30,1
0,17	4,28	0,65	14,6	1,4	31,2
0,175	4,39	0,70	15,8	1,45	32,3
0,180	4,50	0,75	16,8	1,5	33,4

### **2.3.2. *Визначення загальної кількості імуноглобулінів у молозиві***

Молозиво знежирюють за допомогою центрифугування при 3000 об/хв протягом 30 хв. Пробірку з молозивом ставлять у морозильну камеру холодильника на 20–30 хв, після чого молозивний жир видаляють з пробірки дротяною петлею.

Знежирене молозиво розводять у 2–4 рази дистильованою водою і додають до нього по краплях 10 %-ний розчин оцтової кислоти до повного згортання казеїну. Отриману суміш фільтрують через паперовий фільтр або центрифугують при 3000 об/хв протягом 5–10 хв і сироватку використовують для дослідження за вищезгаданою методикою. Кінцеві результати множать на ступінь розведення молозива. Молозиво високої якості містить Ig більше 60 г/л.

### **2.4. Колоїдно-осадові проби**

Для оцінки функції печінки та інших патологічних станів організму широко використовуються колоїдно-осадові (коагуляційні) проби, за допомогою яких діагностують зміни у складі білків сироватки крові (диспротеїнемію).

В основі осадових проб лежить взаємодія глобулінів із речовинами-осадниками. Коагуляційні реакції неспецифічні, однак вони допомагають встановити ступінь порушення співвідношення між глобулінами та альбумінами сироватки крові.

#### **2.4.1. Сулемова проба (за Грінстедом)**

*Принцип методу.* Сулема в присутності дрібнодисперсних колоїдів (білків) утворює колоїдний розчин солей ртуті. Порушення дисперсності білкових фракцій сироватки крові призводить до осадження грубодисперсних білків.

*Обладнання:* мікробюретки, стаканчики (пробірки).

*Реактиви:* 1) 0,1 %-ний розчин сулеми, ч, (отримують із кристалічної сулеми);

2) 0,85%-ний розчин натрію хлориду, хч.

*Хід визначення.* У пробірку вносять 0,5 мл свіжої негемолізованої сироватки крові і 1 мл 0,85 %-ного розчину натрію хлориду. За допомогою мікробюретки або піпетки по краплях додають 0,1 %-ний розчин сулеми до появи первинного помутніння, а в подальшому – по краплях (з проміжком 20–30 с) до стійкого помутніння. Результат реакції оцінюють за кількістю витраченого розчину (у мл). Проба є дуже чутливою. В нормі у клінічно здорових корів і нетелей на титрування сироватки крові витрачається не менше 1,6 мл 0,1 %-ного розчину сулеми; у коней і собак – 2,0 мл. Зниження показника спостерігається при гепатодистрофії, гепатиті та цирозі печінки. Чим більше виражені дистрофічні зміни печінки, тим менше витрачається на титрування розчину сулеми. Недоліком є те, що сулема – отруйна речовина (зберігається за списком А).

#### **2.4.2. Проба з розчином міді сульфату (за Постніковим В.С.)**

Осадова проба з розчином міді сульфату є показовою не тільки в якісному відношенні, але й у кількісному (за кількістю витраченого розчину).

*Обладнання:* мікробюретки, пробірки.

*Реактиви:* 1 %-ний розчин міді сульфату, чда (основний); робочий розчин міді сульфату (у мірній колбі на 100 мл у дистильованій воді розчиняють 0,5 г натрію сульфату (ч, чда), додають 7 мл 1 %-ного розчину міді сульфату і загальний об'єм доводять дистильованою водою до мітки).

*Хід визначення.* У пробірку вносять 1 мл свіжої сироватки крові. Краплями з бюретки додають робочий розчин міді сульфату до появи по-



мутніння, яке не зникає при перемішуванні. Для стійкого помутніння сироватки крові великої рогатої худоби необхідно від 2,1 до 2,3 мл робочого розчину; результати проби вважаються негативними. У тварин з порушеною білоксинтезувальною функцією печінки результати оцінюються за наступним критерієм: якщо стійке помутніння сироватки крові настає при додаванні від 1,86 до 2,08 мл реактиву – проба слабопозитивна (+), від 1,76 до 1,85 мл – позитивна (++) , 1,75 мл реактиву і менше – різко позитивна (+++).

#### **2.4.3. Формолова проба**

Суть проби полягає у желатинуванні білків сироватки крові при підвищенні вмісту глобулінів (особливо гамма-глобулінів) та фібриногену після взаємодії з формаліном.

*Обладнання:* пробірки, піпетки, гумові пробки.

*Реактиви:* 40 %-ний розчин формальдегіду.

*Хід визначення.* У пробірку вносять 1 мл свіжої сироватки крові і додають 2–3 краплі формальдегіду. Суміш перемішують, пробірки закривають гумовими пробками і залишають при кімнатній температурі на 24 год. Проба вважається негативною, якщо за цей час згусток не утворюється. Утворення незначного згустку – проба сумнівна (+); щільний згусток без зміни кольору – проба слабопозитивна (++) ; опалесцентне забарвлення та щільний згусток – реакція позитивна (+++) ; інтенсивне молочно-біле забарвлення та щільний згусток – реакція різкопозитивна (++++).

#### **2.4.4. Проба Вельтмана (в модифікації Тейфля)**

*Принцип методу.* При додаванні до сироватки крові розчину кальцію хлориду в нагрітому стані відбувається порушення колоїдної стабільності білків.

*Обладнання:* спиртівка, мірні колби, пробірки, піпетки на 0,1; 0,2 і 5 мл.

*Реактиви:* Приготування 0,5 %-ного розчину кальцію хлориду з ампульного 10%-ного розчину: якщо щільність ампульного розчину 1,040, то для одержання 0,5 %-ного розчину ампульний розводять у 10 разів.

*Хід визначення:* у пробірці змішують 0,1 мл сироватки крові з 4,9 мл води, перемішують і додають 0,1 мл 0,5 %-ного розчину кальцію хлориду. Вміст пробірки струшують і нагрівають до кипіння. Пробірку охолоджують і розглядають проти світла. При відсутності пластівців у пробірці додають ще 0,1 мл 0,5 %-ного розчину кальцію хлориду і знову доводять до кипіння. Процедуру повторюють до появи пластівців у пробірці.

*Діагностичне значення.* Результати реакції оцінюють за кількістю витраченого 0,5%-ного розчину кальцію хлориду. В нормі коагуляція білків сироватки крові настає при додаванні 0,4–0,5 мл розчину кальцію хлориду. Якщо на дослідження витрачається менше 0,4 мл розчину кальцію хлориду – це свідчить про розвиток гепатодистрофії, цирозу печінки, хронічної пневмонії чи туберкульозу легень.

Витрачання на титрування більше 0,5 мл розчину хлористого кальцію зумовлено підвищенням у сироватці крові вмісту  $\alpha_1$ - та  $\alpha_2$ -глобулінів і спостерігається при захворюваннях, що супроводжуються розвитком гострих запальних процесів (нефрити, пневмонія, туберкульоз легень, перитоніт, гострі інфекційні захворювання, злоякісні пухлини тощо).

*Примітка.* Сироватка крові має бути негемолізованою і зберігатися не більше 24 год від взяття крові.

#### **2.4.5. Коагуляційна стрічка Вельтмана**

*Принцип методу.* Проба ґрунтується на використанні 11 розведень (у пробірках) розчину кальцію хлориду ( $\text{CaCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ ) наступних концентрацій (г/л): у 1-й пробірці – 1,0; у 2-й – 0,9; у 3-й – 0,8; у 4-й – 0,7; у 5-й – 0,6; у 6-й – 0,5; у 7-й – 0,4; у проміжній між 7-ю та 8-ю ( $7^{1/2}$ ) – 0,35; у 8-й – 0,3; у 9-й – 0,2; у 10-й – 0,1.

*Хід визначення.* В кожену пробірку вносять 0,1 мл сироватки крові і 5,0 мл розчину кальцію хлориду відповідної концентрації. Пробірки поміщають в киплячу водяну баню на 15 хв, після чого визначають кількість тих, в яких утворилися пластівці й осад (флокуляція).

При дослідженні сироватки крові клінічно здорових людей у 6–7-й пробірках із 11-ти спостерігається флокуляція, тобто коагуляційна стрічка починається з 1-ї пробірки і закінчується 6–7-ю.

#### **2.4.6. Цинк-сульфатна проба**

*Принцип методу.* Цинку сульфат у буферному розчині осаджує гамма-глобуліни сироватки крові. Інтенсивність помутніння пропорційна вмісту гамма-глобулінів, які визначають турбідиметрично.

*Обладнання:* фотоелектроколориметр (КФК-2, КФК-3) або спектрофотометр; пробірки; піпетки на 1, 5 і 10 мл, мірні колби на 50 і 250 мл.

*Реактиви:* 1) буферний розчин – 20 мл;

2) цинк сірчаноокислий 7-водний, ч – 7 мл;

3) калібрувальний розчин I – 11 мл;

4) калібрувальний розчин II (барію хлорид, 48 ммоль/л) – 5 мл.

*Використовують набори реактивів НВФ "Simko Ltd" (м. Львів).*

*Приготування цинк-сульфатного реактиву.* У мірну колбу ємністю 1 л вносять реактив 1; 900 мл дистильованої води і піпеткою відмірюють 5 мл реактиву 2. Доводять дистильованою водою до мітки і перемішують. Реактив стабільний кілька місяців.

*Приготування контрольного розчину I.* У мірну колбу на 250 мл піпеткою відмірюють 10 мл реактиву 3, доводять до мітки охолодженою дистильованою водою (+8°C) і перемішують.

*Приготування контрольного розчину II.* У мірну колбу на 50 мл піпеткою відмірюють 1,5 мл реактиву 4, доливають до мітки контрольним розчином I, охолодженням до +10 °С. Вміст колби ретельно перемішують.

Похибка методу:  $\pm 8 \%$ .

*Хід визначення.* Визначення проводять на фотоелектроколориметрі або на спектрофотометрі (довжина хвилі 620–660 нм) у кюветі з товщиною оптичного шару 10 мм згідно зі схемою, наведеною у табл. 7.

Таблиця 7 – Схема проведення цинк-сульфатної проби

Речовина	Дослідна проба	Контрольний розчин I	Контрольний розчин II
Сироватка крові	0,05	–	0,05
Цинк-сульфатний реактив	3,00	3,00	–
0,85 %-ний розчин NaCl	–	0,05	3,00

Після внесення реактивів пробірки витримують 30 хв при кімнатній температурі (18–25 °С). Потім знову перемішують і вимірюють оптичну густину дослідної проби (А), проти контрольного розчину I. Гемолізовані та мутні сироватки крові вимірюють проти контрольного розчину II. Величини помутніння вираховують за калібрувальним графіком.

*Калібрування.* Шляхом розведення контрольних розчинів I і II готують шкалу розведених стандартів відповідних (5–20) одиниць по Shank-Hoagland (од. S-H) (табл. 8).

Таблиця 8 – Схема побудови калібрувального графіка

№ розчину	Контрольний розчин I	Контрольний розчин II	Одиниці помутніння S-H
1	4,5	1,5	5
2	3,0	3,0	10
3	1,5	4,5	15
4	–	6,0	20

У пробірках змішують контрольний розчин I з контрольним розчином II і витримують точно 30 хв. Уміст пробірок ретельно перемішують і вимірюють поглинання проти дистильованої води. Довжина хвилі 620–660 нм.

**Примітка.** Якщо помутніння перевищує 20 од. S-H, аналіз повторюють з пробою, розведеною ізотонічним розчином натрію хлориду 1:1 (результат необхідно помножити на 2). Реактив № 3 містить сірчану кислоту. Реактив № 4 містить отруйний барію хлорид.

#### 2.4.7. Тимолова проба

**Принцип методу.** Бета- і гамма-глобуліни та ліпопротеїни сироватки крові осаджуються тимоловим реактивом при рН 7,55. Залежно від концентрації і співвідношення окремих білкових фракцій під час реакції виникає помутніння розчину, інтенсивність якого визначають турбідиметрично.

**Обладнання:** фотоелектроколориметр (КФК-2, КФК-3) або спектрофотометр; пробірки; піпетки на 1, 5 і 10 мл.

**Реактиви:** 1) концентрований розчин тимолу (тимол 6,66 ммоль/л у буфері) – 8,5 мл;

2) калібрувальний розчин I (сірчана кислота – 2,5 моль/л, хч, чда) – 11 мл;

3) калібрувальний розчин II (барію хлорид – 48 ммоль/л, хч) – 5 мл.

Використовують набір реактивів НВФ "Simko Ltd" (м. Львів).

**Приготування тимолового реактиву.** У мірну колбу на 1 л наливають 900 мл дистильованої води і при постійному перемішуванні на магнітній мішалці поступово додають піпеткою 15 мл реактиву 1. Кінчик піпетки обов'язково повинен бути опущений у воду. Розчин доливають дистильованою водою до мітки і перемішують 10 хв. Тимоловий реактив зберігають при кімнатній температурі. Розчин стабільний декілька місяців.

**Приготування контрольного розчину I.** У мірну колбу на 250 мл піпеткою відмірюють 10 мл реактиву 2, доливають до мітки дистильованою водою, охолодженою до +8°C, і перемішують.

**Приготування контрольного розчину II.** У мірну колбу на 50 мл піпеткою відмірюють 1,5 мл реактиву 3, доливають до мітки контрольним розчином I, охолодженим точно до +10°C. Вміст колби ретельно перемішують.

Похибка методу:  $\pm 8\%$ .

*Хід визначення.* Визначення проводять на фотоелектроколориметрі або на спектрофотометрі (довжина хвилі 620–660 нм) у кюветі з товщиною оптичного шару 10 мм згідно зі схемою, наведеною у табл. 9.

Таблиця 9 – Схема проведення тимолової проби

Речовина	Дослідна проба	Контрольний розчин I	Контрольний розчин II
Сироватка крові	0,05	–	0,05
Тимоловий реактив	3,00	3,00	–
0,85 %-ний розчин NaCl	–	0,05	3,00
Після внесення реактивів пробірки витримати 30 хв при кімнатній температурі. Знову перемішати і виміряти оптичну густину дослідної проби (А), проти контрольного розчину I. Якщо сироватка крові мутна, то вимірюють проти контрольного розчину II.			

*Калібрування.* Шляхом розведення контрольних розчинів I і II готують шкалу розведених стандартів відповідних одиниць (5–20) за Shank-Hoagland (од. S-H) (табл. 10).

Таблиця 10 – Схема побудови калібрувального графіка

№ розчину	Контрольний розчин I	Контрольний розчин II	Одиниці помутніння S-H
1	4,5	1,5	5
2	3,0	3,0	10
3	1,5	4,5	15
4	–	6,0	20
У пробірках змішують контрольний розчин I із контрольним розчином II і точно через 30 хв вміст пробірок ретельно перемішують. Після чого вимірюють оптичну густину проти дистильованої води. Довжина хвилі 620–660 нм.			

*Діагностичне значення.* У клінічно здорових тварин (великої і дрібної рогатої худоби, коней і собак) значення проби становлять 0–3 од. помутніння (од. S-H). Збільшення помутніння понад 3,0 од. S-H свідчить про ураження паренхіми печінки ("синдром запалення"), яке частіше виявляють у коней і собак (рідше у полігастричних тварин) при токсичних та інфекційних гепатитах, цирозі печінки.

Пробу можна використовувати для диференціальної діагностики механічної і паренхіматозної жовтяниць. Так, при механічній жовтяниці значення од. S-H не перевищують верхньої межі норми, а проба стає позитивною при ускладненні патологічного процесу паренхіматозним гепатитом.

Тимолова проба є неспецифічною для печінки, її показники зростають при всіх захворюваннях, що супроводжуються диспротейнемією.

*Примітка.* Якщо помутніння перевищує 20 од. S-H, аналіз повторюють, попередньо розвівши пробу ізотонічним розчином NaCl (1:1). Результат необхідно помножити на 2.

## 2.5. Залишковий азот

У живому організмі одночасно з процесом біосинтезу білка (асиміляція) відбувається протилежний процес – розщеплення білків (дисиміляція), який значно посилюється при розвитку патологічних явищ. Кінцевими результатами метаболізму білка є сечовина, креатин, креатинін, сечова кислота, аміак, індикан, глутамін, окремі амінокислоти, які складають фракцію так званих небілкових азотистих компонентів крові. Азот перерахованих азотовмісних речовин називається *залишковим азотом* крові (ЗА). Така назва зумовлена тим, що згадана фракція компонентів крові належить до азотистих речовин, які залишаються в плазмі крові після додавання до неї трихлороцтової кислоти і випадання білка в осад. Найбільш вагомою складовою частиною є азот сечовини, який у нормі становить близько 50 % усього ЗА (якщо розрахунок виконують у мг в 100 мл сироватки крові).

*Сечовина* є кінцевим продуктом обміну білків, основним складником ЗА крові у ссавців. Вона становить 80–90 % усіх азотистих речовин сечі. За добу із сечею людини виділяється 25–35 г сечовини. Сечовина ( $\text{NH}_2\text{-CO-NH}_2$ ) утворюється здебільшого в орнітиновому циклі в печінці та частково – у нирках (цикл Кребса-Хенселяйта).

### 2.5.1. Колориметричний метод визначення залишкового азоту в сироватці крові

*Принцип методу.* Досліджувану речовину спалюють у пробірці в присутності сірчаної кислоти, після чого додають реактив Неслера, який утворює з аміаком жовте забарвлення, інтенсивність якого порівнюють зі стандартом.

*Обладнання:* КФК-2, КФК-3, центрифуга, пробірки, піпетки, скляні палички.

- Реактиви:*
- 1) 20 %-ний розчин трихлороцтової кислоти (ТХОК), ч;
  - 2) концентрована сірчана кислота, чда, хч;
  - 3) 50 %-ний розчин водню перекису;
  - 4) 50 %-ний розчин натрію гідроокису, чда;
  - 5) реактив Неслера, чда;
  - 6) амоній сірчаноокислий, хч.

*Хід визначення.* У центрифужну пробірку вносять 0,6 мл 20 %-ного розчину ТХОК, 2,2 мл дистильованої води та 0,2 мл сироватки крові. Суміш ретельно перемішують скляною паличкою, центрифугують при 3000 об 5–10 хв. Відбирають у високі лабораторні пробірки

1 мл прозорого безбілкового фільтрату, додають 3 краплі концентрованої сірчаної кислоти і 3 краплі пергідролу. Одночасно готують контрольний розчин (у високу пробірку вносять 3 краплі концентрованої сірчаної кислоти і 3 краплі пергідролу). Після цього всі пробірки поміщають у нагріту пісочну баню на 60–70 хв до повного спалювання вмісту: у пробірках має залишитися лише одна крапля рідини. Пробірки виймають, охолоджують на повітрі і додають по 10 мл дистильованої води, 4 краплі 50 %-ного розчину натрію гідроокису і 0,5 мл реактиву Неслера. Вміст дослідних пробірок забарвлюється в жовтий колір. Контроль має бліде забарвлення. Через 5 хв проби колориметрують при довжині хвилі 470 нм проти контролю в кюветі завширшки 10 мм.

За показниками приладу і калібрувальною кривою знаходять кількість залишкового азоту в досліджуваній пробі.

Розрахунок кількості залишкового азоту в пробі проводять за формулою:

$$X = \frac{A \times 3 \times 5 \times 100}{1000} = \text{мг залишкового азоту в 100 мл сироватки крові,}$$

де  $A$  – знайдена за калібрувальною кривою кількість азоту в досліджуваній пробі (1 мл фільтрату). Для переведення в ммоль/л необхідно одержаний результат поділити на коефіцієнт 1,4.

*Побудова калібрувальної кривої.* Готують ряд розведень амонію сірчаноокислого від 10 до 100 мкг азоту в 10 мл (табл. 11). До кожного розведення додають 4 краплі 50 %-ного розчину натрію гідроокису і 0,5 мл реактиву Неслера.

Таблиця 11 – Схема побудови калібрувального графіку

Розчин	Контроль	Пробірки				
		1	2	3	4	5
Стандартний розчин (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>3</sub> , мл	–	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0
Дистильована вода, мл	10	9,8	9,6	9,4	9,2	9,0
50 %-ний розчин NaOH, краплі	4	4	4	4	4	4
Реактив Неслера, мл	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5

### 2.5.2. Визначення сечовини в сироватці крові (за колірною реакцією з діацетилмонооксидом)

**Принцип методу.** Діацетилмонооксид у кислому середовищі гідролізується до діацетилу, який, реагуючи з сечовиною, утворює комплекс червоно-рожевого забарвлення, що має максимальне поглинання при довжині хвилі 520 нм.

**Обладнання:** КФК-2, КФК-3, водяна баня, гумові пробки, обгорнуті фольгою, пробірки, піпетки 0,2; 1 і 5 мл.

**Реактиви:** 1) кислий реагент – 0,06 %-ний розчин  $H_3PO_4$ ; 10 %-ний розчин  $H_2SO_4$ ; 0,003 % -ний розчин  $FeCl_3$ ;

2) кольоровий реагент – 0,17 %-ний розчин діацетилмонооксиду (ДАМО) і 0,04%-ний розчин тіосемікарбазиду;

3) стандарт сечовини (16,65 ммоль/л), 1 г/л сечовини.

**Використовують набір реактивів НВФ "Simko Ltd" (м. Львів).**

**Хід визначення.** До 0,02 мл сироватки крові (сечі) додають 1 мл кольорового реагенту і 2 мл кислого реагенту. Пробірки щільно закривають гумовими пробками, які обгорнуті алюмінієвою фольгою, та інкубують точно 10 хв у киплячій водяній бані. Потім пробірки швидко охолоджують під струменем холодної води і не пізніше як через 10 хв визначають оптичну густину досліджуваних зразків та стандарту при довжині хвилі 490–540 нм (максимальне поглинання при 520 нм) проти контролю. Аналогічно обробляють 0,02 мл стандарту сечовини і контроль – 0,02 мл дистильованої води. Розрахунок проводять за формулою:

$$\text{сечовина (ммоль/л)} = 16,65 \times \frac{E_{дп}}{E_{ст}}$$

де  $E_{дп}$  – екстинція дослідної проби;  $E_{ст}$  – екстинція стандартного розчину; 16,65 – концентрація сечовини в стандартному розчині, ммоль/л.

**Приклад.** Поглинання дослідної проби – 0,350.

Поглинання стандарту (16,65 ммоль/л) – 0,640.

Концентрація сечовини в досліджуваній пробі буде становити:

$$16,65 \times \frac{0,350}{0,640} = (16,65 \times 0,350) : 0,640 = 9,1 \text{ ммоль/л.}$$

При вмісті сечовини більше 25 ммоль/л пробу необхідно розбавити дистильованою водою і аналіз провести повторно, результат помножити на розведення.

**Стабільність досліджуваних проб.** Сечовина в дослідних пробах зберігається до 8 годин при кімнатній температурі, до 72 годин – при 2–8 °С, до 6 місяців – в замороженому стані.



**Примітка.** Об'єми досліджуваних проб і реагентів можна пропорційно зменшувати чи збільшувати. Наприклад: до 0,01 мл проби (10 мкл) додають 0,5 мл кольорового реагенту і 1 мл кислого реагенту. Обробляють, як написано вище (див. хід визначення). Як альтернативний варіант перед проведенням дослідів можна змішати 1 об'єм кольорового реагенту з 2-ма об'ємами кислого реагенту і використовувати цю суміш для проведення аналізу (0,02 мл проби + 3 мл суміші або 0,01 мл проби + 1,5 мл суміші і т.д.).

### **2.5.3. Визначення сечовини у сироватці крові та сечі (за Марш)**

**Принцип методу.** Сечовина утворює з діацетилмонооксимом у присутності тіосемікарбазиду і заліза в кислому середовищі комплексну сполуку, інтенсивність забарвлення якої пропорційна вмісту сечовини в сироватці крові або сечі.

**Обладнання:** КФК, водяна баня, центрифуга, гумові пробки, обгорнуті фольгою, піпетки 0,2; 1 і 5 мл, пробірки.

**Реактиви:** 1) 10 %-ний розчин трихлороцтової кислоти (ТХОК), ч;

2) 2,5 %-ний розчин діацетилмонооксиму, чда (готують змішуванням 0,25 г реактиву і 9,75 мл дистильованої води);

3) 0,25 %-ний розчин тіосемікарбазиду, чда, (0,25 г реактиву розчиняють у дистильованій воді і доводять водою до мітки 100 мл);

4) основний розчин заліза хлориду готують розчиненням 5 г заліза хлориду (хч, чда) в 100 мл дистильованої води, після чого додають 1 мл концентрованої сірчаної кислоти, хч;

5) робочий розчин заліза хлориду: 1 мл основного розчину заліза хлориду доводять до 100 мл дистильованою водою, додають 8 мл концентрованої сірчаної і 1 мл 85%-ного розчину ортофосфорної кислоти (хч, чда). Зберігають у темному місці до 2-х тижнів;

6) кольоровий реактив (до 30 мл робочого розчину заліза хлориду додають 20 мл дистильованої води, 1 мл 2,5 %-ного розчину діацетилмонооксиму і 0,25 мл розчину тіосемікарбазиду. Кольоровий реактив готують безпосередньо перед проведенням досліджень;

7) стандартний розчин сечовини (0,5 г еталону розчиняють в 1 л дистильованої води). Еквівалент концентрації – 8,33 ммоль/л.

**Хід визначення.** У центрифужну пробірку вносять 0,8 мл дистильованої води, 0,2 мл сироватки крові і 1 мл трихлороцтової кислоти, перемішують і через 10–20 хв центрифугують 15–20 хв при 3000 об/хв. У пробірку відбирають 0,5 мл надосадової рідини і додають 5 мл кольорового реактиву. Пробірку закривають пробкою, обгорнутою фольгою, витримують у киплячій водяній бані точно 20 хв і охолоджують

2–3 хв струменем води з крану. Не пізніше як через 15 хв вимірюють екстинцію проби на КФК при довжині хвилі 500–600 нм проти контролю у кюветі товщиною робочого шару 10 мм. Аналогічно обробляють 0,5 мл стандарту сечовини і контроль – 0,5 мл дистильованої води.

Розрахунок вмісту сечовини проводять за формулою:

$$\text{Сечовина (ммоль/л)} = \frac{E_{\text{дп}}}{E_{\text{ст}}} \times 8,33,$$

де  $E_{\text{дп}}$  – екстинція дослідної проби;  $E_{\text{ст}}$  – екстинція стандартного розчину; 8,33 – концентрація сечовини у стандартному розчині.

Для визначення сечовини у сечі її спочатку фільтрують, потім готують розведення 1:25 або 1:50, відбирають 0,2 мл суміші і визначають за вищеписаною методикою. Результат перемножують на ступінь розведення.

*Діагностичне значення.* У здорової великої рогатої худоби і свиней кількість ЗА в сироватці крові становить 15–29 ммоль/л. Підвищення вмісту залишкового азоту в крові називається *гіперазотемією*. Залежно від причин її поділяють на ретенційну і продуктивну. *Ретенційна* буває *нирковою* (при нефриті і піелонефриті) і *позанирковою*, яка спостерігається внаслідок зменшення клубочкової фільтрації при хворобах серця та зневодненні.

*Продуктивна гіперазотемія* розвивається за рахунок азоту амінокислот внаслідок посиленого руйнування білків в організмі (злякисні новоутворення).

*Гіпоазотемія* зустрічається значно рідше. Причиною її буває значне ураження печінки, внаслідок чого порушується синтез сечовини.

Уміст сечовини в сироватці крові молодяку великої рогатої худоби становить (ммоль/л) 3,0–6,5; корів – 3,5–6,0; свиней – 3,3–6,0; собак – 3,0–8,0; овець – 3,0–6,0; кіз – 4,0–7,0; лошат – 3,0–7,0; коней – 3,5–6,0; кішок – 3,3–11,0. Концентрація сечовини залежить від інтенсивності її синтезу та виведення, тому визначення її є важливим діагностичним тестом як функції печінки, де синтезується сечовина, так і нирок, через які вона виводиться. Частіше зустрічається *підвищення* вмісту сечовини, що свідчить про ураження нирок. При гострій нирковій недостатності рівень сечовини в сироватці крові зростає до 50–80 ммоль/л і навіть більше, а виділення її з сечею різко зменшується. Якщо вміст сечовини сягає 35 ммоль/л, то це вказує на середній ступінь ураження нирок. При хронічному перебігу

гломерулонефриту та в азотемічній стадії нефротичного синдрому вміст сечовини підвищується до 13–15 ммоль/л, а в термінальній стадії хронічної ниркової недостатності – до 30–35 ммоль/л. Кількість азоту сечовини у фракції ЗА збільшується до 90 %.

*Зниження* вмісту сечовини в сироватці крові спостерігається при аліментарному виснаженні, тяжкому перебігу патології печінки. Оскільки вміст ЗА може залишатися в межах норми, то процентне відношення азоту сечовини до ЗА стає менше 45 %, якщо перерахунок робити в мг/100 мл, або 10 % – при розрахунку в ммоль/л. Якщо на фоні підвищення вмісту ЗА кількість сечовини починає зменшуватися, то має місце комбінована патологія нирок і печінки (гепаторенальний синдром).

#### **2.5.4. Визначення сечової кислоти в сироватці крові**

*Принцип методу.* Сечова кислота у лужному середовищі відновлює фосфорно-вольфрамовий реактив у сполуку блакитного кольору, яка вимірюється фотометрично при довжині хвилі 590–700 нм. Метод – лінійний у діапазоні 80–1000 мкмоль/л.

*Обладнання:* КФК-2, КФК-3, спектрофотометр; центрифуга; пробірки центрифужні хімічні; піпетки на 1 і 5 мл.

*Реактиви:* 1) натрій вуглекислий, хч;

2) натрій вольфрамово-кислий, ч;

3) реактив Фоліна (розчин);

4) калібрувальний розчин сечової кислоти (357 мкмоль/л);

5) 0,35 моль/л розчин сірчаної кислоти, ч. Для приготування розчину до 200 мл дистильованої води додають 10 мл концентрованої сірчаної кислоти і доводять об'єм до 500 мл.

*Використовують набір реактивів НВФ “Simko Ltd” (м. Львів).*

*Хід визначення.* До 4 мл дистильованої води додають 0,5 мл сироватки крові, 0,25 мл 0,35 моль/л розчину сірчаної кислоти і перемішують. Потім вносять 0,1 мл розчину натрію вольфрамату, перемішують і центрифугують протягом 20 хв при 1500–3000 об/хв. До 3 мл центрифугату поступово додають 1,5 мл розчину натрію карбонату і 1 мл реактиву Фоліна, перемішують і через 30 хв колориметрують при довжині хвилі 590–700 нм проти контролю у кюветі з товщиною робочого шару 1 см. Контрольну і калібрувальну проби готують аналогічно з 0,5 мл дистильованої води та 0,5 мл калібрувального розчину сечової кислоти. Калібрувальну пробу не центрифугують.

Концентрацію сечової кислоти розраховують за формулою:

$$\text{Сечова кислота (мкмоль/л)} = \frac{E_{\delta}}{E_{\text{кл}}} \times 357,$$

де  $E_{\delta}$  – екстинція дослідної проби;  $E_{\text{кл}}$  – екстинція калібрувальної проби;  
357 – концентрація сечової кислоти в калібрувальному розчині.

**Примітки:** 1. При вмісті сечової кислоти більше 1000 мкмоль/л пробу розвезти у 3 рази ізотонічним розчином і провести аналіз повторно. Отриманий результат помножити на 3.

2. Об'єми проб і реагенту можна пропорційно зменшувати або збільшувати.

**Діагностичне значення.** Сечова кислота – один із кінцевих продуктів обміну нуклеопротеїнів, при руйнуванні яких утворюються нуклеїнові кислоти, які в свою чергу гідролізуються до нуклеотидів. Подальший розпад нуклеотидів здійснюють нуклеотидази, утворюючи пуринові (аденін і гуанін) та піримідинові основи. При дезамінуванні аденіну і гуаніну утворюється гіпоксантин, а потім – ксантин, який окиснюється у печінці ксантинооксидазою з утворенням сечової кислоти. У крові вона міститься у вигляді натрієвої солі, зв'язаної з білком. Цей комплекс дуже чутливий до зміни рН сечі. При рН 5,0 розчинність сечової кислоти становить 60 мг/л, а при рН 7,0 – 1600 мг/л. Сечова кислота є основним азотистим компонентом сечі птиці: у гусей 70 % азоту сечі припадає на сечову кислоту і лише 3–4 % – на сечовину. Нирки птиці ефективно виводять сечову кислоту навіть за низької концентрації її в плазмі, вони мають достатні компенсаторні можливості: якщо на зернових раціонах кури щодня виділяють із сечею 2 г сечової кислоти, то при згодовуванні їм тваринних білків – 8–11 г. Виділяється сечова кислота у формі солей – уратів калію та натрію; при змішуванні з фекаліями утворює на них білий наліт.

У нормі в плазмі крові птиці міститься 0,12–0,36 ммоль/л сечової кислоти, у людей – 0,16–0,50 ммоль/л. Підвищення вмісту сечової кислоти в плазмі крові (*гіперурикемія*) спостерігається при надмірному згодовуванні кормів тваринного походження; при лейкозі,  $V_{12}$ -дефіцитній анемії, туберкульозі, цукровому діабеті, ацидозних станах, хворобах нирок, пневмоніях.

Найбільш поширеним захворюванням, яке виникає при порушенні пуринового обміну, є *сечокислий діатез*. При цьому захворюванні в

суглобах, хрящах, сухожильних сумках, на серозних покриттях (епікарді, парієтальному листку серозної оболонки груднино-черевної порожнини), у внутрішніх органах (нирках, серці, печінці) та м'язах солі сечової кислоти відкладаються у вигляді кристалів, навколо яких розвивається запалення з наступним розростанням сполучної тканини. Розрізняють чотири форми сечокиислового діатезу: *вісцеральну* – урати відкладаються на серозних покриттях і внутрішніх органах; *суглобову (подагра)*; *змішану* – вісцерально-суглобову і *локальну*, коли урати відкладаються в нирках і сечоводах. Вісцеральна форма сечокиислового діатезу реєструється як серед молодняку, так і дорослої птиці, тоді як суглобова виявляється лише у дорослої птиці.

Випадання в осад уратів часто є причиною утворення каменів у нирках і сечових шляхах. Вони можуть бути центрами кристалізації інших солей і спричиняти утворення змішаних камінців.

## 2.6. Визначення креатиніну

Креатинін є кінцевим продуктом розщеплення креатину, який відіграє важливу роль в енергетичному обміні м'язової та інших тканин. Креатин синтезується в основному в печінці, звідти він надходить у м'язову тканину. Тут він фосфорилується і перетворюється в креатинфосфат. Останній бере активну участь у транспортуванні енергії в клітині між мітохондріями і міофібрилами.

Вміст креатиніну в крові залежить від його утворення і виділення. Креатинін екскретується нирками завдяки клубочковій фільтрації, але на відміну від сечовини, не реабсорбується у канальцях. Тому цей компонент ЗА відображає ступінь порушення фільтраційної функції клубочків нирок.

*Підвищення* вмісту креатиніну спостерігається при ураженні клубочків нирок (гломерулонефриті), цукровому діабеті, м'язових дистрофіях, коліках, гострій нирковій недостатності.

### 2.6.1. Визначення креатиніну за колірною реакцією Яффе

*Принцип методу.* Креатинін у лужному середовищі реагує з пікриновою кислотою з утворенням сполуки оранжево-червоного кольору, що має максимум поглинання при довжині хвилі 510 нм.

*Обладнання:* фотоелектроколориметр (КФК-2, КФК-3), водяна баня, піпетки, пробірки, кювети 5 мм.

*Реактиви:* 1) 0,25 М розчин NaOH; ч, чда (реагент 1);

2) насичений розчин пікринової кислоти; ч, чда (реагент 2);

3) стандарт креатиніну – 440 мкмоль/л або 5 мг/100 мл; чда (реагент 3).

*Використовують набір реактивів НВФ “Simko Ltd” (м. Львів).*

*Хід визначення.* Змішуванням одного об’єму розчину луґу (реагент 1) з одним об’ємом насиченого розчину пікринової кислоти (реагент 2) готують робочий реактив (зберігає стабільність не менше 4 год при кімнатній температурі). До 0,1 мл сироватки крові додають 2 мл робочого реактиву. Перемішують, інкубують протягом 15 хв у водяній бані при температурі 37 °С. Аналогічно обробляють 0,1 мл стандарту креатиніну (реагент 3) та 0,1 мл дистильованої води (контроль).

Проти контролю відразу визначають оптичну густину стандарту креатиніну та досліджуваних проб при довжині хвилі 490–510 нм. Стабільність кінцевого продукту не більше 30 хв.

Уміст креатиніну в сироватці крові розраховують за формулою:

$$\text{Креатинін (мкмоль/л)} = 440 \times \frac{E_{np}}{E_{ст}} - 160,$$

де  $E_{np}$  – екстинція досліджуваної проби;  $E_{ст}$  – екстинція стандарту креатиніну (реагент 3);

$440$  – концентрація креатиніну в стандарті (мкмоль/л);

$160$  – емпірична величина, яка враховує середнє фонове поглинання сироватки крові.

**Приклад:** Поглинання досліджуваної проби – 0,137.

Поглинання креатинін-стандарту – 0,279.

Концентрація креатиніну в досліджуваній пробі буде:

$$(440 \times 0,137) : 0,279 - 160 = 56 \text{ мкмоль/л.}$$

**Примітки:** 1. Об’єми досліджуваних зразків та реагентів можна пропорційно зменшувати або збільшувати. Наприклад: до 0,05 мл проби додати 1,0 мл робочого реактиву або до 0,15 проби додати 3 мл робочого реактиву. Далі див. хід визначення.

2. Коефіцієнт 160, який враховує середнє фонове поглинання сироватки, виведено на КФК-3 при 510 нм. При використанні приладів типу ФЕК-56М, КФК-2, КФК-2МП та ін. він може бути іншим (140–200). Тому рекомендуємо кожній лабораторії самостійно вивести цей коефіцієнт на плазмі здорових тварин.

Реакція є лінійною в діапазоні 0–1320 мкмоль/л (0–15 мг/дл) креатиніну.

Речовини, що спотворюють результати. Реакція Яффе не є специфічною. Речовини з активною метильною групою, глюкоза, стабілізатори, що присутні в більшості комерційних сироваток, деякі ліки та інші речовини завищують результати.

*Стабільність досліджуваних зразків.* Креатинін зберігається в сироватці крові протягом тижня при 0–8 °С або до 3-х місяців у замороженому стані. Добову сечу стабілізують додаванням 15 г борної кислоти.

*Діагностичне значення.* Уміст креатиніну в сироватці крові людей становить 50–115 мкмоль/л, у високопродуктивних корів – 70–150 мкмоль/л; телят – 70–110; овець та кіз – 80–120; свиней – 100–200; коней – 100–160; собак – 70–140; котів – 80–160 мкмоль/л. Креатинін у клінічно здорових людей і тварин повністю фільтрується клубочковим апаратом нефрона і не реабсорбується в канальцях. Тому визначення креатиніну використовують для вивчення фільтраційної функції клубочків нирок. Об'єм клубочкової фільтрації у нирках людини при нормальному вмісті креатиніну в сироватці крові становить 85–135 мл за 1 хв, при 200 мкмоль/л – 37 мл/хв, при 300 – 23, 400 – 17 мл/хв (функціонує від 20 до 50 % клубочків нирок). Якщо креатиніну міститься від 500 до 700 мкмоль/л, то об'єм фільтрації становить 13–8,8 мл/хв і функціонує лише 10–20% клубочків. За вищого рівня креатиніну (700–1016 мкмоль/л) об'єм фільтрації первинної сечі менше 8 мл/хв і функціонує не більше 10 % клубочків.

Визначення креатиніну широко використовують у клінічній практиці як показник кліренсу нирок, який вказує на кількість плазми або сироватки крові, яка за одиницю часу повністю очищається від введеної речовини. Вміст креатиніну в сироватці зростає при значно-му погіршенні функції нирок.

### **2.6.2. Визначення креатиніну в сироватці крові за колірною реакцією Яффе (метод Поппера)**

*Принцип методу.* Креатинін реагує з пікриновою кислотою в лужному середовищі з утворенням забарвлених сполук. Інтенсивність забарвлення пропорційна концентрації креатиніну.

*Обладнання:* фотоелектроколориметр (КФ2-2, КФК-3), центрифуга, водяна баня, пробірки (центрифужні, серологічні), піпетки.

- Реактиви:* 1) насичений розчин пікринової кислоти, ч, чда;  
2) стандартний розчин креатиніну, ч, чда;  
3) 10 %-ний розчин NaOH, чда;  
4) 0,1 н (0,1 моль/л) розчин соляної кислоти, чда.

*Використовують набір реактивів НВП "Реагент" (м. Дніпропетровськ).*

*Хід визначення.* У центрифужну пробірку вносять 1 мл сироватки крові і 3 мл розчину пікринової кислоти. Суміш перемішують і через 5 хв поміщають на 15–20 с у киплячу водяну баню. Центрифугують при 3000 об/хв 7–10 хв.

У лабораторну пробірку відбирають 2 мл центрифугату, додають 0,1 мл 10 %-ного розчину NaOH і доводять дистильованою водою до об'єму 5 мл (+ 2,9 мл).

Через 10 хв вимірюють оптичну густину при довжині хвилі 500–560 нм у кюветі на 10 мм проти контролю (1,5 мл розчину пікринової кислоти + 0,1 мл 10 %-ного розчину NaOH + 2,9 мл дистильованої води).

Розрахунок проводять за формулою:

$$X = \frac{E_{np}}{E_{ст}} \times l = \text{мг} / 100 \text{мл},$$

де  $E_{np}$  – екстинція дослідної проби;  $E_{ст}$  – екстинція стандартної проби;  
 $l$  – концентрація креатиніну у стандартній пробі, мг у 100 мл.

### 3. ДОСЛІДЖЕННЯ ЛІПІДНОГО ОБМІНУ

*Ліпідами* (від грец. *lipos* – жир) називають фракції тваринних і рослинних тканин, що розчиняються органічними розчинниками. До ліпідів належать жири та жироподібні речовини. В організмі тварин вони є основними енергетичними речовинами: при повному розпаді 1 г жиру виділяється 9,3 ккал енергії, що вдвічі більше, порівняно з вуглеводами і білками. Енергозабезпечення організму за рахунок жирів відбувається в основному за дефіциту вуглеводів або у випадках, які потребують підвищених енерговитрат. Окрім того, ліпіди виконують структурну функцію, оскільки є компонентами клітинних мембран органів і тканин. Важливими є захисна та метаболічна функції ліпідів: вони є розчинниками вітамінів А, Е, D, К та інших сполук, попередниками біологічно активних речовин – гормонів, вітамінів, жовчних кислот. Їм належить важлива роль і в обміні води (при окисненні 100 г жиру утворюється 107,1 г води).

За своїм складом ліпіди поділяються на дві основні групи – прості і складні. *Прості ліпіди* побудовані не більш як із двох різних компонентів – залишків спиртів (гліцеролу, вищих або циклічних) та трьох однакових або різних карбонових кислот. До них належать триацилгліцероли. Складні ліпіди у своїй молекулі містять три або більшу кількість різних за структурою простих речовин: спирт, карбонові кислоти, азотисті основи, зали-



шки вуглеводів, похідні ортофосфорної кислоти. До них належать: фосфоліпіди (лецитини, кефаліни, кардіолін, плазмалогени), гліколіпіди (цереброзиди і гангліозиди), стероли і стериди (холестерол, жовчні кислоти, провітаміни D) і ліпопротеїни.

### 3.1. Визначення загального холестеролу за методом Златкіс-Зака

*Принцип методу.* Холестерол та його ефіри у присутності сірчаної та оцтової кислот і хлорного заліза утворюють забарвлений комплекс, який має максимум поглинання при довжині хвилі 510–560 нм.

*Обладнання:* фотоелектроколориметр (КФК-2, КФК-3), пробірки, піпетки.

*Реактиви:* 1) 0,2 %-ний розчин хлорного заліза ( $\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$ ) в льодяній (99,9 %-ній) оцтовій кислоті ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ), чда (реагент 1);

2) концентрована сірчана кислота, ч (реагент 2);

3) стандарт холестеролу, чда (5,17 ммоль/л). 210 мг 95 %-ного холестеролу/100 мл концентрованої льодяної оцтової кислоти.

*Використовують набір реактивів НВФ “Simko Ltd” (м. Львів).*

*Хід визначення.* До 0,02 мл сироватки крові додають 1,0 мл реагенту 1 і 0,7 мл реагенту 2. Вміст ретельно перемішують і витримують 15 хв при кімнатній температурі. Аналогічно обробляють 0,02 мл стандарту холестеролу і контроль – 0,02 мл дистильованої води. Визначають оптичну густину проби і стандарту в кюветі 0,5 см при довжині хвилі 510–560 нм проти контролю.

Розрахунок умісту холестеролу проводять за формулою:

$$\text{холестерол (ммоль/л)} = \frac{E_{\text{дп}}}{E_{\text{ст}}} \times 5,17,$$

де  $E_{\text{дп}}$  – екстинція дослідної проби;  $E_{\text{ст}}$  – екстинція стандартного розчину;  
5,17 – концентрація холестеролу у стандартному розчині.

*Приклад.* Екстинція дослідної проби – 0,328.

Екстинція стандартного розчину (5,17 ммоль/л) – 0,454.

Концентрація холестеролу в досліджуваній пробі буде складати:  
(0,328 × 5,17) : 0,454 = 3,73 ммоль/л

При вмісті холестеролу більше 10 ммоль/л сироватку крові необхідно розбавити ізотонічним розчином NaCl 1:1, аналіз провести повторно, а результат помножити на 2. Не можна досліджувати гемолізовану сироватку і проби з високим вмістом білірубину.

*Стабільність досліджуваних зразків.* Холестерол у досліджуваних пробах зберігається до 24-х годин при кімнатній температурі, до 72-х годин при 2–8 °С, до 6 місяців у замороженому стані.

**Примітки:** 1. Реагенти 1 і 2 містять концентровані розчини сірчаної і оцтової кислот.

2. При потраплянні на шкіру промити великою кількістю дистильованої води.

### **3.2. Визначення загального холестеролу за методом Ілька**

*Принцип методу.* Холестерол у присутності суміші льодяної оцтової кислоти, оцтового ангідриду і сірчаної кислоти перетворюється у сполуку зеленого кольору, інтенсивність забарвлення якої пропорційна вмісту холестеролу.

*Обладнання:* КФК-2, КФК-3 або спектрофотометр; термостат; пробірки; мірні піпетки на 0,1 і 5 мл.

*Реактиви:* 1) льодяна оцтова кислота, ч; оцтовий ангідрид, хч; концентрована сірчана кислота, хч, чда. При змішуванні інгредієнтів (співвідношення 1:5:1) не допускати нагрівання суміші, тому колбу, у якій готують реактив, поміщають у посуд із льодом, а сірчану кислоту додають в останню чергу по краплях, постійно перемішуючи. Суміш має бути прозорою або з жовтуватим відтінком (довго зберігається у холодильнику);

2) стандартний розчин холестеролу (100 мг холестеролу в 100 мл хлороформу), хлороформ фарм.

*Використовують набір реактивів НВП "Реагент" (м. Дніпропетровськ).*

*Хід визначення.* До 2 мл реактиву 1 додають 0,1 мл негемолізованої сироватки крові, струшують і поміщають у термостат на 20 хв при температурі +37 °С. Рідину колориметрують на спектрофотометрі при довжині хвилі 650–660 нм у кюветі на 0,5 см проти контролю (2 мл розчину 1 і 0,1 мл дистильованої води).

Розрахунок проводять за калібрувальним графіком. Робочий розчин холестеролу готують розведенням стандартного розчину в 10 разів (10 мл стандартного розчину + 90 мл хлороформу). 1 мл робочого розчину містить 0,1 мг холестеролу. Потім у пробірки вносять по 0,1; 0,25; 0,50; 1; 1,5; 2; 2,5 і 3 мл робочого розчину, що відповідає 0,01; 0,025; 0,05; 0,10; 0,15; 0,20; 0,25 і 0,30 мг холестеролу. У дев'яту пробірку вносять 1 мл хлороформу. Пробірки поміщають у водяну баню для

випаровування хлороформу; додають до них по 2 мл реактиву 1 і далі колориметрують, як описано вище.

**Примітка.** При постановці реакції використовувати абсолютно чисті і сухі піпетки та пробірки. Співвідношення інгредієнтів розраховане так, що білки сироватки крові не випадають в осад. Поява помутніння може виникати тільки при наявності води у реактиві або посуді.

**Діагностичне значення.** З діагностичною метою в сироватці (плазмі) крові визначають загальний холестерол, ефіри холестеролу,  $\beta$ -ліпопротеїни (ЛПНГ),  $\alpha$ -ліпопротеїни (ЛПВГ). Уміст холестеролу в сироватці крові високопродуктивних корів становить 2,3–4,0 ммоль/л (Сахнюк В.В., 2004), дрібної рогатої худоби – 1,6–3,6; свиней – 1,6–2,9 ммоль/л. Значні вікові зміни вмісту холестеролу виявлені у лошах: кількість його зменшується з 13–30 ммоль/л в одноденному віці до 4,8–19,0 – у місячному і 3,5–6,0 ммоль/л – в 6–12-місячному (Головаха В.І., 2003). У сироватці крові кобил уміст холестеролу становить 2,5–5,5 ммоль/л. У нормі частка ефірозв'язаного холестеролу в сироватці крові тварин становить 70–80 %, у птиці – 60–70 % від його загальної кількості.

**Підвищення** концентрації холестеролу в сироватці крові (*гіперхолестеролемія*) спостерігається при споживанні тваринами надлишку вуглеводів і жирів, при вагітності, гіперліпідемії, захворюваннях печінки з порушенням процесів утворення жовчних кислот, оскільки вони синтезуються з холестеролу (гепатит, гепатодистрофія), та жовчовиділення (холестаза), при гломерулонефриті, ліпоїдному нефрозі, хронічній нирковій недостатності, пухлинах підшлункової залози, кетозі, цукровому діабеті, гіпотиреозі, подагрі. При гіперліпідемії створюються умови для значного ендogenous синтезу холестеролу. Холестаза супроводжується зменшенням екскреції жовчі, внаслідок чого знижується виділення холестеролу. При гломерулонефриті та нирковій недостатності, можливо, зменшується виділення холестеролу із сечею. При кетозі та цукровому діабеті гіперхолестеролемія пов'язана з посиленням ліпогенезу та гліюконеогенезу, утворенням проміжних продуктів, що можуть використовуватися для синтезу ендogenous холестеролу. Для гіпотиреозу характерним є зниження енергетичного обміну. Цим самим пояснюється вікова динаміка вмісту холестеролу. Вважають, що гіперхолестеролемія є вірогідним фактором, який вказує на розвиток атеросклерозу. У людини високий ризик розвитку коронарного склерозу виникає при рівні холестеролу, що перевищує у віці 20–29 років 5,69 ммоль/л, 30–39 років – 6,21, старше 40 років – 6,72 ммоль/л.

Зменшення концентрації холестеролу (*гіпохолестеролемія*) в сироватці крові спостерігається при тривалому дефіциті в раціонах жирів, вуглеводів, гепатиті, гепатодистрофії, цирозі печінки та гіпотиреозі.

### 3.3. Визначення кетонових тіл у крові йодометричним методом

*Принцип методу.* З безбілкового фільтрату переганяють вільний ацетон та ацетон, що утворився з ацетооцтової і бета-оксимаєляної кислот, з наступним додаванням хромової суміші і кип'ятінням. У дистилаті визначають увесь перегнаний ацетон, зв'язуючи його йодом. Ацетон з йодом у лужному середовищі утворює йодоформ і натрію йодид. Надлишок йоду видаляють за допомогою сірчаної кислоти і контролюють титруванням розчином гіпосульфїту. За різницею між контрольним і дослідним зразком визначають зв'язаний йод.

*Обладнання:* перегінний пристрій для визначення кетонових тіл (20–30 шт.), електроплитки (8–10 шт.), мікробюретки на 2 і 5 мл, склянки хїмічні на 75–100 мл.

*Реактиви:* 1) 0,3 н (0,3 моль/л) розчин натрію гїдроокису, хч;

2) 5 %-ний розчин цинку сірчаноокислого ( $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ );

3) бїхроматна суміш: 20 г калїю двоохромовокислого, 200 мл концентрованої сірчаної кислоти, дистильована вода до 1 л. У мірну колбу ємністю 1 л наливають 400–600 мл дистильованої води, обережно доливають 200 мл сірчаної кислоти і, постійно перемішуючи, 20 г калїю двоохромовокислого (попередньо подрїбнити у ступці). Після розчинення речовини та остигання суміші доливають дистильованою водою до мітки;

4) 20 %-ний розчин сірчаної кислоти;

5) 10 %-ний розчин натрію гїдроокису;

6) 0,01 н (0,005 моль/л) розчин йоду (готують перед дослідженням із 0,1 н розчину, приготовленого з фіксаналу). Титр 0,01 н розчину йоду перед кожним дослідженням перевіряють по 0,01 н розчину натрію тіосульфїту (гіпосульфїт);

7) 0,01 н (0,01 моль/л) розчин натрію сірчистоокислого, 5-водного ( $\text{Na}_2\text{SO}_3 \times 5\text{H}_2\text{O}$ , готують із 0,1 н (0,1 моль/л) розчину, приготовленого з фіксаналу);

8) 1 %-ний розчин крохмалю. Готують завчасно насичений розчин натрію хлориду, наливають у мірну колбу ємністю 100 мл на 2/3, 1 г розчинного крохмалю розчиняють у пробїрці в 2–3 мл дистильованої води при нагріванні, виливають у колбу і доливають розчином

натрію хлориду до мітки. Розчин стійкий; з йодом має утворювати яскраво-синє забарвлення.

*Хід визначення.*

*Приготування безбілкового фільтрату за Сомоджі.*

До 5 мл крові додають 25 мл дистильованої води, 10 мл 0,3 н розчину натрію гідроокису, перемішують і додають 10 мл 5 %-ного розчину цинку сірчаноокислого. Суміш старанно струшують і через 10 хв фільтрують через паперовий фільтр. Розведення крові – 1:10.

### **3.3.1. Визначення загальної кількості кетонових тіл**

В мірну склянку вносять 20 мл дистильованої води, 2 мл 0,01 н розчину йоду, 2 мл 10 %-ного розчину натрію гідроокису і ставлять під холодильник перегінного пристрою так, щоб кінець його опустився в рідину. В перегінну колбу вносять 10 мл фільтрату крові, 15 мл біхроматної суміші і 10 мл дистильованої води. Паралельно готують контроль у двох пристроях: у перегінну колбу вносять 20 мл дистильованої води і 15 мл біхроматної суміші. Прилади закривають, з'єднують охолоджувачі з проточною водою і вмикають електроплитки. Дослідні зразки кип'ятять 25, контрольні – 15 хв. Після вимкнення плиток знімають перегінну колбу, а охолоджувач промивають невеликою кількістю дистильованої води. Прийомну склянку закривають кришкою, залишають у темному місці на 15–20 хв, після чого у неї швидко вливають 2 мл 30%-ного розчину сірчаної кислоти, додають 2–3 краплі 1 %-ного розчину крохмалю і титрують 0,01 н розчином гіпосульфїту до знебарвлення.

Розрахунок проводять за формулою:

$$X = (A-B) \times 0,25 \times 100 \text{ (мг/100 мл)},$$

де  $X$  – кількість кетонових тіл (мг/100 мл);  $A$  – кількість мл 0,01 н розчину гіпосульфїту, витраченого на титрування вільного йоду в контрольній пробі;  $B$  – кількість мл 0,01 н розчину гіпосульфїту, витраченого на титрування вільного йоду в дослідній пробі; 1 мл 0,01 н розчину йоду зв'язує 0,25 мг ацетону; 100 – коефіцієнт переведення в мг/100 мл.

### **3.3.2. Визначення ацетону і ацетооцтової кислоти**

У прийомну склянку вносять 20 мл дистильованої води, 2 мл 0,01 н розчину йоду, 2 мл 10 %-ного розчину натрію гідроокису, ставлять її під охолоджувач перегінного пристрою. В перегінну колбу вносять 10 мл фільтрату крові, 1 мл 20 %-ного розчину сірчаної кислоти і 15 мл дистильованої води. Паралельно готують два контролю: в перегінну колбу вносять 25

мл дистильованої води і 1 мл 20 %-ного розчину сірчаної кислоти. Закривають систему, вмикають електроплитки і кип'ятять контрольний зразок 15 хв, дослідні зразки – 25 хв. Після кип'ятіння прийомну склянку закривають кришкою, залишають у темному місці на 15–20 хв, після чого у неї швидко вливають 2 мл 30 %-ного розчину сірчаної кислоти, додають 2–3 краплі 1 %-ного розчину крохмалю і титрують 0,01 н розчином гіпосульфїту до знебарвлення.

Розрахунок проводять за формулою:

$$X = (A - B) \times 10,24 \text{ (мг/100 мл)},$$

де  $A$  – кількість мл 0,01 н розчину гіпосульфїту, витраченого на титрування вільного йоду в контрольній пробі;  $B$  – кількість мл 0,01 н розчину гіпосульфїту, витраченого на титрування вільного йоду в дослідній пробі; 10,24 – коефіцієнт переведення в мг/100 мл. 1 мл 0,01 н розчину йоду відповідає 0,1024 мг ацетону. Кількість фільтрату в дослідному зразку відповідає 1 мл крові, тому зв'язана кількість йоду, помножена на 10,24 (0,1024 x 100), відповідає вмісту ацетону та ацетооцтової кислоти в 100 мл крові.

### 3.3.3. Визначення бета-оксималярної кислоти

У мірну склянку вносять 20 мл дистильованої води, 2 мл 0,01 н розчину йоду, 2 мл 10 %-ного розчину натрію гідрооксиду і ставлять під холодильник перегінного пристрою. Перегінну колбу після відгонки ацетону та ацетооцтової кислоти охолоджують під проточною водою і вносять до неї 15 мл біхроматної суміші (дробно, за 4 прийоми). Закривають систему і кип'ятять 28 хв. Необхідно стежити за тим, щоб кипіння в колбі не припинилося і рідина не википала (запобігання потемнінню калію біхромату). По закінченні терміну кипіння прийомну колбу від'єднують від охолоджувача, вимикають електроплитку. Перегінну колбу і охолоджувач промивають 4–5 мл дистильованої води. Прийомну склянку ставлять у темне місце на 15 хв.

*Контрольний розчин:* У перегінну колбу вносять 10 мл дистильованої води, 15 мл калію біхромату, кип'ятять 25 хв і титрують 0,01 н розчином гіпосульфїту до знебарвлення. Розрахунок проводять за формулою:

$$X = (A - B) \times 25 \text{ (мг/100 мл)},$$

де  $A$  – кількість мл 0,01 н розчину гіпосульфїту, витраченого на титрування вільного йоду в контрольній пробі;  $B$  – кількість мл 0,01 н розчину гіпосульфїту, витраченого на титрування вільного йоду в дослідній пробі; 25 – коефіцієнт переведення в мг/100 мл.

*Діагностичне значення.* Обмін ліпідів залежить від складу раціону, функцій кишечника, підшлункової і щитоподібної залоз, печінки та інших органів. Порушення обміну ліпідів виникають за нестачі чи надлишку жирів у раціоні, нестачі цукру і крохмалю, висококонцент-

ратного типу годівлі, недостатнього споживання сіна. У збалансованих раціонах дійних корів уміст жиру становить 2–4 % (35,0 на 1 корм. од.), телят – 5–8, молодняку старше 6-місячного віку – 3–4, кнурів і свиноматок – 2,5–3, поросят – 3–4 %.

Надлишкове використання жирів спричинює ожиріння, кетоз, цукровий діабет, серцево-судинні та інші захворювання, а недостатнє – призводить до низького засвоєння поживних речовин корму, розвитку ліпомобілізаційного синдрому, аліментарної дистрофії, кетозу, спричинює розлад репродуктивної функції, погіршене засвоєння жиророзчинних вітамінів, ураження шкірного покриву, зниження запліднюваності яєць та природної резистентності організму.

Кетонові тіла (бета-оксимаєляна та ацетооцтова кислоти, ацетон) утворюються головним чином у печінці, менше – в нирках, стінках передшлунків, молочній залозі. Вони є звичайними метаболітами обміну вуглеводів, жирів і деяких амінокислот, при розпаді яких утворюється оцтова кислота у вигляді сполуки з коферментом ацетилювання – ацетил-КоА. Активована оцтова кислота в подальшому окиснюється у циклі трикарбонових кислот, початковим етапом якого є реакція конденсації з шавлевооцтровою кислотою (ЩОК). Окиснення її блокується нестачею ЩОК, основним джерелом якої є глюкоза. У такому випадку дві молекули ацетил-КоА конденсуються з утворенням ацетоацетил-КоА, який через кілька стадій перетворюється в ацетоацетат, з якого потім утворюються ацетон і бета-оксимаєляна кислота.

У крові, сечі та молоці завжди є незначна кількість кетонових тіл. Підвищення їх рівня у крові (*кетонемія*) супроводжується посиленням виділенням їх через нирки (*кетонурія*), молочну (*кетанолактія*) і потові залози та легені.

У нормі у здорових тільних сухостійних корів уміст кетонових тіл становить 2,5–6 мг/100 мл (0,4–1,03 ммоль/л), у корів через 2–5 днів після отелення – 6–8, а через 30 днів – 5,5–7 мг/100 мл. У високопродуктивних корів, порівняно з низькопродуктивними, вміст кетонових тіл вищий. Основна кількість їх у крові (82–87%) припадає на частку бета-оксимаєляної кислоти.

Експрес-методом з реактивом Лестраде кетонові тіла в крові визначають при їх мінімальному вмісті 10 мг/100 мл (1,72 ммоль/л). Швидкість появи забарвлення і його інтенсивність пропорційні концентрації кетонових тіл у досліджуваній пробі. Якщо інтенсивне забарвлення з'являється негайно, то це є показником наявності у пробі

50–80 мг/100 мл і більше кетонів тіл, через 1 хв – 30–50; ледь помітне забарвлення після 3 хв – 10–30 мг/100 мл.

Стійка кетонемія зустрічається у тварин при гострому та підгострому перебізі кетозу, цукровому діабеті. При цьому змінюється співвідношення між окремими компонентами кетонів тіл у бік підвищення вмісту більш токсичного продукту – ацетону. Помірна кетонемія супроводжує різні хвороби: пневмонію, гепатоз і гепатит, міоглобінурію, гнійний мастит, ендометрит, причому підвищення концентрації кетонів тіл відбувається переважно за рахунок бета-оксималяної кислоти.

#### 4. ДОСЛІДЖЕННЯ ОБМІНУ ВУГЛЕВОДІВ

Вуглеводи – основні складові живлення сільськогосподарських тварин і найважливіше джерело енергії. Вуглеводи поділяються на прості (моносахариди) і складні. Серед останніх, у свою чергу, виділяють три групи: олігосахариди, гомополісахариди (глікани) і гетерополісахариди (кислі і нейтральні). Молекули *моносахаридів* мають один вуглецевий ланцюг, і всі вони не піддаються гідролізу. Залежно від кількості атомів вуглецю, що входять до складу молекули моносахаридів, їх поділяють на тріози, тетрози, пентози, гексози та ін. Найбільш поширеними серед моносахаридів є тріози ( $C_3H_6O_3$ ; гліцероловий альдегід, діоксіацетон), пентози ( $C_5H_{10}O_5$ ; рибоза, дезоксирибоза, рибулоза) і гексози ( $C_6H_{12}O_6$ ; глюкоза, фруктоза, галактоза, маноза та ін.). У моногастричних тварин вуглеводи кормів у кишечнику розкладаються до моноцукрів (глюкози, фруктози та галактози). Фруктоза і галактоза у стінці тонкого кишечника перетворюються у глюкозу, яка всмоктується в кров, надходить до тканин, а надлишок її відкладається у печінці та м'язах у вигляді глікогену.

У жуйних більша частина вуглеводів у передшлунках ферментується до летких жирних кислот (ЛЖК) – оцтової, пропіонової та масляної. З пропіонової кислоти у печінці і частково у стінці травного каналу синтезується глюкоза (глюконеогенез). Лише 10 % глюкози кормів всмоктується в тонкому кишечнику.

Одним із показників обміну вуглеводів є вміст глюкози в сироватці крові, який визначається кількома методами: ферментативним (глюкозооксидазним), орто-толуїдиновим, за методом Сомоджі, Хагедорна-Іенсена, Борисова (з пікриновою кислотою). Проте останні три методи дають завищені показники, оскільки разом з глюкозою визначаються й інші цукри. Глюкозу визначають у крові, сироватці та плазмі.



Вміст глюкози в крові і плазмі майже однаковий, проте швидко знижується внаслідок гліколізу. Тому визначають її не пізніше 2 год після взяття крові, або швидко осаджують білки трихлороцтовою кислотою.

#### 4.1. Визначення глюкози за колірною реакцією з орто-толуїдином

*Принцип методу.* Глюкоза при нагріванні з орто-толуїдином у розчині оцтової кислоти утворює сполуку, інтенсивність зафарбування якої є пропорційною концентрації глюкози.

*Обладнання:* КФК-2, КФК-3 або спектрофотометр, центрифуга, водяна баня, піпетки 0,2; 0,5; 2 мл, пробірки, гумові пробки, обгорнуті фольгою.

*Реактиви:* 1) 3 %-ний розчин трихлороцтової кислоти (ТХОК), чда;

2) орто-толуїдиновий реактив, чда: у 94 мл льодяної оцтової кислоти розчиняють 0,15 г тіосечовини і додають 6 мл орто-толуїдину. Реактив – стійкий при зберіганні в холодильнику;

3) стандартний 500 мг%-ний розчин глюкози, приготовлений у 0,2 %-ному розчині бензойної кислоти.

*Використовують набір реактивів НВП "Реагент" (м. Дніпропетровськ).*

*Хід визначення.* У пробірку вносять 1,8 мл 3 %-ного розчину ТХОК і додають 0,2 мл свіжої або стабілізованої натрію фторидом крові. Центрифугують 15 хв при 1500 об/хв. До 0,5 мл центрифугату додають 4,5 мл орто-толуїдинового реактиву. Пробірки закривають гумовими пробками, обгорнутими фольгою, і ставлять у киплячу водяну баню (вода має безперервно кипіти) точно на 8 хв, після чого їх одразу ж охолоджують під проточною водою. Оптичну густину вимірюють на фотоелектроколориметрі (ФЕК-56М, КФК-2, КФК-3) при довжині хвилі 590–650 нм (оранжевий або червоний світлофільтр) у кюветі з товщиною робочого шару 10 мм. Контроль: 0,5 мл ТХОК + 4,5 мл орто-толуїдинового реактиву.

Стандартна проба ставиться так само, як і дослідна, але замість крові беруть стандартний розчин глюкози з концентрацією 50–100 мг/100 мл, тобто стандартний розчин розбавляють у 10 чи в 5 разів. Розрахунок проводять за формулою:

$$C = C_{ст} \times \frac{E_d}{E_{ст}},$$

де  $C$  – концентрація глюкози у пробі, мг/100 мл крові;

$C_{ст}$  – концентрація глюкози у стандарті;

$E_d$  – оптична густина дослідної проби;  $E_{ст}$  – оптична густина стандарту.

**Примітка.** Для перерахунку вмісту глюкози з мг/100 мл у ммоль/л необхідно одержаний результат перемножити на 0,0555 або поділити на 18.

#### 4.2. Визначення глюкози у плазмі крові глюкозо-оксидазним методом

**Принцип методу.** Глюкоза у присутності глюкозо-оксидази окиснюється киснем повітря до глюконової кислоти та перекису водню. Останній за наявності пероксидази вступає в реакцію з фенолом і 4-амінофеназоном з утворенням хіноніміну червоно-фіолетового кольору, інтенсивність якого визначається фотометрично.

**Обладнання:** КФК-2, КФК-3 або спектрофотометр, центрифуга, водяна баня, піпетки 0,2; 0,5; 2 мл, пробірки.

**Реактиви:** 1) розчин ферментів (пероксидаза), ч, хч;

2) фосфатний буферний розчин (рН 7,4), чда;

3) антикоагулянт (суха суміш 0,536 г натрію шавлевокислого і 3,4 г натрію хлориду), чда;

4) калібрувальний розчин (вміст глюкози – 10,0 ммоль/л), чда.

Використовують набір реактивів НВП “Реагент” (м. Дніпропетровськ).

**Приготування робочого розчину.** У колбу ємністю 200 мл перенести вміст флакона з буферним розчином, додати 100–120 мл дистильованої води, розчин ферментів і довести до мітки дистильованою водою.

**Приготування розчину антикоагулянта.** У колбу ємністю 500 мл внести суміш антикоагулянта і додати 400 мл дистильованої води, перемішати до повного розчинення кристалів солей. За необхідності розчин фільтрують.

**Хід визначення.** Для отримання плазми 0,1 мл крові змішують з 0,9 мл розчину антикоагулянта і центрифугують 10 хв при 2000 об/хв.

Визначення глюкози проводять на фотоелектроколориметрі (довжина хвилі 500–546 нм) або на спектрофотометрі (500 нм) у кюветі з товщиною оптичного шару 10 або 5 мм за схемою, поданою у табл. 12. Якщо вміст глюкози у плазмі крові більше 27,7 ммоль/л, її потрібно розвести ізотонічним розчином у 5 разів і повторити визначення.

Таблиця 12 – Схема визначення глюкози у плазмі крові

Речовина	Калібрувальна проба	Дослідна проба	Контрольна проба
Калібрувальний розчин	0,02	–	–
Плазма крові	–	0,2	–
0,85 %-ний розчин NaCl	0,2	–	0,2
Робочий розчин	2,0	2,0	2,0
Усе змішати, витримати 20 хв при кімнатній температурі (18–25 °С) або 12 хв у термостаті (37°С). Виміряти поглинання дослідної проби (А), калібрувального розчину (В) проти контрольної проби.			

Розрахунок умісту глюкози у плазмі крові проводять за формулою:

$$C = 10 \frac{A}{B} \times K,$$

де  $C$  – концентрація глюкози, ммоль/л;  $10$  – стабільна величина;  $A$  – поглинання дослідної проби;  $B$  – поглинання калібрувального розчину;  $K$  – коефіцієнт розведення плазми крові.

*Діагностичне значення.* Вміст глюкози в крові є відносно постійною величиною і залежить від виду та віку тварин (табл. 13).

Таблиця 13 – Уміст глюкози в крові здорових тварин

Вид тварин	Глюкоза	
	мг/100мл	ммоль/л
Велика рогата худоба:		
дорослі тварини	45–60	2,5–3,3
телята віком 2–5 днів	80–85	4,4–4,7
9–12-денні	75–80	4,2–4,5
Вівці	45–60	2,5–3,3
Свині	50–70	2,75–3,9
Коні	55–90	3,0–5,0
Собаки	60–80	3,3–4,5
Кролі	75–95	4,2–5,3
Кури	80–140	4,5–7,8
Норки	100–190	5,5–10,5
Песці	100–150	5,5–8,3

Порушення вуглеводного обміну супроводжується зниженням рівня глюкози в крові (гіпоглікемія) або її підвищенням (гіперглікемія).

*Гіпоглікемія* спостерігається при недостатньому вмісті у кормах легкоотраваєних вуглеводів (цукру і крохмалю), виснаженні легкоомобілізованих запасів цукру при транспортному стресі, підвищеній витраті цукру на терморегуляцію, особливо в поросят у перші дні життя

(гіпоглікемія поросят), у фазі інтенсивної лактації, при тяжкому фізичному навантаженні. Окрім того, гіпоглікемію виявляють при аліментарній дистрофії, коли вміст глюкози менший 1 ммоль/л, кетози (вміст глюкози зменшується одночасно зі зростанням кетонемії), за дефіциту панкреатичної амілази внаслідок панкреатиту та при хронічному ентериті, коли порушуються процеси розпаду вуглеводів та їх всмоктування. Гіпоглікемію часто реєструють при патології печінки, зокрема жировій гепатодистрофії у корів. Вона розвивається внаслідок передозування інсуліну, особливо на фоні низького рівня глюкози в крові (гіпоглікемічна кома), при захворюваннях підшлункової залози, які супроводжуються дефіцитом глюкагону та підвищеним продукуванням інсуліну (наприклад, при інсуліномії – пухлині, що розвивається з  $\beta$ -клітин острівців Лангерганса, вміст глюкози у хворих німецьких вівчарок зменшується до 2,8 ммоль/л).

Збільшення концентрації глюкози (*гіперглікемія*) буває аліментарного, симпатичного та діабетичного походження. *Аліментарна гіперглікемія* виникає після згодовування тваринам, особливо моногастричним, великої кількості цукристих кормів. *Симпатична гіперглікемія* є наслідком підвищеного розпаду глікогену (глікогенолізу) – при стресах, підвищеній збудливості кори головного мозку (сказ, хвороба Ауескі) та гіперфункції надниркових залоз. Посилене продукування адреналіну активує фосфорилазу печінки та м'язів, інгібує синтез глікогену, а збільшення синтезу глюкокортикоїдів стимулює глікоконез, тобто посилює утворення глюкози з неуглеводних джерел.

*Діабетична гіперглікемія* розвивається при недостатній секреції інсуліну (цукровий діабет). У генезі цукрового діабету важливим є порушення процесів внутрішньоклітинного засвоєння глюкози, внаслідок порушення транспорту її через клітинну мембрану. Глюкоза нагромаджується у крові та в міжклітинній рідині, спричинюючи ефект дегідратації клітин, оскільки вода з клітин починає надходити в навколишню рідину, яка має вищий осмотичний тиск. Таким чином, на фоні гіперглікемії тканини відчувають дефіцит глюкози і, внаслідок цього, – нестачу енергії. Нестача інсуліну та дефіцит енергії зумовлюють посилення процесів розщеплення жирів (ліполізу) і глікоконезу. Проте, повне розщеплення жирів до кінцевих продуктів не відбувається через дефіцит енергії, тому в організмі нагромаджуються проміжні продукти розпаду жирних кислот – кетонів тіла. Гіперглікемія спричинює розвиток глюкозурії.

### 4.3. Визначення вмісту хондроїтинсульфатів у сироватці крові

*Принцип методу.* Хондроїтинсульфати спричинюють помутніння сироватки в присутності етакридину лактату, яке пропорційне їх концентрації.

*Обладнання:* фотоелектроколориметр (КФК-2, КФК-3) або спектрофотометр; піпетки на 0,1 і 5,0 мл.

*Реактиви:* 1) ацетатний буфер (рН = 5,5), (а + б):

а) 0,6 мл оцтової кислоти (ч) + 100 мл дистильованої води;

б) 1,36 г оцтовокислого натрію (ч) + 100 мл дистильованої води.

10 мл реактиву (а) + 90 мл реактиву (б) = 100 мл буфера рН 5,5;

2) цитратний буфер (рН = 5,5), (а+б):

а) 2,1 г лимонної кислоти (ч) + 20 мл 1 М NaOH (ч), дистильованою водою довести до 100 мл;

б) 0,1 М розчин NaOH, ч.

72,3 мл реактиву (а) + 27,7 мл реактиву (б) = 100 мл буфера рН 5,5;

3) суміш буферів №1 50 мл та №2 50 мл = 100 мл робочої суміші + 0,39 г NaCl;

4) етакридину лактат, розчин 0,1 моль/л, чда (0,1 М = 3,43 г на 100 мл дистильованої води профільтрувати).

*Хід визначення.* У пробірку вносять 5 мл робочого розчину (№ 3) та 0,1 мл сироватки крові. Потім додають 0,1 мл етакридину лактату. Вимірювання проводять через 5 хв у кюветі з товщиною робочого шару 10 мм при зеленому світлофільтрі, проти контролю. Контрольну пробу обробляють так само, як і дослідну, але замість сироватки додають 0,1 мл дистильованої води.

Розрахунок здійснюють за формулою:

$$X = (E \times 10) : 6,$$

де  $E$  – екстинція дослідної проби;

$6$  – концентрація хондроїтинсульфатів за стандартом.

*Діагностичне значення.* Хондроїтинсульфати – це глікозаміноглікани, які є важливими компонентами сполучної тканини. Вони побудовані з дисахаридних мономерів, до яких входять N-ацетилгалактозамін і глюкуронова кислота. У великої рогатої худоби хондроїтин-4-сульфат міститься в кістках, стромі печінки, аорті, а хондроїтин-6-сульфат – у шкірі, зв'язках, сухожиллях, хрящах, клапанах серця. Вважають, що хондроїтинсульфати регулюють іонну рівновагу, проникність тканин, беруть участь в їх осифікації, зв'язують екстрацелюлярну воду, регулюють процеси дифузії, модифікують структуру колагенових фібрил та інші важливі функції.

## 5. ФЕРМЕНТОДІАГНОСТИКА

Ферменти (ензими) (від лат. *fermentum* – закваска) – це високомолекулярні органічні сполуки білкової природи, які виконують в організмі роль біологічних каталізаторів. Ферменти беруть участь у травленні та засвоєнні поживних речовин, побудові структурних та функціональних компонентів тканин і рідин організму, рості та відтворенні, згортанні крові й багатьох інших біологічних процесах. Ензими розташовані переважно всередині клітин (клітинні), за винятком травних і тих, які виконують специфічні функції в крові та інших біологічних рідинах.

Аспарагінова (аспартатамінотрансфераза, АСТ) та аланінова трансферази (аланін-амінотрансфераза, АЛТ) переносять аміногрупи від аспарагінової кислоти (АСТ) та аланіну (АЛТ) на альфа-кетоглутарову кислоту. Величини активності трансфераз у сироватці крові здорових тварин наведені в додатку Г. При пошкодженні тканин їхня активність у сироватці (плазмі) крові підвищується. Вони є досить чутливими при різних патологіях в організмі, зокрема при хворобах печінки.

### 5.1. Визначення активності аланінамінотрансферази (АЛТ) і аспартатамінотрансферази (АСТ) (за методом Рейтмана-Френкеля)

*Принцип методу.* Внаслідок переамінування, що відбувається під дією АЛТ і АСТ, утворюються щавлевооцтова і піровиноградна кислоти, які при додаванні 2,4-динітрофенілгідразину утворюють у лужному середовищі забарвлені гідрозони, що мають максимум поглинання при довжині хвилі 500–560 нм.

*Обладнання:* фотоелектроколориметр (КФК-2, КФК-3) або спектрофотометр; водяна баня; пробірки; піпетки на 0,1; 1,0 і 5,0 мл.

*Реактиви:* 1) субстратний розчин АЛТ (або АСТ), чда: буфер – 0,1 моль/л рН  $7,4 \pm 0,2$ ; 2-оксоглутарат – 2 ммоль/л; DL-аланін (для АЛТ) або DL-аспартат (для АСТ) – 0,2 моль/л – 105 мл;

2) 2,4-динітрофенілгідразин, чда (1 ммоль/л в 1 моль/л НСІ) – 105 мл;

3) стандартний розчин натрію пірувату, чда (2 ммоль/л) – 3 мл;

4) 0,4 М (16 г/л) розчин NaOH або 0,4 М (22,4 г/л) розчин KOH, чда.

*Використовують набори реактивів НВФ “Simko Ltd” (м. Львів).*

*Хід визначення.* У пробірку вносять 0,25 мл субстратного розчину АЛТ (АСТ), нагрівають при температурі +37 °С протягом 3–5 хв, додають 0,05 мл сироватки крові й інкубують (при +37 °С) точно 60 хв. Вносять 0,25 мл розчину 2,4-динітрофенілгідазину і витримують протягом 20 хв при кімнатній температурі. Додають 2,5 мл 0,4 М розчину натрію чи калію гідроокису, ретельно перемішують і витримують 10 хв при кімнатній температурі. Визначають оптичну густина при довжині хвилі 500–560 нм у кюветі з товщиною робочого шару 10 мм проти контролю. Аналогічно обробляють контроль – 0,05 мл ізотонічного розчину натрію хлориду.

Розрахунок активності ферментів у сироватці крові виконують за калібрувальним графіком.

*Побудова калібрувального графіка.* Із стандартного розчину натрію пірувату готують ряд розведень (табл. 14).

У кожену пробірку вносять по 0,5 мл розчину 2,4-динітрофенілгідазину, струшують і витримують 20 хв при кімнатній температурі. Додають по 5 мл 0,4 М NaOH (KOH), ретельно перемішують і залишають на 10 хв при кімнатній температурі. Визначають оптичну густина при довжині хвилі 500–560 нм у 10 мм кюветі проти контролю (пробірка № 5). На осі ординат відкладають знайдену величину оптичної густини, на осі абсцис – вміст пірвіноградної кислоти калібрувальної проби, виражене у мккат/л або мкмоль/(год × мл).

Таблиця 14 – Розведення натрію пірувату

№ пробірки	Стандартний розчин натрію пірувату, мл	Ізотонічний розчин NaCl, мл	Субстратний розчин АЛТ/АСТ	Активність ферменту (АЛТ, АСТ)	
				мккат/л	мкмоль/год × мл
1	0,05	0,1	0,45	0,28	1,0
2	0,1	0,1	0,40	0,56	2,0
3	0,15	0,1	0,35	0,83	3,0
4	0,2	0,1	0,30	1,11	4,0
5*	–	0,1	0,50	–	–

\* – контрольна проба.

За калібрувальною кривою знаходять значення активності амінотрансфераз (АЛТ або АСТ) у сироватці крові.

*Діагностичне значення.* Аспарагінова (аспартатамінотрансфера-

за) та аланінова (аланінамінотрансфераза) трансферази локалізуються у гіалоплазмі клітин (АСТ, окрім того, у мітохондріях) більшості органів і систем. Трансферази не є специфічними для окремих органів, тому необхідно визначити точне місце елімінації ферменту в кров (скелетні м'язи, печінка, міокард тощо). Величини активності трансфераз у сироватці крові здорових тварин наведені у додатку Г. Дослідження активності АСТ та АЛТ у сироватці крові використовують для діагностики хвороб печінки (гепатиту, гепатозу та ін.). Для великої і дрібної рогатої худоби показовими є дослідження активності АСТ у сироватці крові, а для коней, свиней, собак і котів – АЛТ і АСТ. Це пояснюється ступенем активності названих ензимів у гепатоцитах тварин різних видів. АСТ має високу активність у клітинах великих тварин, а АЛТ – дрібних. Трансферази є досить чутливими та інформативними показниками ураження печінки. Найвища активність трансфераз у крові спостерігається при розвитку некрозу печінки і гострому паренхіматозному гепатиті, дещо нижча – при хронічному гепатиті та гепатодистрофії. Зростання активності АСТ і АЛТ у сироватці крові починається за 3–8 днів до появи клінічних ознак захворювання і досягає максимуму в період гострого перебігу патологічного процесу. При розвитку жирової дистрофії печінки у корів зростання активності АСТ виникає вже при ультрамікроскопічних змінах органа, коли активність інших ферментів ще мало змінюється. Гіперферментемія залежить від кількості відкладеного жиру в паренхімі. Активність АСТ у крові корів, хворих на жирову гепатодистрофію, збільшується у 2–5 разів.

## **5.2. Визначення активності гамма-глутамілтранспептидази (ГГТП) в сироватці крові**

*Принцип методу.* Гамма-глутамілтранспептидаза каталізує реакцію перенесення L- $\gamma$ -глутамінового залишку із хромогенного субстрату на гліцилгліцин. При цьому звільняється п-нітроанілін, оптичну густину якого вимірюють фотометрично. Активність ферменту визначають кінетичним або методом постійного часу.

*Обладнання:* фотоелектроколориметр (КФК-2, КФК-3) або спектрофотометр; водяна баня; пробірки; піпетки на 0,1 і 10 мл.

- Реактиви:* 1) субстрат L- $\gamma$ -глутаміл-п-нітроаніліну, ч;  
2) буферна суміш: гліцилгліцин, 1,26 г, ТРІС – 1,21 г;  
3) стандартний розчин п-нітроаніліну, охч (5 ммоль/л);



4) 10 %-ний розчин оцтової кислоти, охч.

*Використовують набір реактивів НВП “Реагент” (м. Дніпропетровськ).*

*Приготування робочих розчинів.* 1. Буферний розчин, рН 8,1. Вміст флакону 2 розчиняють у 70–80 мл дистильованої води в мірній колбі на 100 мл і доливають водою до мітки. Розчин стабільний при зберіганні в холодильнику.

2. Субстратно-буферний розчин. Із флакону 1 відбирають 40 мг субстрату і розчиняють у 18 мл дистильованої води на киплячій водяній бані, додають 17 мл буферного розчину. Розчин стабільний при 15–25 °С протягом 10 годин.

Похибка методу –  $\pm 7\%$ .

*Хід визначення.* У пробірку вносять 0,5 мл субстратно-буферного розчину, нагрітого до температури +37 °С і додають 0,05 мл сироватки (плазми) крові. Вміст перемішують й інкубують у водяній бані точно 15 хв. У пробірку додають 3 мл 10 %-ного розчину оцтової кислоти і перемішують. Контрольну пробу готують аналогічно, але сироватку (плазму) крові додають після інкубації. Вимірюють екстинцію дослідної проби проти контрольної при 400–420 нм у кюветі товщиною робочого шару 10 мм.

Активність гамма-глутамілтранспептидази визначають за калібрувальним графіком, для побудови якого зі стандартного розчину п-нітроаніліну (вміст ампули) готують розведення (табл. 15).

Таблиця 15 – Розведення п-нітроаніліну

№ пробірки	Стандартний розчин п-нітроаніліну	Дистильована вода, мл	Активність ферменту	
			нмоль/с × л	мкмоль/год × мл
1	0,1	0,9	550	1,98
2	0,2	0,8	1100	3,96
3	0,4	0,6	2200	7,92
4	0,8	0,2	4400	15,84
5	1,0	–	5500	19,80

У пробірки відмірюють по 0,1 мл одержаних розчинів, додають по 7 мл 10 %-ного розчину оцтової кислоти, перемішують і колориметрують проти дистильованої води в умовах, аналогічних дослідній пробі. Будують графік залежності щільності розчину від активності ферменту. Лінійність калібрувального графіка зберігається до актив-

ності 5000 нмоль/схл.

**Примітки.** 1. При активності проби вище 5000 нмоль/схл її розводять ізотонічним розчином. NaCl. Результат множать на коефіцієнт розведення.

2. Активність гамма-глутамілтранспептидази не змінюється протягом 7 днів при зберіганні сироватки крові при +4 °С і протягом 3 місяців при –20 °С.

3. При використанні кювети з робочим об'ємом більше 10 мм кількість робочого розчину необхідно пропорційно збільшити.

**Діагностичне значення.** Гамма-глутамілтрансфераза (ГГТ, гамма-глутамілтранспептидаза – ГГТП) каталізує перенесення глутамілового залишку та гамма-глутамілпептиду на акцепторний пептид чи на альфа-амінокислоту. Фермент має найвищу активність у нирках, печінці, особливо в клітинах, які формують ниркові каналці та жовчні протоки, а також у підшлунковій залозі. Величини активності ГГТ у сироватці крові здорових тварин наведені у додатку Г. Зростання активності ГГТ у сироватці крові свідчить про патологічні процеси в гепатобіліарній системі, а підвищення її активності в сечі – про ураження нирок. При панкреатитах активність ферменту в крові зростає незначно. Гіперферментемія є раннім і надійним тестом інтрагепатитного стазу жовчі, пошкодження канікулярних мембран гепатоцитів біля біліарного полюса та епітеліальних клітин, які вистилають просвіт жовчних протоків. При холестазі та пошкодженні внутрішньопечінкових жовчних протоків спостерігається яскраво виражена гіперферментемія (50,0–110,0 Од/л), а при значних патологічних процесах у біліарній системі (холангіт, перихолангіт, холестаза, фасціольоз, дикроцеліоз) активність ферменту досягає понад 500,0 од/л.

### **5.3. Визначення $\alpha$ -амілази (за методом Каравея)**

**Принцип методу.** Метод ґрунтується на визначенні залишку незщепленого  $\alpha$ -амілазою крохмалю. Концентрацію крохмалю визначають за кольоровою реакцією з йодом. Активність  $\alpha$ -амілази пропорційна до зменшення інтенсивності забарвлення при 640 нм.

**Обладнання:** фотоелектроколориметр (КФК-2, КФК-3), спектрофотометр, водяна баня, пробірки, піпетки.

**Реактиви:** 1) концентрований субстратно-буферний розчин, чда

(0,5 %-ний розчин крохмалю, розчиненого в 0,25 М Трис-НСІ буфері, рН 7,1);

2) концентрований розчин йоду,  $\chi = 0,1$  М J (стійкий у темному місці);

3) концентрований стоп-розчин, 4 н НСІ,  $\chi$ .

*Використовують набір реактивів НВФ "Simko Ltd" (м. Львів).*

*Приготування субстратно-буферного розчину.* Один об'єм концентрованого розчину змішують з чотирма об'ємами дистильованої води (наприклад, до 10 мл концентрованого субстратно-буферного розчину додають 40 мл дистильованої води і перемішують).

*Приготування робочого розчину йоду.* Одержують у день використання розведенням концентрованого розчину у 50 разів (наприклад, 0,1 мл концентрованого розчину + 4,9 мл дистильованої води і перемішують).

*Приготування робочого стоп-розчину.* Одержують шляхом розведення концентрованого стоп-розчину в 40 разів (10 мл концентрованої соляної кислоти + 390 мл дистильованої води і перемішують). Розчин стійкий.

*Відбір проб.* 1. Використовують свіжу сироватку крові. Можливе використання гепаринізованої плазми.

2. Використовують профільтровану сечу, яку при активності понад 140 мг/(с × л) необхідно розвести ізотонічним розчином натрію хлориду в 2–100 разів.

3. Дуоденальний вміст перед визначенням потрібно розвести у 100 разів.

4. При розрахунку активності амілази враховують коефіцієнт розведення.

*Хід визначення.* Визначення  $\alpha$ -амілази проводять згідно зі схемою (табл. 16).

Таблиця 16 – Схема визначення  $\alpha$ -амілази

Розчин, мл	Дослідна проба	Контрольна проба
Субстратно-буферний розчин	0,5	0,5
<i>Витримують на водяній бані при +37 °С протягом 5 хв</i>		
Сироватка	0,01	–
<i>Витримують точно 7,5 хв на водяній бані при 37 °С</i>		
Стоп-розчин	4,0	4,0
Розчин йоду	0,5	0,5
Сироватка	–	0,01

Вимірюють поглинання дослідної і контрольної проб при 640 нм

проти дистильованої води (можна використовувати довжину хвиль 630–690 нм або червоний світлофільтр; кювета – 10 мм).

Активність  $\alpha$ -амілази розраховують за формулою:

$$\alpha\text{-амілаза, мг/(с}\times\text{л)} = \frac{E_1 - E_2}{E_1} \times 44,4,$$

де  $E_1$  – поглинання контрольної проби;  $E_2$  – поглинання дослідної проби;

44,4 – коефіцієнт перерахунку на 1 с інкубації і 1 л сироватки.

**Примітка.**  $1 \text{ мг/(с}\times\text{л)} = 3,6 \text{ мг/(год}\times\text{мл)}$ ;  $1 \text{ мг/(год}\times\text{мл)} = 0,278 \text{ мг/(с}\times\text{л)}$ .

**Діагностичне значення.** Величини активності альфа-амілази у сироватці крові здорових тварин наведені у додатку Г. Альфа-амілаза ( $\alpha$ -амілаза) каталізує ендогідроліз 1,4-глюкозидних зв'язків крохмалю, глікогену та інших споріднених з ними полісахаридів до мальтози, декстринів чи інших полімерів. Альфа-амілаза секретується підшлунковою та слинними залозами; невисока її активність спостерігається в печінці та скелетних м'язах. Низька молекулярна маса амілази ( $\approx 48000$ ) сприяє фільтрації ферменту через ниркові клубочки і виділенню із сечею. Ензим складається із двох фракцій – панкреатичної та слинної. У сироватці крові вищою є активність слинного ізоферменту, а в сечі – панкреатичного. Підвищення активності амілази в сироватці крові та сечі спостерігається при пошкодженні слинних та підшлункової залоз. Значна та швидка *гіперамілаземія* і *гіперамілазурія* розвиваються при гострому перебігу паротиту та панкреатиту. Меншою мірою зростання активності альфа-амілази реєструється при виразках шлунка, хімостазі, дистрофії печінки, гепатиті, жовчнокам'яній хворобі. При патології нирок активність ферменту може зростати у крові, а в сечі – знижуватися. *Гіперамілаземію* спричинюють деякі лікарські препарати (кортикостероїди, саліцилати, тетрациклін, фуросемід, гістамін).

#### **5.4. Визначення активності лужної фосфатази в сироватці крові (за Боданські)**

Лужна фосфатаза (фосфогідролаза моноєфірів ортофосфорної кислоти) є цинковмісним металопротеїном, який бере участь у мінеральному обміні. Вона розщеплює ефіри ортофосфорної кислоти з утворенням неорганічного фосфору. Крім кісткової тканини, лужна фосфатаза міститься в печінці, кишечнику, нирках і плаценті. Сироваткова луж-

на фосфатаза має кістково-печінково-кишкове походження. У молодняку великої рогатої худоби переважає кістковий ізофермент, а кишковий знаходять лише при патології. У кістках фермент синтезується остеобластами.

*Принцип методу.* При інкубації сироватки крові з бета-гліцерофосфатом лужна фосфатаза розщеплює субстрат з утворенням неорганічного фосфору. З отриманого результату вираховують кількість неорганічного фосфору, визначеного в паралельній пробі. Отримана різниця характеризує активність ферменту. Визначається вона в одиницях Боданські (1 од. дорівнює 1 мг/100 мл неорганічного фосфору).

*Обладнання:* фотоелектроколориметр (КФК-2, КФК-3) або спектрофотометр, водяний термостат (краще ультратермостат), піпетки, пробірки.

*Реактиви.* Визначення активності лужної фосфатази проводиться одночасно з визначенням кількості неорганічного фосфору. Для цього додатково використовується робочий розчин бета-гліцерофосфату. Реактиви готують безпосередньо перед роботою (табл. 17).

Таблиця 17 – Схема приготування робочого розчину бета-гліцерофосфату

Реактив	Кількість робочого розчину, мл		
	25	50	100
Бета-гліцерофосфат (чда), г	0,125	0,25	0,5
Мединал (чда), г	0,1063	0,2155	0,425
Вода, мл	12,5	25	50
0,1 N-ний розчин натрію гідроксиду (чда), мл	0,7	1,4	2,8
Вода до	25	50	100

*Хід визначення.* При роботі з використанням 1 %-ного розчину аскорбінової кислоти послідовно виконують наступні дії: а) нагрівають у водяній бані лужний розчин бета-гліцерофосфату при температурі 37 °С 5 хв; б) у центрифужні пробірки (П<sub>1</sub>) вносять 0,2 мл сироватки крові і швидко додають 2 мл підігрітого розчину бета-гліцерофосфату; в) пробірки (П<sub>1</sub>) ставлять на 1 год у термостат при температурі 37 °С (в подальшому в них проводять визначення лужної фосфатази); г) через 1 год пробірки (П<sub>1</sub>) виймають з термостату і відразу ж у кожен додають 2,2 мл 10 %-ного розчину трихлороцтової кислоти. Після струшування вміст пробірок через кілька хвилин центрифугують при 1500 об/хв протягом 10 хвилин; д) до

1,5 мл центрифугату додають 1 мл молібденового реактиву і 1 мл 1%-ного розчину аскорбінової кислоти. Точно через 10 хв проби колориметрують на КФК-2 чи КФК-3 при довжині хвилі 660 нм в кюветі з товщиною робочого шару 5 мм.

Отримане при колориметрії значення оптичної густини проб, у яких визначається неорганічний фосфор, віднімають від величини оптичної густини паралельних проб, в яких визначалась активність фосфатази. Потім за тією ж калібрувальною кривою чи таблицею знаходять показник активності ферменту.

### **5.5. Визначення активності лужної фосфатази в сироватці крові (за реакцією гідролізу динатрійфосфату)**

*Принцип методу.* Метод базується на визначенні кількості фенолу, що вивільняється при гідролізі динатрійфосфату. В лужному середовищі у присутності окисника фенол утворює з 4-аміноантипірином комплекс червоного кольору, який інтенсивно поглинає світло з довжиною хвилі 510 нм. Визначення проводиться без попереднього видалення білка з проби.

*Обладнання:* фотоелектроколориметр (КФК-2, КФК-3) або спектрофотометр; водяна баня; пробірки; піпетки на 0,1; 1,0 і 2,0 мл.

*Реактиви:* 1) буферний розчин, чда (0,05 М  $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$ ), що містить 0,39 %-ний розчин 4-аміноантипірину, рН 10;

2) реагент 1 – 1,6 КЮ<sub>4</sub>, чда;

3) субстрат – 120 мг  $\text{Na}_2$ -фенілфосфату, чда;

4) фенол-стандарт (30 ммоль/л), чда.

*Використовують набір реактивів НВФ “Simko Ltd” (м. Львів).*

*Приготування буферного розчину.* Вміст флакона з концентрованим буферним розчином розводять дистильованою водою при перемішуванні до кінцевого об'єму 260 мл. Розчин зберігають у пластиковому посуді в темному місці при + 4 °С.

*Приготування субстратно-буферного розчину.* Вміст флакона з субстратом розчиняють у 120 мл робочого буферного розчину. Зберігати при + 4 °С.

*Приготування розчину окисника.* Вміст флакона з реагентом № 1 розчиняють при нагріванні до 40–50 °С у 640 мл дистильованої води. Зберігати в темному посуді при кімнатній температурі.

*Приготування фенол-стандарту (5 ммоль/л).* Одержують розведен-

ням концентрованого розчину фенолу (30 ммоль/л) у 6 разів: 3 мл вихідного розчину + 15 мл дистильованої води. Зберігати при + 4 °С.

*Хід визначення.* Визначення проводять на фотоколориметрі або спектрофотометрі (довжина хвилі 510 нм) у кюветі з товщиною оптичного шару 10 мм згідно зі схемою, наведеною у табл. 18.

Таблиця 18 – Схема проведення визначення лужної фосфатази

Компоненти	Проба	Контроль
Субстратно-буферний розчин	0,8	0,8
<i>Преінкубують 5 хв на водяній бані при 37 °С</i>		
Сироватка крові	0,05	–
<i>Перемішують і інкубують рівно 10 хв на водяній бані при 37 °С</i>		
Розчин окисника	2,0	2,0
Сироватка крові	–	0,05
<i>Перемішують і через 5 хв визначають оптичну густину проби проти контролю</i>		

Активність лужної фосфатази визначають за формулою, використовуючи паралельно з серією проб сироваток одну пробу з фенол-стандартом (250000–500000 нмоль/л):

$$\text{лужна фосфатаза (нмоль/(с \times л))} = \frac{Ac \times C_{\text{фен}}}{Afен \times 600},$$

де  $Ac$  – поглинання дослідної проби проти контрольної,  $Aфен$  – поглинання проби з фенол-стандартом з концентрацією  $C_{\text{фен}}$  (нмоль/л) проти розчину порівняння,  $600$  – коефіцієнт переводу часу інкубації в секунди ( $10 \times 60$ ).

Активність лужної фосфатази \*\* можна визначати і за калібрувальним графіком. Для його побудови використовують як вихідний розчин фенолу з концентрацією 5 ммоль/л і роблять наступні розведення\*\*\*:

№ п/п	Фенол (5 ммоль/л), мл	Дистильована вода, мл	Кінцева концентрація фенолу, нмоль/л	Активність фосфатази, нмоль/(л х с)
1	0,1	9,9	50000	83,3
2	0,25	9,75	125000	208,3
3	0,5	9,5	250000	416,7
4	1,0	9,0	500000	833,3
5	2,0	8,0	1000000	1666,7
6	4,0	6,0	2000000	3333,3
7	8,0	2,0	4000000	6666,6

*Проба з фенол-стандартом: 0,8 мл робочого буферного розчину +*

+ 0,05 мл одержаного розчину фенолу + 2 мл розчину окисника. Визначають при довжині хвилі 510 нм проти розчину порівняння.

*Розчин порівняння:* 0,8 мл робочого буферного розчину + 0,05 мл дистильованої води + 2 мл розчину окисника.

**Примітки:** \*\* – якщо активність лужної фосфатази в досліджуваній сироватці перевищує 5000 нмоль/(с×л), її розводять ізотонічним розчином у 2–5 разів і повторно проводять визначення. Одержаний результат множать на коефіцієнт розведення;

\*\*\* – одержані розчини фенолу щільно закривають і зберігають у темному місці при +4 °С. Перед використанням їх витримують 5–10 хв при +37 °С.

## 5.6. Визначення активності загальної лужної фосфатази

(Вагнер В.К., Путілін М.В., Харабуга Г.Г.)

*Принцип методу.* Лужна фосфатаза в буферному розчині розщеплює 4-нітрофенілфосфат на 4-нітрофеніл та ортофосфат. Рівнем активності ферменту є кількість звільненого 4-нітрофенолу, яка вимірюється на фотоелектроколориметрі у лужному середовищі.

*Обладнання:* фотоелектроколориметр (КФК-2, КФК-3) або спектрофотометр, водяна баня, пробірки (оброблені в хромовій суміші), піпетки на 0,2; 1,0 та 2,0 мл.

*Реактиви:* 1) буфер (рН 10,1):

а) трис 2-аміно-2-(гідроксиметил)-1,3-пропандіол ( $C_4H_{11}O_3N$ ), М.м. 121,14 – 0,35 моль/л – 42,35 г/л;

б) натрію хлорид (NaCl), хч; М.м. 58,5. 70 ммоль/л – 4,094 г/л;

в) магнію хлорид ( $MgCl_2 \times 6H_2O$ ), ч; М.м. 203,3. 0,5 ммоль/л – 101,65 мг/л;

2) субстрат 4-нітрофенілфосфат (двонатрієва сіль), ч – ( $C_6H_4NO_6PNa_2 \times 6H_2O$ ) М.м. 371,15. 15 ммоль/л – 5,6 г/л (зберігати при температурі + 5 °С протягом 5 днів);

3) стандартний розчин – 2,4 мл еталону (4-нітрофенол) + 2,1 мл  $H_2O$  (кінцева концентрація 2,4 ммоль/л);

4) інгібітор – 30 ммоль/л розчин трилону Б (М.м. 372) у 1 М розчині NaOH (М.м. 40,0) – 11,16 г трилону Б у 1 л 1 М NaOH.

*Хід визначення.* У пробірки вносять 1,0 мл буферного розчину і додають 0,04 мл сироватки крові, для стандарту – 0,04 мл стандартного розчину; для контролю – 0,04 мл  $H_2O$ . Прогрівають 3 хв у водяній бані при 37 °С і додають по 0,2 мл розчину субстрату. Інкубують у водяній



бані (37 °С ) точно 15 хв, після чого в усі пробірки додають по 2 мл інгібітора. Через 10 хв вимірюють оптичну гуштину дослідної проби і стандартів на фотоелектроколориметрі (КФК-2, КФК-3) при довжині хвилі 410 нм у кюветі з товщиною робочого шару 10 мм проти контролю. Завершують вимірювання не пізніше 30 хв.

Розрахунок проводять за формулою:

$$\text{лужна фосфатаза (О/л)} = \frac{E_{np}}{E_{ст}} \times 160,$$

де  $E_{np}$  – екстинція дослідної проби;  $E_{ст}$  – екстинція стандарту.

### **5.7. Визначення активності термостабільної лужної фосфатази**

*Обладнання та реактиви:* такі самі, як для визначення загальної ЛФ.

*Хід визначення.* Аналогічний, але після внесення буферного розчину та додавання сироватки, контролю та стандарту пробірки прогривають у водяній бані 3 хв при 37 °С, після чого інкубують у водяній бані при 56–57 °С точно 15 хв. Зупиняють реакцію охолодженням пробірок протягом 5 хв у льодовій бані. Потім прогривають 5 хв при 37 °С, а далі роботу виконують так само, як при визначенні загальної ЛФ: додають по 0,2 мл розчину субстрату, інкубують при 37 °С точно 15 хв після чого додають по 2 мл розчину інгібітора в кожену пробірку.

Вимірювання та розрахунок проводять так, як описано в п. 5.6. Активність ізоферменту кісткової тканини вираховують за різницею значень активності загальної ЛФ та термостабільної ЛФ.

### **5.8. Визначення активності кишкового ізоферменту лужної фосфатази**

*Обладнання і реактиви:* такі самі, як для визначення загальної ЛФ; 5,0 ммоль/л розчин L-фенілаланіну; М.м. 165,2 ( 82,6 мг на 10 мл буфера). Готують перед використанням.

*Хід визначення.* У пробірки вносять по 0,9 мл буферного розчину і по 0,1 мл 5 ммоль/л розчину L-фенілаланіну, у дослідні пробірки додають 0,04 мл сироватки крові, для стандарту – 0,04 мл стандартного розчину; для контролю – 0,04 мл дистильованої води. Подальше дослідження проводять за методикою визначення загальної лужної фосфатази.

*Активність кишкової лужної фосфатази вираховують за різницею значень активності загальної ЛФ та незаінгібованої L-фенілаланіном ЛФ. Лужна фосфатаза каталізує відщеплення фосфатної групи з органічних моноєфірів фосфорної кислоти. Гідролітична активність ферменту призводить до підвищення концентрації аніонів фосфору на мембранах посмугової кайми, що полегшує направлений вхід фосфору в клітину. Можливо, існує й інший аспект дії лужної фосфатази. Низькомолекулярні фосфорні ефіри, які знаходяться на поверхні посмугової кайми, здатні взаємодіяти із системами, що транспортують фосфор через мембрани клітин, і таким чином блокують їхню функцію. Тому попереднє розщеплення ефірів за участі лужної фосфатази є необхідною умовою для оптимального всмоктування фосфору.*

Дія цього ферменту залежить від забезпеченості організму вітаміном D. При D-гіповітамінозі активність ізоферменту лужної фосфатази кишечника знижується, що погіршує всмоктування фосфору. Підвищення загальної активності лужної фосфатази в сироватці крові за таких умов є наслідком збільшення кількості ізоферменту кісткової тканини, який синтезується остеобластами.

*Діагностичне значення визначення активності лужної фосфатази. Лужна фосфатаза (ЛФ) активує відщеплення фосфатів з фосфорно-органічних сполук. Фермент розміщується в клітинах у зв'язаному з плазматичними мембранами стані. ЛФ складається із різних ізоферментів, які локалізуються переважно в епітелії жовчовивідних шляхів, плазматичних мембранах гепатоцитів і нейронів, кістках, кишечнику, плаценті, нирках. Надходження ферменту з різних тканин у кров залежить від віку, фізіологічного стану (тільність, роди, інтенсивність лактації) та стану здоров'я. Величини активності ЛФ у сироватці крові здорових тварин подані у додатку Г. Підвищення активності ЛФ у сироватці крові найчастіше реєструється при патології кісткової тканини та печінки. Ураження паренхіми печінки спричинює незначне зростання активності ферменту в сироватці крові, оскільки ЛФ тісно зв'язана з клітинними мембранами. У клінічній гепатології печінковий ізофермент є показовим для діагностики холестазу. Це пов'язано з підвищеним синтезом ЛФ клітинами жовчних протоків і порушенням виділення ензиму в жовч. Особливо високою є гіперферментемія при розвитку патологічного процесу та стазу жовчі в позапечінкових жовчних протоках. Тоді активність ензиму в сироватці крові зростає у*

десятки разів. При пошкодженні внутрішньопечінкових жовчних шляхів та інтрагепатитному холестазі активність ЛФ у крові підвищується лише у 2–3 рази.

При патології кісткової тканини, коли має місце підвищена активність остеобластів і остеокластів, під час розвитку рахіту, остеодистрофії, гіперпаратиреозидизмі у крові зростає активність кісткового ізоферменту ЛФ. У цих випадках активність загальної ЛФ у сироватці крові підвищується у 3–10 разів. Для ранньої діагностики рахіту та остеодистрофії специфічним є зростання активності фосфатази у синовіальній рідині. Зростання активності ЛФ у лікворі хворих органів є ознакою ураження мембран нейронів, де вона локалізується.

## 6. ДОСЛІДЖЕННЯ КИСЛОТНО-ОСНОВНОГО БАЛАНСУ

Кисотно-основним балансом називається співвідношення концентрації водневих і гідроксильних іонів у біологічних середовищах. Іони водню створюють кислу реакцію середовища, а гідроксильні іони та інші компоненти – лужну.

Основними буферними системами організму є *гідрокарбонатна, фосфатна, білкова і гемоглобінова*. Серед буферних систем плазми крові найважливішу роль відіграє *гідрокарбонатний* буфер ( $\text{H}_2\text{CO}_3 : \text{NaHCO}_3$ ).

### 6.1. Визначення лужного резерву крові дифузійним методом за допомогою здвоєних колб (за Кондрахіним І.П.)

*Принцип методу.* В одній половині колби плазма крові обробляється сірчаною кислотою, внаслідок чого виділяється вуглекислий газ, який знаходиться в складі бікарбонатів. Вуглекислий газ, що виділяється, поглинається розчином натрію гідроокису, який міститься у другій половині колби. Надлишок  $\text{NaOH}$ , що не прореагував з вуглекислим газом, і частину натрію вуглекислого ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ), який утворився у процесі поглинання  $\text{CO}_2$ , відтитрують розчином сірчаної кислоти. За часткою зв'язаного початкового  $\text{NaOH}$  визначають кількість виділеного з плазми крові  $\text{CO}_2$ , яка еквівалентна вмісту гідрокарбонатів ( $\text{NaHCO}_3$ ).

*Обладнання:* здвоєні колби з гумовими пробками (30 шт. і більше); мікробюретки на 2 і 5 мл; центрифужні пробірки з товстого скла.

*Реактиви:* 1) 0,1 н (0,05 моль/л) розчин сірчаної кислоти (готують із фіксаналу);

2) 0,02 н (0,01 моль/л) (точно) розчин сірчаної кислоти (готують із 0,1 н розчину сірчаної кислоти);

3) 0,1 н розчин натрію гідроокису, чда;

4) 0,02 н (0,02 моль/л) розчин натрію гідроокису (готують із 0,1 н (0,1 моль/л) розчину NaOH). Титр цього розчину перевіряють перед дослідженням і доводять до потрібної величини;

5) 5 %-ний розчин сірчаної кислоти, хч, чда;

6) 1 %-ний спиртовий розчин фенолфталеїну, чда.

Похибка методу  $\pm 3\%$ .

*Хід визначення.* У центрифужні пробірки вносять 0,5–1 мл вазелінового масла, 1–2 краплі 1 %-ного розчину гепарину. Кров беруть із яремної вени у підготовлену пробірку, закривають пробкою, обережно перемішують і центрифугують при 3000 об/хв протягом 20 хв. Плазму крові зберігають у холодильнику при температурі +4 °С під вазеліновим маслом.

За кількістю проб крові, враховуючи паралельні дослідження, підбирають здвоєні колби і не менше трьох здвоєних колб залишають для контролю. Точність результатів усієї серії досліджень залежить від точності титрування розчину NaOH у контрольних колбах. Усі колби закривають гумовими пробками.

Дослідження проводять серійно. В одну із кожної пари здвоєних колб, почергово відкриваючи, вносять за допомогою бюретки або піпетки (не видуваючи) по 2 мл 0,02 н розчину NaOH і щільно закривають пробкою. У суміжну колбу, крім контрольних (знову почергово відкриваючи і закриваючи), вносять із піпетки (не видуваючи) 0,5 мл плазми крові, яка знаходиться під вазеліновим маслом. Після цього в колби з плазмою (контрольні – без плазми) також почергово вносять із піпетки (не видуваючи) по 1 мл 5%-ного розчину сірчаної кислоти і швидко щільно закривають пробкою. Обережно круговими рухами перемішують плазму крові з кислотою і залишають на 4 год (можна більше). Перемішування плазми з кислотою проводять не менше 3-х разів. Потім (через 4 год або більше) розчини титрують. Для цього почергово відкривають колбу, де знаходиться розчин натрію гідроокису, вносять 1–2 краплі розчину фенолфталеїну і титрують із мікробюретки на 2 мл 0,02 н розчином сірчаної кислоти до повного знебарвлення розчину. Титрування дослідних і контрольних проб проводять із однаковою швидкістю.

За різницею результатів титрування в контрольних і дослідних зразках встановлюють кількість мл 0,02 н розчину натрію гідроокису, зв'язаного з вуглекислим газом, який утворився з бікарбонатів плазми. Розрахунок проводять за формулою:

$$\text{Хоб\% CO}_2 = \frac{(V_k - V_n) \times 0,448}{V_{\text{пл}}} \times 100; \text{ або } (V_k - V_n) \times 89,6,$$

де  $V_k$  – кількість 0,02 н розчину сірчаної кислоти (мл), яка використана на титрування контролю;  $V_n$  – кількість 0,02 н розчину сірчаної кислоти (мл), яка використана на титрування дослідного зразка;  $V_{\text{пл}}$  – кількість плазми крові у мл (0,5 мл); 0,448 – коефіцієнт перерахунку 0,02 н розчину NaOH на  $\text{CO}_2$  в умовах цієї реакції; 100 – коефіцієнт для перерахунку результатів аналізу на 100 мл плазми крові.

*Клінічне значення.* Норми лужного резерву у плазмі крові тварин наведені у таблиці 19.

Таблиця 19 – Норми лужного резерву в плазмі крові тварин

Вид тварин	Лужний резерв, об% $\text{CO}_2$
Велика рогата худоба	46–66
Вівці	48–60
Свині	45–55
Коні	50–65
Кури	48–55

Порушення кислотно-основного балансу може проявлятися у формі *ацидозу* або *алкалозу*. *Ацидоз* характеризується зменшенням лужного резерву крові і збільшенням концентрації іонів водню, порівняно з нормою. Величина рН при цьому знижується. У випадках, коли концентрація іонів водню знижується, а величина рН і лужний резерв крові підвищується, спостерігається стан алкалозу. Межа, несумісна з життям, настає, коли величина рН збільшується до 8,0. Залежно від механізму розвитку розладів, розрізняють чотири типи порушень кислотно-основного балансу, хоча частіше вони є змішаними: метаболічний і респіраторний ацидоз; метаболічний і респіраторний алкалоз.

За ступенем компенсації розрізняють *компенсовані* (величина рН крові не змінюється) та *некомпенсовані* (величина рН крові змінюється) форми. У практиці ветеринарної медицини найчастіше рееструють метаболічний ацидоз. Він розвивається внаслідок порушень проміжного обміну речовин у тканинах і нагромадження в них органічних

кислот (молочної, піровиноградної, ацетилоцтової та ін.), фосфатів і сульфатів. Причинами таких порушень можуть бути: а) недостатнє виділення або розпад цих метаболітів ураженими органами – печінкою, легеньми, нирками, кишечником; б) згодовування тваринам неякісних кормів, що містять надлишок органічних кислот, особливо масляної; в) концентратний тип годівлі. У жуйних тварин причиною метаболічного ацидозу є згодовування великої кількості кормів з надмірним умістом легкорозчинних вуглеводів – цукрових буряків, зернових концентратів, картоплі та інших, внаслідок чого утворюється значна кількість ЛЖК і молочної кислоти, розвивається ацидоз рубця і, як наслідок, – метаболічний ацидоз. Високопродуктивні корови в перші 8–10 тижнів лактації не компенсують витрат пластичного й енергетичного матеріалу для продукування молока за рахунок споживання кормів, тобто у них розвивається негативний енергетичний баланс. Цей дефіцит компенсується внутрішніми резервами організму, що супроводжується надмірним утворенням кетонових тіл і розвитком метаболічного ацидозу (*кетоацидоз*).

Компенсований ацидоз розвивається й тоді, коли тваринам довго не надають активний моціон, внаслідок чого в організмі нагромаджуються недоокиснені продукти обміну речовин, органічні кислоти, кетонові тіла, які зв'язують гідрокарбонати та інші лужні компоненти крові.

Метаболічний ацидоз також може бути наслідком захворювань – діареї різної етіології, рахіту, пневмонії, кетозу, хронічного румініту, нефриту та нефрозу, серцево-судинної та дихальної недостатності, діабету й інших хвороб. Механізм розвитку метаболічного ацидозу при цих хворобах різний. Так, при діареях молодняку важливе значення мають виведення із організму великої кількості бікарбонатів, дегідратація, порушення кровообігу і зумовлена цим гіпоксія, голодування. Внаслідок порушення постачання тканин киснем при захворюваннях легень і серця посилюється окиснення глюкози анаеробним шляхом, і в організмі накопичується молочна кислота, вміст якої визначає величину ацидозу (*лактоацидоз*).

При захворюваннях нирок (гломерулонефрит, піелонефрит) метаболічний ацидоз зумовлений зниженням рівня бікарбонатів і нагромадженням фосфатів, сульфатів та аніонів сильних органічних кислот у позаклітинній рідині, недостатньою секрецією іонів водню в сечу та іншими причинами.

Метаболічний ацидоз характеризується зниженням величини рН крові, парціального тиску вуглекислоти, бікарбонату і буферних основ крові. Значно виражений дефіцит буферних основ (ЗБО має негативний знак).

## 7. ДОСЛІДЖЕННЯ ПІГМЕНТНОГО ОБМІНУ

### 7.1. Визначення білірубіну в сироватці крові

(за методом Ієндрашика, Клеггорна і Грофа у модифікації Левченка В.І., Влізла В.В., 1988)

Білірубін є одним із кінцевих продуктів пігментного обміну. Через ряд проміжних стадій з гему зруйнованих еритроцитів утворюється не-проведений через печінку білірубін (непрямий, вільний), який є фізіологічною складовою частиною сироватки крові. Він є нерозчинним у воді і тому не виводиться з сечею. У клітинах печінки непрямий білірубін з'єднується з глюкуроною кислотою, утворюється прямий (кон'югований, проведений через печінку, холебілірубін). Вільний та кон'югований разом складають загальний білірубін.

Вміст білірубіну і його фракцій у сироватці крові визначають за методами Ієндрашика, Клеггорна і Грофа в модифікації В.І. Левченка і В.В. Влізла (1988).

*Принцип методу.* Діазореактив, який утворюється при взаємодії сульфанілової кислоти з натрієм азотистокислим, реагує з білірубіном сироватки крові, утворюючи комплекс рожево-фіолетового кольору. Кон'югований (прямий) білірубін дає швидку (пряму) реакцію азотозв'язування, а вільний (некон'югований) білірубін – лише при додаванні кофеїнового реактиву.

*Обладнання:* КФК-2, КФК-3, водяна баня, мірні колби, піпетки на 1; 2 мл, пробірки.

*Реактиви:* 1) 0,85 %-ний розчин натрію хлориду, чда;

2) к о ф е ї н о в и й р е а к т и в: 5 г чистого кофеїну (ч), 7,5 г натрію бензойнокислого (ч), 12,5 г натрію оцтовокислого (ч) розчиняють у 90 мл дистильованої води, нагрівають до 50–60 °С, перемішують. Після охолодження доводять дистильованою водою до 100 мл. Термін зберігання – 2 тижні;

3) д і а з о с у м і ш:

а) *діазореактив 1* : 5 г сульфанілової кислоти розчиняють при нагріванні в 300–400 мл дистильованої води, додають 15 мл концентрова-

ної сірчаної кислоти (ч, відносна густина 1,19). Після повного розчинення сульфанілової кислоти і охолодження розчину доливають дистильованою водою до 1 л. Реактив стійкий, зберігають у посуді з темного скла;

б) *діазореактив 2* : 0,5 %-ний розчин натрію азотнокислого (хч), зберігають у посуді з темного скла протягом 2–3 тижнів. Перед роботою змішують 10 мл діазореактиву 1 і 0,3 мл діазореактиву 2.

*Хід визначення.* У чотири пробірки вносять по 0,5 мл розведеної вдвічі сироватки крові. Перша пробірка є контролем для визначення загального білірубіну. У неї додають 0,25 мл ізотонічного розчину натрію хлориду і 1,75 мл кофеїнового реактиву. У другій пробірці визначають вміст загального білірубіну: додають 0,25 мл діазореактиву і 1,75 мл кофеїнового розчину.

Третя пробірка є контролем для прямого (кон'югованого) білірубіну. У неї вносять 2 мл ізотонічного розчину. У четверту пробірку вносять 1,75 мл ізотонічного розчину натрію хлориду і 0,25 мл діазосуміші. У ній визначають кон'югований білірубін (табл. 20).

Таблиця 20 – Схема постановки реакції для визначення білірубіну

Реактиви, мл	Контроль для загального білірубіну	Загальний білірубін	Контроль для кон'югованого білірубіну	Кон'югований білірубін
Розведена вдвічі сироватка крові	0,5	0,5	0,5	0,5
Кофеїновий реактив	1,75	1,75	–	–
0,85 %-ний розчин NaCl	0,25	–	2,0	1,75
Діазосуміш	–	0,25	–	0,25

*Кон'югований білірубін* визначають через 5 хв після додавання діазосуміші, а *загальний* – через 20 хв при довжині хвилі 560 нм у кюветах з товщиною робочого шару 5 мм проти дистильованої води. Від показників оптичної густини проб із визначення загального та кон'югованого білірубіну віднімають показники оптичної густини відповідних контролів і за калібрувальним графіком або таблицею визначають вміст загального та кон'югованого білірубіну в мг на 100 мл сироватки крові, або в мкмоль/л, а за різницею між ними – вміст вільного (некон'югованого) білірубіну.



Побудова калібрувального графіка проводиться за допомогою набору білірубін-стандарту фірми “Лахема” (Чехія).

*Реактиви:* 1) стандарт білірубину для приготування розчину (в мкмоль/л) – 2 флакони;

2) альбумін для приготування розчину (20 г/л) – 2 флакони.

*Приготування розчину білірубину.* У флакон з реактивом 1 відмірюють точно 4 мл дистильованої води і обережно перемішуючи розчиняють його вміст. Розчин містить точно таку концентрацію білірубину (у мкмоль/л), яка вказана на етикетці флакона 1. Зберігають у темному місці при температурі +5 °С протягом 3-х днів.

*Приготування розчину альбуміну.* У флакон з реактивом 2 відмірюють точно 8 мл дистильованої води і обережно перемішуючи розчиняють його вміст. Розчин містить 20 г/л альбуміну. При температурі +5°С розчин стійкий протягом одного тижня.

Для побудови калібрувального графіка готують ряд розведень з різним умістом білірубину (табл. 21).

До отриманих розведень додають по 1,75 мл кофеїнового реактиву і по 0,25 мл діазосуміші. При появі помутніння можна додати по 3 краплі 30 %-ного розчину NaOH. Визначення проводять так само, як дослідні проби через 20 хв.

Таблиця 21 – Розведення білірубину для побудови калібрувального графіка

№ розчину	Розчин білірубину, мл	Розчин альбуміну, мл	Кількість білірубину в пробі, мкмоль/л
1	0,10	1,90	0,050
2	0,25	1,75	0,125
3	0,50	1,50	0,250
4	0,75	1,25	0,375
5	1,00	1,00	0,500

## 7.2. Визначення білірубину за методом Існдрашика, Клеггорна і Грофа

*Обладнання:* фотоелектроколориметр (КФК-2, КФК-3), водяна баня, мірні колби, піпетки на 1; 2 мл, пробірки.

*Реактиви:* 1) реагент 1 – 15 мг NaNO<sub>2</sub>, хч;

2) реагент 2 – 60 мл 0,5 % -ної сульфанілової кислоти;

3) буферний розчин 1 (кофеїновий реактив) – 150 мл;

4) буферний розчин 2–10 мл.

Використовують набір реактивів НВФ “Simko Ltd” (м. Львів).

Приготування буферного розчину для визначення загального білірубіну (кофеїновий реактив). Вміст флакона з буферним розчином 1 у мірному посуді доводять дистильованою водою до кінцевого об'єму 200 мл, перемішують. Розчин зберігають у посуді з темного скла.

Приготування буферного розчину для визначення кон'югованого (прямого) білірубіну. Вміст флакона з буферним розчином 2 переносять у мірний посуд і доводять дистильованою водою до кінцевого об'єму 220 мл.

Приготування діазореактиву. Безпосередньо перед визначенням змішують 10 частин реагенту 3 і 0,3 частини реагенту 2 (за об'ємом). Розчин готують перед використанням.

Хід визначення. У 4 пробірки (для визначення загального і кон'югованого білірубіну, а також – контрольні) додають реагенти відповідно до схеми (табл. 22).

Таблиця 22 – Схема визначення білірубіну

Розчин, мл	Контроль для загального білірубіну	Загальний білірубін	Контроль для кон'югованого білірубіну	Кон'югований білірубін
Сироватка крові	0,50	0,50	0,50	0,50
Кофеїновий реактив	1,75	1,75	1,75	–
Буферний розчин (кон'югований білірубін)	–	–	0,25	1,75
Діазобарвник	–	0,25	–	0,25
0,85 %-ний розчин NaCl	0,25	–	–	–

Для визначення кон'югованого (прямого) білірубіну оптичну густину проби вимірюють через 5–10 хв (при довготривалому стоянні в реакцію вступає непрямий білірубін), а загального – через 20 хв. Вміст некон'югованого білірубіну визначають як різницю між рівнями загального і кон'югованого білірубіну. Контроль на мутність сироватки ставлять для кожної проби.

Оптичну густину проб визначають за калібрувальним графіком, який готують попередньо, використовуючи білірубін-стандарт.

Фізіологічні величини вмісту білірубіну в сироватці крові тварин наведені в таблиці 23.

Збільшення кількості білірубину в сироватці крові – *гіпербілірубінемія* – спостерігається при захворюваннях, які супроводжуються гемолізом еритроцитів за рахунок збільшення в крові некон’югованого (непрямого, вільного, не проведеного через печінку) білірубину (піроплазмідози, лептоспіроз, отруєння речовинами, що спричинюють гемоліз еритроцитів).

Таблиця 23 – Кількість білірубину в сироватці крові тварин

Вид тварин	Загальний білірубін		Кон’югований білірубін	
	мг/100 мл	мкмоль/л	мг/100 мл	мкмоль/л
Корови	0,1–0,6	1,71–10,3	–	–
Телята	0,22–0,30	3,7–5,1	–	–
Вівці	0–0,4	0–6,84	0–0,1	0–1,71
Коні	0,23–0,85	4–14,5	0,03–0,2	0,5–3,5
Лошата	0,47–0,93	8,0–16,0	0,12–0,20	2,0–3,4
Свині	0–0,4	0–6,84	–	–
Кури	0,1–0,35	1,71–6,0	–	–
Собаки	0,02–0,23	0,4–4,5	–	–

Збільшення вмісту кон’югованого білірубину спостерігається у тварин при механічній жовтяниці, а одночасне підвищення вмісту обох фракцій пігменту – при паренхіматозній жовтяниці, зумовленій гепатитом або гепатодистрофією.

### 7.3. Визначення кількості гемоглобіну в крові гемігلوبінціанідним методом

(за Піменовою Л.М. та Дервізом Г. В.)

Гемоглобін – це дихальний фермент крові, який міститься в еритроцитах і забезпечує транспорт кисню з легень до тканин та вуглекислоти з тканин до легень, входить до складу гемоглобінової буферної системи крові, яка бере участь у регуляції кислотно-основного балансу. Синтезується гемоглобін у червоному кістковому мозку, а руйнується через 110–130 днів життя еритроцитів у клітинах фагоцитувальних мононуклеарів.

Існують *фізіологічні* й *патологічні* типи гемоглобіну. До фізіологічних відносять гемоглобін А (гемоглобін дорослих) з його трьома видами (Hb A<sub>1</sub>, Hb A<sub>2</sub> і Hb A<sub>3</sub>) та гемоглобін фетальний (Hb F), який становить основну кількість гемоглобіну плода. Патологічні види ге-

моглобіну (В, С, D, Е та ін.) виникають у результаті уродженого дефекту синтезу гемоглобіну, вони передаються потомству і є основою розвитку гемоглобінопатій (гемоглобінозів), які можуть бути причиною анемії гемолітичного типу.

Гемоглобін може вступати в сполуки не лише з киснем (*оксигемоглобін*) та вуглекислою (*карбогемоглобін*), але й з іншими газами та речовинами. При сполученні з окисом вуглецю (СО) утворюється *карбоксигемоглобін*, з нітритами (нітритотоксикоз) – *метгемоглобін*, а при сполученні з сульфаніламидами – *сульфогемоглобін*, який також не може транспортувати кисень.

*Принцип методу.* Гемоглобін при взаємодії з калієм залізо-синеродистим і ацетонціангідрином окиснюється в кольоровий геміглобін-ціанід, інтенсивність забарвлення якого пропорційна концентрації гемоглобіну.

*Обладнання:* КФК-2, КФК-3, пробірки, піпетки мірні на 0,02 мл і 5 мл, колби мірні.

*Реактиви:* 1) реагент 1 – 5 %-ний розчин  $\text{NaHCO}_3$ , хч; – 100 мл;

2) реагент 2 – 1 %-ний розчин  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ , (хч), що містить 2,5 %-ний розчин ацетонціангідрину, чда; – 100 мл;

3) стандартний розчин гемоглобіну – 25 мл.

*Використовують набір реактивів НВФ “Simko Ltd” (м. Львів).*

*Приготування робочого розчину (реагенту Дрбкіна):* до 1 об'єму реагента 1 додають 1 об'єм реагента 2 і 48 об'ємів дистильованої води. Суміш перемішують і зберігають у колбі з темного скла.

*Хід визначення.* До 5 мл робочого розчину в пробірку додають 0,02 мл крові і перемішують. Аналогічно готують стандартну пробу. Через 10–15 хв на фотоелекторокориметрі (КФК-2, КФК-3) при довжині хвилі 540 нм (зелений світлофільтр) у кюветі з товщиною робочого шару 10 мм визначають оптичну густину дослідної проби і стандарту проти контрольного розчину (робочий розчин або дистильована вода). За формулою чи калібрувальним графіком визначають уміст гемоглобіну в крові (г/100 мл або г/л):

$$\text{Гемоглобін (г/100 мл)} = (E_{\text{досл.}} : E_{\text{ст.}}) \times 59,75 \times 251 \times 0,001,$$

де  $E_{\text{досл.}}$  – оптична густина дослідної проби;  $E_{\text{ст.}}$  – оптична густина стандарту; 59,75 – концентрація геміглобінціаніду в стандартному розчині; 251 – розведення крові, 0,001 – коефіцієнт для перерахунку в г/100 мл.

Для побудови калібрувального графіка готують ряд розведень з різним умістом гемоглобіну (табл. 24).

Таблиця 24 – Розведення гемоглобіну для побудови калібрувального графіка

№ п/п	Стандартний розчин, мл	Робочий розчин, мл	Уміст гемоглобіну в крові, г/л
1	–	3,0	контрольний розчин
2	1,0	2,0	50,0
3	2,0	1,0	100,0
4	3,0	–	150,0

**Примітка.** Вимірювання проводять проти контрольного розчину

Вміст гемоглобіну в крові тварин різних видів коливається у значних межах (табл. 25).

Таблиця 25 – Уміст гемоглобіну в крові тварин

Вид тварин	г/100 мл	г/л	Вид тварин	г/100 мл	г/л
Велика рогата худоба	9,5–12,5	95–125	Качки	10,0–12,5	100–125
Вівці	9,0–13,5	90–135	Гуси	9,0–13,5	90–135
Кози	10,0–15,0	100–150	Індики	7,0–11,0	70–110
Коні	9,0–14,0	90–140	Кролі	10,5–12,5	105–125
Свині	9,0–11,0	90–110	Норки	15,0–17,5	150–175
Собаки	14,0–21,0	140–210	Песці	12,0–17,0	120–170
Коти	10,0–14,0	100–140	Соболі	13,0–16,0	130–160
Кури	8,0–12,0	80–120	Лисиці сріблясто-чорні	12,0–16,0	120–160

*Збільшення* вмісту гемоглобіну в крові тварин – *плейохромія, гіперхромемія* – спостерігається при згущенні крові (діарея, утворення ексудатів, трансудатів), серцево-легеневій недостатності і збігається, як правило, зі збільшенням кількості еритроцитів.

*Зменшення* кількості гемоглобіну – *олігохромемія* – спостерігається при анеміях різного походження, причиною яких є дефіцит міді, кобальту, заліза, вітамінів В<sub>2</sub>, В<sub>12</sub>, В<sub>с</sub>, С, кровотечі, посиленій гемоліз еритроцитів при піроплазмідозах, лептоспірози, інфекційній анемії коней, пригнічення функції кісткового мозку різними токсинами.

## 8. ДОСЛІДЖЕННЯ ОБМІНУ ВІТАМІНУ А

Вітаміни – це незамінні фактори живлення, які виконують функцію біологічних каталізаторів, забезпечуючи розвиток організму тварин і людей. Джерелом вітамінів для тварин є переважно корми рослинного і меншою мірою – бактеріального та тваринного походження.

Сучасна класифікація вітамінів ґрунтується на їхніх фізико-хімічних властивостях, зокрема розчинності та хімічній природі. Залежно від розчинності, розрізняють вітаміни *жиророзчинні* (А, D, Е, К) і *водорозчинні* (В<sub>1</sub>, В<sub>2</sub>, В<sub>3</sub>, В<sub>5</sub>, В<sub>6</sub>, В<sub>12</sub>, В<sub>с</sub>, Н, С, Р). Окрім цих двох основних груп вітамінів, виділяють групу різноманітних хімічних сполук, що мають вітамінні властивості – *вітаміноподібні речовини*, до яких, зокрема, належать холін, вітаміни В<sub>13</sub> і В<sub>15</sub>, інозит, убіхінон, карнітин, ліолева і ліоленова кислоти (вітамін F), вітамін U (S-метилметіонін), параамінобензойна кислота.

### 8.1. Визначення вітаміну А та каротину в сироватці крові і молозиві (за методом Бессея О. в модифікації Левченка В.І. зі співавт., 1998)

*Принцип методу* полягає у лужному гідролізі та екстракції вітаміну А і каротину з сироватки крові (молозива) за допомогою малолетких розчинників з наступним спектрофотометричним вимірюванням ступеня поглинання світла розчином до і після руйнування вітаміну А під дією ультрафіолетових променів.

*Обладнання:* СФ-16, СФ-46 або фотоелектроколориметри КФК-2, КФК-3, ртутно-кварцова лампа ДРТ-400, вентилятор настільний, водяна баня, пробірки центрифужні циліндричні та пробірки об'ємом 10 мл з притертими пробками зі скла “пірекс” або з кварцового скла, які пропускають ультрафіолетове проміння, піпетки.

- Реактиви:* 1) спирт етиловий 96°;  
2) калію гідроокис, хч;  
3) ксилол, ч;  
4) октан, хч.

*Приготування реактивів:* а) 11 N-ний розчин КОН у 96°-ному етанолі (для приготування 100 мл розчину КОН необхідно до 5,6 г КОН додати 6,0 мл дистильованої води, розчинити його і довести етанолом об'єм до 100 мл, після чого суміш старанно перемішати); б) ксилол-октанова суміш (аа), яку готують за кілька годин до роботи.

*Хід визначення.* У центрифужні пробірки вносять по 2 мл сироватки крові (молозива) і спиртового розчину КОН, перемішують тонкою скляною паличкою до утворення однорідної суміші. Пробірки ставлять для гідролізу у водяну баню на 20 хв при 60°C (через кожні 10 хв перемішують). Після гідролізу пробірки охолоджують протягом 10 хв у морозильній камері холодильника. У кожен пробірку додають по 4 мл ксилол-октанової суміші, пробірки закривають пробками, інтенсивно струшують протягом 2–3 хв, знову охолоджують 5–7 хв, а потім центрифугують 10–15 хв при 1500–3000 об/хв. Верхній шар, що містить екстракт вітаміну А і каротиноїдів у ксилол-октановій суміші, відбирають піпетками у пробірки зі скла “пірекс”. Фотометрію проводять у кюветі з товщиною робочого шару 10 мм, а для контролю використовують ксилол-октанову суміш. Визначення каротину на СФ-46 проводять при довжині хвилі 460 нм, ретинолу – 328 нм (на КФК-2 або КФК-3 відповідно 440 і 315 нм). Оптичну густину суміші для визначення вітаміну А вимірюють повторно після опромінення пробірок ультрафіолетовими променями протягом 50 хв, для чого пробірки зі скла “пірекс” щільно закривають притертими скляними пробками і ставлять на віддалі 15–20 см від лампи ДРТ-400 або ПРК-5. Для охолодження пробірок під час опромінення використовують два настільні вентилятори. За різницею значень оптичної густини, отриманої при фотометрії до і після опромінення, визначають концентрацію вітаміну А у сироватці крові (молозиві).

Розрахунок проводиться за формулами:

$$\text{вітамін А, мкг/100 мл} = (E_1 - E_2) \times 1274 \text{ (на СФ-16, СФ-46) або} \\ (E_1 - E_2) \times 1500 \text{ (на КФК-2, КФК-3),}$$

де  $E_1$  – екстинція розчину до опромінення при довжині хвилі 315 нм;  $E_2$  – екстинція розчину після опромінення при довжині хвилі 315 нм; 1274 та 1500 – коефіцієнти для визначення вітаміну А;

$$\text{каротин, мкг/100 мл} = E \times 762 \text{ (на СФ-16; СФ-46) або} \\ E \times 850 \text{ (КФК-2; КФК-3),}$$

де  $E$  – екстинція розчину при довжині хвилі 440 нм; 762 та 850 – коефіцієнти для визначення каротину.

Кількість каротину в сироватці крові залежить від віку і виду тварин. У новонароджених телят містяться сліди каротину, в одномісячних – 20–50 мкг/100 мл, у молодняку 3–6-місячного віку – 250–800, у тварин більш старшого віку і корів – 450–1250 мкг/100 мл. У пасовищний період уміст каротину може сягати 2 мг/100 мл сироватки. Незважаючи на те, що каротин засвоюється телятами з перших днів життя, оцінювати стан А-вітамінного обміну в телят за цим показником неможливо до 2–3-місячного віку, оскільки кількість його незначна, а зміни

непоказові. У сироватці крові свиней, коней, кіз та овець каротин відсутній.

Кількість каротину в сироватці крові свідчить про надходження його з кормами, але він не є критерієм забезпеченості тварин вітаміном А. Навіть при низькому вмісті каротину в сироватці крові А-гіповітаміноз може не розвиватися, тому що до складу преміксу входить ретинол. За певних умов (нестача йоду) А-гіповітаміноз, навпаки, розвивається при нормальній кількості каротину в сироватці крові.

Низький уміст каротину в сироватці крові корів – *гіпокаротинемія* (менше 450 мкг/100 мл) – є показником недостатнього надходження провітаміну у складі кормів раціону, руйнування його антивітамінами в передшлунках і кишечнику, порушення засвоєння у тонких кишках при їх запаленні або патології печінки. Критичним рівнем для корів є вміст 300–350 мкг у 100 мл сироватки крові (Душейко А.А., 1989; Левченко В.І., Сахнюк В.В., 1996).

Зважаючи на обмежену діагностичну інформативність визначення каротину, в практиці ветеринарної медицини останнім часом все більшого значення набуває визначення ретинолу в різних субстратах: сироватці крові, молозиві, печінці, жовтках яєць. У здорових новонароджених телят у перший день життя концентрація вітаміну А в сироватці крові становить 4–12, у 5–10-денних – 9–15 мкг/100 мл, місячного віку – 12,5–25 (Левченко В.І., Сахнюк В.В.), тримісячного – 15–35, у 6–12-місячного молодняку – 30–80 (Щуревич Г.О., 1986), у корів у стійловий період – 25–80, літній – 40–150; у вівцематок і коней – 15–25; у новонароджених поросят – 10–40, поросят-сисунів до місячного віку – 15–50, відлучених та свиней на відгодівлі – 30–70, свиноматок – 20–50; у птиці – 50–230 мкг/100 мл.

А-вітамінна недостатність розвивається за вмісту ретинолу в сироватці крові телят місячного віку менше 12 мкг у 100 мл, 2–3-місячного – 15, молодняку – 20, корів – 25, овець – 12, свиней – 15, коней – 10, птиці – 25 мкг/100 мл; у печінці одноденних курчат і гусенят менше 20 мкг/г, каченят – 15, індиченят – 30 мкг/г; у жовтках яєць курей менше 6 мкг/г, індиків – 7, качок – 8, гусей – 10 мкг/г. Мінімальний уміст каротину в 1 г жовтка яєць курей та індичок 15 мкг, качок і гусей – 20 мкг. У молозиві корів, свиноматок і вівцематок у перший день лактації має міститися не менше 3 мг ретинолу в 1 л. Критичний уміст ретинолу в молозиві першого–другого надоїв становить 2,3 мг/л.



## 9. ДОСЛІДЖЕННЯ ОБМІНУ МАКРО- І МІКРОЕЛЕМЕНТІВ

Із 92 елементів, що зустрічаються у природі, 81 знайдений в організмі тварин. Залежно від кількості, в якій вони містяться в організмі, мінеральні елементи поділяються на 3 групи: а) макроелементи – Ca, P, Mg, K, Na, S, Cl, вміст яких коливається в межах від 9 до 0,09 % маси тіла;

б) мікроелементи – Fe, Zn, F, Sr, Mo, Cu, Br, Si, Cs, J, Mn, Al, Pb, Cd, B, Rb, кількість яких становить  $10^{-3}$ – $10^{-5}$  % до маси тіла;

в) ультрамікроелементи – Se, Co, V, Cr, As, Ni, Li, Ba та інші, вміст яких становить від  $10^{-6}$  до  $10^{-12}$  %.

Найбільший інтерес для біохіміків і клініцистів становить класифікація, яка ґрунтується на біологічній ролі елементів. Згідно з цією класифікацією, мінеральні елементи поділяють на три групи: а) *життєво необхідні* (біогенні, біотичні, есенціальні); б) *умовно необхідні*; в) елементи, роль яких в організмі *вивчена мало або невідома*.

Група біотичних елементів включає в себе всі макроелементи і кілька мікроелементів: цинк, марганець, залізо, мідь, кобальт, йод, селен, молібден. Ці елементи відповідають таким вимогам:

- вони постійно присутні в організмі тварин приблизно в однаковій кількості в різних індивідуумів;
- синтетичний раціон, який не містить цього елемента, спричинює у тварин характерні симптоми недостатності і типові біохімічні зміни;
- симптомам і змінам можна запобігти або усунути їх шляхом включення цього елемента в експериментальний раціон.

### 9.1. Визначення загального кальцію в реакції з кальційарсеназо III

*Принцип методу.* Кальцій утворює з барвником комплекс фіолетового кольору, який визначають фотометрично при довжині хвилі 590–650 нм. Метод є уніфікованим.

*Обладнання:* КФК-2, КФК-3, піпетки на 1; 5 мл, пробірки.

*Реактиви:* 1) реагент для визначення кальцію (робочий) – 0,008 % - ний розчин арсеназо III в 0,05 М трис-НCl або ацетатному буфері з рН 6,7–6,8;

2) еталон кальцію (0,025 М CaCl<sub>2</sub> в 0,02 М HCl).

*Використовують набір реактивів НВФ "Simko Ltd" (м. Львів).*

*Приготування* робочого реагенту для визначення кальцію: змішують 1 об'єм концентрованого розчину реагенту для визначення кальцію з 19-ма об'ємами бідистильованої води. Розчин стабільний при зберіганні в холодильнику протягом 10-ти діб.

*Калібрувальний розчин:* змішують 1 мл еталону кальцію з 9 мл бідистильованої води. Отриманий розчин містить 2,5 ммоль/л кальцію (10 мг в 100 мл). Розчин стабільний при зберіганні в холодильнику кілька тижнів.

*Хід визначення.* До 4 мл робочого розчину реагенту для визначення кальцію додають 0,05 мл дослідної сироватки крові (або іншого субстрату). Суміш перемішують. Одночасно ставлять також калібрувальну пробу (до 4 мл робочого розчину реагенту додають 0,05 мл калібрувального розчину). Витримують 5–10 хв при кімнатній температурі і колориметрують при довжині хвилі 590–650 нм на спектрофотометрі або фотоелектроколориметрі проти контролю в кюветі товщиною 10 мм.

*Контроль:* до 4 мл реагенту додають 0,05 мл дистильованої води.

Вміст кальцію вираховують за формулою:

$$Ca_{\text{ммоль/л}} = \frac{E_{\text{досл}} \times 2,5 \text{ ммоль/л}}{E_{\text{ст}}}$$

де  $E_{\text{досл}}$  і  $E_{\text{ст}}$  – поглинання відповідно дослідної проби і калібрувального розчину з концентрацією 2,5 ммоль/л.

Показники вмісту кальцію в сироватці крові тварин наведено у таблиці 26.

*Зниження* вмісту кальцію у сироватці крові – *гіпокальціємія* – діагностується при тривалій нестачі кальцію в раціоні, порушенні засвоєння його внаслідок дефіциту вітаміну D і паратгормону, при рахіті, остеодистрофії, післяродовій гіпокальціємії (родильному парезі). Хвороби печінки при хронічному перебізі (гепатит, гепатоз, цироз) також сприяють розвитку гіпокальціємії, оскільки в печінці знижується синтез першого біологічно активного метаболіту холекальциферолу – 25-гідроксихолекальциферолу (Левченко В.І., 1986), з якого у нирках утворюються інші метаболіти (1,25- та 24,25-дигідроксихолекальциферол), відповідальні за синтез в ентероцитах кальцієзв'язувального білка. Крім того, при хворобах печінки зменшується виділення жовчі та синтез жовчних кислот, які сприяють всмоктуванню важкорозчинних солей кальцію та вітаміну D.

Таблиця 26 – Вміст загального кальцію в сироватці крові здорових тварин

Вид тварин	Загальний кальцій	
	мг/100 мл	ммоль/л
Велика рогата худоба (дорослі тварини)	9,5–12,5	2,38–3,13
Телята	10–12,5	2,5–3,13
Вівці	9,5–13,5	2,38–3,38
Кози	10–13	2,5–3,25
Коні	10–14	2,5–3,5
Свині (дорослі)	10–12	2,5–3,0
Поросята відлучені	10–13	2,5–3,25
Собаки	9,2–12,0	2,3–3,0
Кішки	8,0–14,0	2,0–3,5
Кури (непродуктивний період)	18,0–20,0	4,5–5,0
Кури (продуктивний період)	24,0–38,0	6,0–9,5
Індики (продуктивний період)	26,0–42,0	4,0–4,5

Ураження нирок (нефрит, нефроз, нефролітаз) також спричиняє гіпокальціємію. При нефриті, й особливо нефрозі, настає гіпопротеїнемія внаслідок втрати з сечею альбумінів, з якими частково зв'язаний кальцій сироватки крові. Крім того, при нефропатії спостерігається зниження синтезу метаболітів холекальциферолу, рівня кальцію та неорганічного фосфору в сироватці крові (Апуховська Л.І. зі співавт., 2002).

*Підвищення* вмісту кальцію в сироватці крові (*гіперкальціємія*) діагностується при передозуванні препаратів вітаміну D, згодовуванні тваринам рослин, що містять дигідроксивітамін D<sub>3</sub>, гіперфункції прищитоподібних залоз.

## 9.2. Визначення неорганічного фосфору

У крові фосфор міститься у вигляді органічних та неорганічних сполук. Органічний фосфор зв'язаний з білками та ліпідами. У клінічній практиці діагностичне значення має визначення неорганічного фосфору, яке здійснюють реакціями з ванадат-молібденовим реактивом (за Пулсом у модифікації Коромислова В.Ф. і Кудрявцевої Л.А.) та з аскорбіновою кислотою (у модифікації Івановського С.А.). При зберіганні сироватки крові органічний фосфор розкладається зі збільшенням неорганічного. Щоб уникнути помилки при дослідженні, не-

обхідно проводити аналіз лише свіжої сироватки крові або одержувати її безбілковий фільтрат після додавання трихлороцтової кислоти.

### **9.2.1. Визначення неорганічного фосфору в сироватці крові** (за методом УФ-детекції фосфомолібдатного комплексу)

**Принцип методу.** Неорганічний фосфор реагує з молібдатом амонію з утворенням фосфомолібдатного комплексу, що має максимум поглинання, величина якого пропорційна концентрації неорганічного фосфору.

**Обладнання:** КФК-2, КФК-3, піпетки на 0,2; 5 мл, пробірки.

**Реактиви:** 1) молібденовий реактив – 0,39 М амоній молібденовокислий у 0,21М H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> за присутності поверхнево-активних речовин;

2) стандартний розчин фосфору (50 мкг/мл) у вигляді KН<sub>2</sub>РO<sub>4</sub>).

**Використовують набір реактивів НВФ "Simko Ltd" (м. Львів).**

**Хід визначення.** До 0,1 мл дослідної проби сироватки крові додають 3,0 мл молібденового реактиву. Суміш перемішують. Витримують 20 хв при кімнатній температурі і колориметрують при довжині хвилі 340 нм на спектрофотометрі або фотоелектроколориметрі проти контролю у кюветі з товщиною робочого шару 10 мм.

Аналогічно досліджують стандартний розчин фосфору.

**Контроль:** до 0,1 мл дистильованої води додають 3,0 мл молібденового реактиву. Забарвлення стабільне протягом 1 год.

Вміст неорганічного фосфору визначають за формулою:

$$P \text{ (мкг/мл)} = \frac{E_{\text{досл}} \times 50}{E_{\text{ст}}}$$

де  $E_{\text{досл}}$  і  $E_{\text{ст}}$  – екстинція поглинання відповідно дослідної проби та стандартного розчину; 50 мкг/мл – концентрація фосфору у стандартному розчині.

**Наприклад:** екстинція поглинання дослідної проби – 0,85, а стандартного розчину – 1,15. Вміст неорганічного фосфору у дослідній пробі буде становити:  $0,85 \times 50 : 1,15 = 36,95$  мкг/мл (3,695 мг в 100 мл).

**Примітки:** 1. При концентрації неорганічного фосфору більше 80 мкг/мл, пробу сироватки крові необхідно розвести дистильованою водою і повторити дослідження (результат помножити на ступінь розведення).

2. Якщо вміст фосфору менший 20 мкг/мл, об'єм проби збільшують до 0,2 мл (отриманий результат поділити на 2).

3. Для перерахунку в одиниці SI (ммоль/л) одержаний результат в мг/100 мл необхідно помножити на коефіцієнт 0,3229.

Фізіологічні величини вмісту неорганічного фосфору в сироватці крові тварин наведено в таблиці 27.

Концентрація неорганічного фосфору у сироватці крові збільшується (*гіперфосфатемія*) при надлишку його у раціоні, передозуванні вітаміну D та зниженні активності прищитоподібних залоз (збільшується реабсорбція фосфору в нирках), гломерулонефриті, нефротичному синдромі.

Таблиця 27 – Вміст неорганічного фосфору в сироватці крові здорових тварин

Вид тварин	Неорганічний фосфор	
	мг/100 мл	ммоль/л
Велика рогата худоба (дорослі тварини)	4,5–6,5	1,45–2,1
Телята	5,5–7,5	1,78–2,42
Вівці	4,5–7,5	1,45–2,42
Коні	4,5–5,5	1,45–1,78
Кози	6,0–8,0	1,94–2,58
Свині (дорослі)	4,5–6,5	1,45–2,1
Поросята відлучені	5,5–8,0	1,78–2,58
Собаки	4,5–6,0	1,45–1,94
Кішки	4,5–8,0	1,5–2,60
Кролі	2,5–3,5	0,81–1,13
Норки	2,5–6,5	0,81–2,1
Песці	2,0–5,0	0,66–1,62
Лисиці	2,0–5,2	0,66–1,68
Кури (продуктивний період)	5,3–6,8	1,7–2,2

*Зниження* вмісту неорганічного фосфору в сироватці крові (*гіпофосфатемія*) спостерігається при нестачі його в раціоні тварин, недостатньому засвоєнні внаслідок розладів функцій травного каналу, дефіциті вітаміну D, а також при гіперфункції прищитоподібних залоз (збільшується виділення фосфору із сечею внаслідок зменшення його реабсорбції у ниркових каналцях), аліментарній остеодистрофії, рахіті та інших хворобах.

### ***Значення вітаміну D в гомеостазі кальцію та фосфору***

У регуляції гомеостазу кальцію і фосфору важлива роль належить вітамінам групи D. Найбільш поширені вітамін D<sub>2</sub>, або ергокальциферол, і вітамін D<sub>3</sub> – холекальциферол. У печінці з них синтезується 25-гідроксихолекальциферол (25ОН D<sub>3</sub>), активність якого в 1,5–2 рази

вища, порівняно з початковою. Він є основною транспортною формою вітаміну D<sub>3</sub>. 25OHD<sub>3</sub> транспортується в нирки, де утворюються гормонально активні метаболіти вітаміну D<sub>3</sub> – 1,25- і 24,25-дигідроксихолекальциферол. Активність утворених у нирках метаболітів у 5–10 разів перевищує активність вихідного вітаміну. Під їх впливом у стінці тонкого кишечника синтезується кальцієзв'язувальний білок, який забезпечує транспорт кальцію в епітеліальних клітинах кишечника, поліпшує абсорбцію кальцію завдяки збільшенню проникності плазматичних мембран. Посилення всмоктування неорганічного фосфору в кишечнику під впливом вітаміну D є вторинним ефектом, пов'язаним з абсорбцією кальцію. Є дані про те, що всмоктування кальцію та фосфору – незалежні процеси. Вплив вітаміну D на гомеостаз фосфору може бути прямим і посереднім. Прямий вплив пов'язаний з посиленням всмоктування фосфору з кишечника і реабсорбцією його в нирках. Посередній вплив пов'язаний зі зниженням рівня паратгормону, що зменшує виділення фосфатів з сечею.

Доведено вплив метаболітів вітаміну D<sub>3</sub>, зокрема 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, на абсорбцію фосфору в кишечнику, проте поки що не вдалося виділити з нього специфічний для вітаміну D білок, який би брав участь у транспорті фосфору. Імовірно, дія вітаміну D опосередковується лужною фосфатазою, під впливом якої на поверхні кишкового епітелію відбувається гідроліз різних моноєфірів фосфорної кислоти, що призводить до підвищення концентрації аніонів фосфору в місцях його транспорту.

Крім лужної фосфатази, вітамін D регулює транспорт фосфору в кишечному епітелії через модифікацію активними метаболітами ліпідної фази мембран ентероцитів, що призводить до підвищення її проникності. Останнім часом встановлено, що вітамін D<sub>3</sub> і його активний метаболіт 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> у відділі порожньої кишки стимулюють активний насичуваний транспортний механізм, який залежить від концентрації Na<sup>+</sup>. Транспорт кальцію і фосфору через клітину в процесі всмоктування цих елементів у кишечному епітелії проходить різними шляхами, і фосфат не транспортується як іон, що супроводжує іон Ca<sup>2+</sup>. Вплив вітаміну D на процеси всмоктування цих елементів здійснюється незалежними механізмами.

Окрім стимуляції абсорбції кальцію і фосфору в кишечнику, вітамін D впливає на їх абсорбцію в нирках. Щодо кальцію цей вплив реалізується через кальцієзв'язувальний білок, який синтезується в клітинах

нирок під дією  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ , та через безпосередній вплив його на мембранний потенціал і транспорт кальцію в проксимальних каналцях нирок. Роль вітаміну D у нирковій екскреції фосфору тривалий час залишалася не з'ясованою. І лише в останні десятиліття XX ст. доведено стимулювальний вплив фізіологічних доз  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  на реабсорбцію фосфору в ниркових каналцях.

Вітамін D підтримує оптимальний рівень кальцію в сироватці крові не лише за рахунок стимуляції абсорбції його в кишечнику і реабсорбції в нирках, а й завдяки мобілізації його із кісткової тканини. У тварин, які мали низькокальцієву дієту, введення  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  підтримувало в сироватці крові нормальний рівень кальцію, джерелом якого була кісткова тканина. При цьому знижувалася мінералізація діафізів і епіфізів. Механізм остеолізу за участі вітаміну D став предметом вивчення лише в останні десятиріччя. Зокрема, була доведена участь у цьому процесі лимонної кислоти, синтез якої в кістках під впливом вітаміну D підвищується. Лимонна кислота посилює розчинність мінерального компоненту і мобілізацію кальцію із кісток у взаємодії з білком – остеокальцином, синтез якого стимулюється вітаміном D. Саме тому кальцитріол вважають “аварійним” гормоном, який діє при вираженій гіпокальціємії, швидко відновлюючи оптимальний рівень кальцію в крові шляхом активації всмоктування його з кишечника і резорбції кісток.

### 9.3. Визначення магнію в сироватці крові

*Принцип методу.* У лужному розчині магній утворює з індикатором – кальмагітом зафарбований комплекс, який визначають фотометрично при довжині хвилі 520 нм. Колір стабільний. Вплив кальцію усувається введенням у реагуючу суміш ЕДТА.

*Обладнання:* фотоелектроколориметр (КФК-2, КФК-3) або спектрофотометр, піпетки на 1; 5 мл, пробірки.

*Реактиви:* 1) реагент 1 (буферний розчин) – 2-метил-2-аміно-1-пропанол, ч (1 моль/л) – 100 мл;

2) реагент 2 (розчин індикатора) – кальмагіт, хч (500 мкмоль/л) – 100 мл;

3) стандартний розчин магнію (0,823 ммоль/л; 20 мг/л), чда – 1,5 мл.

*Використовують набір реактивів НВФ “Simko Ltd” (м. Львів).*

*Приготування робочого реагенту.* В пластиковому посуді змішують один об'єм реагенту 1 з одним об'ємом реагенту 2 і ретельно

перемішують. Розчин є стабільним 24 години при кімнатній температурі. Як правило, готують такий об'єм робочого реактиву, який буде використано протягом робочого дня.

*Хід визначення.* До 3 мл робочого реагенту додають 0,05 мл сироватки крові. Суміш перемішують. Одночасно ставлять калібрувальну пробу (3 мл робочого реагенту + 0,05 мл стандарту магнію). Витримують 5 хв при кімнатній температурі і колориметрують при довжині хвилі 520 нм на спектрофотометрі або фотоелектроколориметрі КФК-3 проти контролю в кюветі з товщиною робочого шару 10 мм.

*Контроль.* До 3 мл реагенту додають 0,05 мл дистильованої води.

Вміст магнію визначають за формулою:

$$\text{Магній (ммоль/л)} = \frac{E_{\text{досл}} \times 0,823 \text{ ммоль/л}}{E_{\text{ст}}}$$

де  $E_{\text{досл}}$  і  $E_{\text{ст}}$  – екстинція дослідної проби та стандартного розчину; 0,823 ммоль/л – концентрація магнію у стандартному розчині.

*Наприклад:* поглинання дослідної проби – 0,123, а стандартного розчину – 0,151. Вміст магнію у дослідній пробі буде становити:  $0,123 \times 0,823 / 0,151 = 0,670$  ммоль/л.

*Примітка.* Об'єми дослідного зразка і реагенту можна пропорційно зменшити або збільшити.

#### 9.4. Визначення магнію методом атомно-абсорбційної спектрофотометрії

*Приготування зразків.* Для визначення магнію і кальцію в одній пробі 0,05–0,20 мл сироватки розводять 0,1 %-ним розчином лантану хлориду ( $\text{LaCl}_3$ ) у співвідношенні 1:100.

*Калібрувальний розчин.* Розчини з концентрацією Mg 0,5; 1 та 2 мкг/мл готують на тих же рідинах, що і зразки.

*Методика вимірювання.* Атомно-абсорбційний спектрофотометр (С-115-М1, ААS 30) готують до роботи згідно з настановою з експлуатації приладу.

Розпилення калібрувальних розчинів та зразків виконують в окиснювальне полум'я ацетилен-повітря.

*Аналітична довжина хвилі* – 285,2 нм; *відносна чутливість* – 1; *ширина щілини* – 0,1 нм; *сила струму лампи* – 5 мА; *нижня межа визначення* – 0,001 мг/л; *діапазон оптимальних концентрацій* – 0,05–0,5 мг/л.

*Діагностичне значення.* Діагноз на гіпомagneмію ставлять з урахуванням умісту неорганічного магнію в сироватці крові. У здорової великої рогатої худоби і коней він коливається в межах від 2 до 3 мг/100 мл



(0,82–1,23 ммоль/л), овець – 2–3,5 (0,82–1,44), свиней – 2,5–3,5 (1,03–1,44). Зниження вмісту магнію до 1,5 мг/100 мл (0,62 ммоль/л) і менше є типовим показником пасовищної тетанії корів та гіпомагнієвої тетанії телят. При тяжкому перебізі хвороби вміст магнію знижується до 1,1 мг/100 мл і менше (0,45 ммоль/л і менше).

### 9.5. Визначення хлоридів у сироватці крові

*Принцип методу.* Хлоридний іон витісняє роданідний аніон з роданіду ртуті. Роданідні іони, що вивільняються, утворюють з іонами заліза кольоровий комплекс. Цей комплекс поглинає світло з довжиною хвилі 480–510 нм. Інтенсивність забарвлення прямо пропорційна концентрації хлоридних іонів у пробі.

*Обладнання:* фотоелектроколориметр (КФК-2, КФК-3) або спектрофотометр, водяна баня, піпетки на 1; 5 мл, пробірки.

*Реактиви:* 1) реагент 1 – 0,048 г Hg (CNS)<sub>2</sub>, хч – 1 флакон;

2) реагент 2 – 4,5 % Fe(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub> × 9H<sub>2</sub>O, чда – 50 мл;

3) стандарт – 0,1 М (100 ммоль/л) розчин NaCl, хч – 1 мл.

*Використовують набір реактивів НВФ “Simko Ltd” (м. Львів).*

*Приготування розчину хлор-реагенту.* Вміст флакона з реагентом 1 розчиняють при інтенсивному перемішуванні в 80 мл гарячої дистильованої води (70–90 °С), охолоджують до кімнатної температури. Додають реагент 2 (50 мл), перемішують, за необхідності фільтрують. Доводять дистильованою водою до об'єму 150 мл. Реактив зберігають при кімнатній температурі в посуді з темного скла.

*Хід визначення.* Визначення проводять на фотоелектроколориметрі або спектрофотометрі (довжина хвилі 490 нм) у кюветі з товщиною оптичного шару 10 мм згідно зі схемою, наведеною у табл. 28.

Таблиця 28 – Схема постановки реакції визначення хлоридів

Компоненти, мл	Проба	Стандарт	Контроль
Хлор-реагент	3,0	3,0	3,0
Сироватка	0,02	–	–
0,1 М NaCl	–	0,02	–
Дистильована вода	–	–	0,02
<i>Перемішують і через 5 хв визначають оптичну густину проб і стандарту проти контролю</i>			

Вміст хлоридів визначають за формулою:

$$Cl, \text{ ммоль/л} = \frac{E_{\text{досл}} \times 100 \text{ ммоль/л}}{E_{\text{ст}}},$$

де  $E_{\text{досл}}$  і  $E_{\text{ст}}$  – поглинання світла відповідно дослідною пробєю та стандартним розчином;

100 ммоль/л – концентрація хлориду у стандартному розчині.

*Діагностичне значення.* Обмін хлору взаємозв'язаний з обміном натрію. Він є основним аніоном позаклітинної рідини. Близько 20 % загального хлору міститься у складі органічних сполук у крові, підшкірній клітковині, м'язах і печінці. Сільськогосподарські тварини одержують хлор у формі хлоридів, головним чином натрію хлориду. Всмоктується він у дистальному відділі тонкого кишечнику, незначно – у товстому, а в жуйних, окрім того, – у рубці. Абсорбція хлору становить 95–96 % від прийнятої кількості. Виводиться з організму переважно із сечею, частково – з фекаліями, а в лактуючих тварин – з молоком.

У шлунковому соці хлор знаходиться у формі соляної кислоти та її сполук. Основна кількість хлору, що циркулює в організмі, неодноразово адсорбується у травному каналі.

Основною функцією хлору є підтримання кислотно-основної рівноваги і осмотичного тиску. Переконливих даних про самостійну гормональну регуляцію обміну хлору альдостероном в організмі немає. Очевидно, контроль за його гомеостазом здійснюється шляхом зміни обміну натрію і меншою мірою – калію, тобто опосередковано.

Нестача хлору в раціоні є маловірогідною. В експерименті знижувались секреція і надходження соляної кислоти в шлунковий сік (ахлоргідрія). Надмірна втрата хлору при діареї, порушеннях функції нирок спричинює посилене утворення бікарбонатів і розвиток алкалозу, а надмірне надходження в організм іонів хлору знижує концентрацію бікарбонатних аніонів і підвищує кислотність.

## **9.6. Визначення натрію методом атомно-абсорбційної спектроскопії**

*Приготування зразків.* Сироватку крові розводять бідистильованою водою у співвідношенні 1:1000.

*Калібрувальний розчин.* Розчини з концентрацією натрію 0,5; 1 та 2 мкг/мл готують на таких же рідинах, що й зразки.

*Методика вимірювання.* Атомно-абсорбційний спектрофотометр (С-115-М1, ААС-30) готують до роботи згідно з настановою щодо експлуатації приладу.

Розпилення калібрувальних розчинів та зразків виконують в окиснювальне полум'я ацетилен-повітря.

*Аналітична довжина хвилі* – 589,0 нм; *відносна чутливість* – 1; *ширина щілини* – 0,1 нм; *сила струму лампи* – 5 мА (в режимі абсорбції); *нижня межа визначення* – 0,002 мг/л; *діапазон оптимальних концентрацій* – 0,1–1,5 мг/л.

*Діагностичне значення.* Натрій є основним катіоном позаклітинної рідини. Зміни обміну натрію збігаються зі змінами водного обміну. Оптимальна кількість натрію в сироватці (плазмі) крові становить 135–150 ммоль/л. Обмін натрію в організмі контролюється двома гормонами – альдостероном і антидіуретичним (АДГ, вазопресином) та натрійуретичним фактором передсердя. Альдостерон посилює реабсорбцію натрію і води у звивистих каналцях нирок, натрійуретичний фактор стимулює діурез і натрійурез, блокує синтез альдостерону.

Антидіуретичний гормон впливає на баланс натрію, посилюючи реабсорбцію води в дистальних відділах ниркових каналців.

*Гіпонатріємія* характеризується вмістом натрію у плазмі, який становить менше 135 ммоль/л. Вона буває *відносною* при надмірному надходженні води, або *абсолютною*, що спостерігається за дефіцитом натрію в раціоні та збільшенні його виділення при втраті рідини (діареї), сильному потовиділенні, хронічних захворюваннях нирок, недостатньому утворенні альдостерону та водянках. За нестачі натрію у тварин настає алотріофагія, знижується продукція і жирність молока, порушуються метаболічні процеси в рубці.

Вторинна недостатність натрію у тварин може бути спричинена надлишком калію в раціоні, оскільки при цьому збільшується виведення натрію із сечею.

*Надлишок натрію* в організмі тварин можливий при збільшеній кількості натрію хлориду в раціоні та значній втраті води через легені, травний канал, внаслідок поліурії центрального (дефіцит вазопресину) і ниркового (порушенні фільтраційної функції нирок) походування, гіперсекреції альдостерону.

Досить чутливі до сольової інтоксикації свині та птиця: для них смертельною дозою є відповідно 1,5–2 і 3–4 г на 1 кг маси тіла.

## 9.7. Визначення калію методом атомно-абсорбційної спектрофотометрії

*Приготування зразків.* Сироватку крові розводять бідистильованою водою у співвідношенні 1:250.

*Калібрувальний розчин.* Розчини з концентрацією калію 0,5; 1 та 2 мкг/мл мають містити 13 мкг/мл К (у вигляді КСІ).

*Методика вимірювання.* Атомно-абсорбційний спектрофотометр (С-115-М1, ААС-30) готують до роботи згідно з настановою щодо експлуатації приладу.

Розпилення калібрувальних розчинів та зразків виконують в окиснювальне полум'я ацетилен-повітря.

*Аналітична довжина хвилі* – 766,5 нм; *відносна чутливість* – 1; *ширина щілини* – 1,0 нм; *сила струму лампи* – 5 мА (в режимі абсорбції); *нижня межа визначення* – 0,01 мг/л; *діапазон оптимальних концентрацій* – 0,1–2,0 мг/л.

*Діагностичне значення.* Калій є основним катіоном внутрішньоклітинного середовища. Оптимальна кількість його у сироватці крові становить 4,0–5,5 ммоль/л. Регулює обмін калію в організмі альдостерон. *Гіперкаліємія* може розвиватися при надмірному надходженні калію в організм із заміниками молока або із зеленою масою пасовищ, куди вносили велику кількість калійних добрив (пасовищна тетанія), при надмірному вмісті солей калію у складі регідратаційних сумішей без належного контролю його концентрації в плазмі. Найчастіше причиною гіперкаліємії є гостра ниркова недостатність, яка супроводжується анурією, значним гемолізом еритроцитів та масивним пошкодженням клітин (при травмах, опіках). Особливо небезпечним є поєднання надмірного екзогенного надходження калію з патологією нирок та ендогенними факторами.

Гіперкаліємія розвивається також при порушенні регуляції обміну калію внаслідок зменшення виділення альдостерону корою надниркових залоз (амілоїдоз, ураження при інфекційних хворобах, зокрема при туберкульозі, аутоімунне руйнування).

Надлишок калію в організмі порушує скорочення та знижує функціональні резерви кардіоміоцитів. Токсична дія калію на серце проявляється при збільшенні його концентрації в плазмі понад 6,0–6,5 ммоль/л. При вищих значеннях спостерігаються брадикардія та характерні зміни ЕКГ: зубець Т стає високим і гострим, зубець Р зникає, тривалість інтервалу Р–Q зростає. При концентрації калію в плазмі понад 8 ммоль/л

комплекс QRS деформується і розширюється, може з'явитися блокада ніжки пучка Гіса і настає зупинка серця. Гіперкаліємія значно збільшує чутливість серця до збудження блукаючого нерва. Цим можна пояснити раптову зупинку серця, яка інколи спостерігається у хворих з незначною гіперкаліємією.

Вплив калію на функцію серця потенціюється при одночасному зменшенні концентрації іонів натрію в плазмі. Коли вона зменшується до 120 ммоль/л (у нормі – 135–150), тоді типові для гіперкаліємії зміни ЕКГ спостерігаються вже при концентрації іонів калію 5,5–5,8 ммоль/л.

*Гіпокаліємія* через дефіцит калію в раціонах сільськогосподарських тварин, особливо жуйних, у звичайних умовах малоймовірна. При добовій потребі 100–130 г на день дійні корови одержують калію у 2–3 рази більше. У молоці калію також достатньо, тому в молодняку, як правило, його дефіциту не буває. Гіпокаліємія може розвиватися при втраті калію через травний канал (діарея в новонароджених, блювання) та із сечею при хронічному пієлонефриті і первинному гіперальдостеронізмі (аденома кори надниркових залоз), застосуванні сечогінних (фуросеміду) і кортикостероїдних препаратів або їхніх синтетичних аналогів при лікуванні запальних процесів.

Гіпокаліємія спричинює порушення функцій нервової системи, м'язів серця, системи кровообігу і нирок. Клінічний прояв цих порушень настає при зниженні концентрації калію в плазмі до 2,5 ммоль/л і менше. Тварини при цьому стають сонливі і малорухливі; глибокі рефлекси в них послаблені, тonus м'язів знижений; може виникати парестезія. У тяжких випадках настають параліч м'язів і кома.

Порушення системи кровообігу характеризуються зниженням артеріального тиску, розвитком субклінічних набряків, змінами ЕКГ (знижується вольтаж зубця Т, розширюється комплекс QRS, у тяжких випадках розвиваються тахіаритмія та мерехтіння передсердя).

## 9.8. Визначення заліза

В організмі дорослих тварин концентрація заліза в середньому становить 0,005–0,006 % у розрахунку на свіжу тканину. У тілі корови масою 600 кг міститься близько 36 г заліза, у свині масою 100 кг – 5 г, курки масою 2 кг – 0,16 г. Майже все залізо у тілі тварин знаходиться у формі органічних сполук. Зокрема, воно входить до складу більш як 70 різних за своєю функцією ферментів. Ці сполуки ділять на дві групи:

а) ті, які містять залізо в геміновій формі (порфіринові) – гемоглобін, міоглобін, цитохроми, цитохромоксидаза, каталаза, пероксидаза (70–75 % всієї кількості заліза; б) негемінове залізо – трансферин, феритин, гемосидерин (20–25 %).

### **9.8.1. Визначення заліза в сироватці крові** (за реакцією з бета-фенантроліном)

*Принцип методу.* Бетофенантролін утворює з іонами двовалентного заліза комплекс червоного кольору, інтенсивність якого визначають фотометрично при довжині хвилі 510–550 нм.

*Обладнання:* КФК-2, КФК-3 або спектрофотометр, центрифуга, мірні колби на 100 мл, піпетки на 1; 5 мл, пробірки.

*Реактиви:* 1) стандартний розчин амонію заліза (II) сірчанокислолого 17,9 мкмоль/л – 40 мл;

2) бета-фенантролін – 2 x 55 мл;

3) концентрована тіогліколева кислота – 4 мл;

4) розчин для осадження білків – 2 x 55 мл.

*Використовують набір реактивів "Біо-Тест, Lachema (Чехія).*

*Приготування робочих розчинів.* Розчин для осадження білків. У мірну колбу на 100 мл відміряють 3 мл реактиву 3 і доливають до мітки реактивом 4. Якщо розчин помутніє, його фільтрують через щільний фільтр. Розчин стійкий протягом 2-х місяців зберігання в темному і прохолодному місці.

*Хід визначення.* До 1 мл сироватки крові додають 1 мл розчину для осадження білків. Суміш перемішують. Одночасно готують калібрувальну пробу (0,5 мл стандартного розчину + 0,5 мл розчину для осадження білків).

Через 5 хв пробу центрифугують протягом 10 хв при 3000 об/хв. У чисту пробірку відбирають 1 мл надосадової рідини. В усі пробірки (надосадова рідина, стандарт, контроль) додають по 1 мл реактиву 2. Протягом 50–60 хв вимірюють оптичну густину проби ( $A_1$ ) і стандарту ( $A_2$ ) проти контрольного розчину при довжині хвилі 510–550 нм на спектрофотометрі або КФК-3 в 10 мм кюветі.

Вміст заліза у сироватці крові визначають за формулою:

$$Fe, \text{ мкмоль/л} = 17,9 \times \frac{A_1}{A_2},$$

де  $A_1$  – оптична густина дослідного зразка,  $A_2$  – оптична густина стандарту.

**Примітки.** 1. При визначенні заліза необхідно використовувати лабораторний посуд, призначений виключно для цієї мети.

2. Сироватка крові зі слідами гемолізу завищує показник і є необ'єктивною щодо вмісту сироваткового заліза.

### **9.8.2. Визначення заліза методом атомно-абсорбційної спектрофотометрії**

**Приготування зразків.** Для визначення заліза сироватку крові розводять у 5 разів бідистильованою водою або, після осадження білків, трихлороцтовою кислотою. Пряме визначення дає завищені результати через частковий гемоліз. Загальноприйнятою вважається методика з осадженням білків: 2 мл сироватки вносять у центрифужну пробірку, додають 1 мл 1,2 М НСІ і розчин залишають в термостаті при 38 °С на 1 год. Після цього додають 1 мл 20 %-ного розчину  $\text{CCl}_3\text{COOH}$ , розмішують, витримують 1 год при кімнатній температурі і центрифугують. У фільтраті визначають Fe, за необхідності Cu і Zn, а також інші мікроелементи.

**Калібрувальний розчин.** Розчини з концентрацією Fe 0,5; 1 і 2 мкг/мл готують на тих же рідинах, що і зразки.

**Методика вимірювання.** Атомно-абсорбційний спектрофотометр (С-115-М1, ААС-30) готують до роботи згідно з настановою щодо експлуатації приладу.

Розпилення калібрувальних розчинів та зразків проводять в окиснювальному полум'ї ацетилен-повітря.

**Аналітична довжина хвилі** – 248,3 нм; **відносна чутливість** – 1; **ширина щілини** – 0,1 нм; **сила струму лампи** – 5 мА; **нижня межа визначення** – 0,01 мг/л; **діапазон оптимальних концентрацій** – 1,0–10,0 мг/л.

**Діагностичне значення.** Фізіологічні величини вмісту заліза в сироватці крові тварин наведено в додатку Д. Абсорбція заліза залежить від віку, забезпеченості організму залізом, стану шлунка і кишечника, хімічної форми, в якій надходить залізо, та компонентів корму. У тварин з однокамерним шлунком комплексні сполуки заліза під впливом соляної кислоти і пепсину розщеплюються і тривалентне залізо, відновлюючись, переходить у двовалентне. Всмоктування заліза відбувається, головним чином, у дванадцятипалій і порожній кишках. У деяких сполуках добре всмоктується також тривалентне залізо. Для оптимального всмоктування заліза необхідна нормальна секреція шлункового соку. Сприяють засвоєнню заліза білок тваринного походження (очевидно, внаслідок

утворення комплексів з амінокислотами), аскорбінова кислота, токоферол, прості вуглеводи (лактоза, фруктоза), сорбіт, амінокислоти (цистеїн, лізин, гістидин). Пригнічують всмоктування заліза білки сої і фосфати.

Впливають на засвоєння заліза різні захворювання. *Стимулюється* засвоєння заліза при його нестачі, різних анеміях, В<sub>6</sub>-гіповітамінозі, що пояснюється посиленням гемоцитопоезу. *Зменшується* засвоєння заліза при гіпоацидних і анацидних гастритах, діареях різної етіології внаслідок швидкого транзиту хімусу.

У дорослих тварин із кормів засвоюється 5–10 % заліза, а при інтенсивному еритроцитопоезі – 15–20 %. У телят засвоюється 15–25 % заліза молока.

Близько 70 % заліза плазми крові потрапляє в кістковий мозок. За рахунок розпаду гемоглобіну в людей за добу звільняється 21–24 мг заліза, з кишечника абсорбується 1–2 мг. З організму залізо виділяється, в основному, при злущуванні епітелію слизової оболонки кишечника і з жовчю. Усього за добу в людини виділяється 0,6–1 мг заліза і така ж кількість засвоюється.

*Дефіцит заліза (гіпосидероз)* є одним із найбільш поширених мікроелементозів у молодняку сільськогосподарських тварин, особливо в поросят і телят. Поросята-сисуні починають хворіти з 5–7-денного віку, максимального розвитку хвороба досягає у тритижневому віці. Телята хворіють від дня народження до 2–3-місячного віку, але симптоми хвороби у них менше виражені, порівняно з поросятами. Захворювання реєструють у 30–40 % телят. Основною причиною анемії поросят є нестача заліза, тому її називають залізодефіцитною, оскільки запаси його в органах і тканинах невеликі (близько 50 мг), а з молозивом чи молоком матері вони одержують 1 мг при добовій потребі 7–10 мг. До тритижневого віку поросятам потрібно від 114 до 200 мг заліза, з молоком вони одержують 23–24 мг.

Запаси заліза в телят, нагромаджені у внутрішньоутробний період, швидко витрачаються після народження, оскільки добова потреба телят становить 50–100 мг заліза, а в перші чотири тижні життя вона задовольняється лише на 10 %. Тому вміст заліза і міді в крові стає низьким у 20–30-денному віці. У цей же період у більшості телят вміст гемоглобіну досить низький – у межах від 50 до 70 г/л.

Гіпосидероз надзвичайно поширений серед людей. За даними ВООЗ (1977), більше половини дітей хворіють на анемію, і переважно – на за-



лізодефіцитну. Не менше 18 млн жителів США страждають гіпосидерозом (Авцын А.П. с соавт., 1991). Медики вважають, що гіпохромна анемія є пізньою стадією гіпосидерозу, оскільки окремі ознаки хвороби є неспецифічними (легка втома, головний біль, депресія, тахікардія, поверхневе дихання, запаморочення, анорексія, спотворення смаку).

### 9.9. Визначення міді

Мідь всмоктується у верхній частині тонкого кишечника. Засвоюваність міді дорослими тваринами з однокамерним шлунком становить 5–10 %, молодняком – 15–30, жуйними – 30–40 %. Утруднюється всмоктування міді при вживанні кормів, багатих на молібден і сульфати (нормальне співвідношення міді і молібдену в кормах – 10 : 1 при 0,1–0,2 % сульфатів у сухій речовині корму). За надлишку молібдену і сульфатів утворюються важкорозчинні сполуки міді, тому її засвоюваність різко знижується. Окрім того, надлишок у кормах молібдену стимулює активність мікроорганізмів у рубці, які утворюють із сульфатів сірководень, що супроводжується перетворенням міді корму в недоступний для організму сульфід ( $\text{CuS}_2$ ). Надлишок у раціоні сірки, кальцію і кадмію також спричинює утворення важкорозчинних комплексних сполук із міддю.

Мідь, що всмокталася, депонується головним чином у печінці, кістковому мозку, селезінці, підшлунковій залозі, а в молодняку – також в епіфізах кісток. Печінка є основним депо міді, і тому її вміст у ній є важливим показником забезпеченості організму цим мікроелементом. У тілі новонароджених телят міститься 13–14 мг міді, у поросят – 3,5–4 мг. Ендогенна мідь виділяється з організму, в основному, через травний канал; із сечею виділяється 10–13 % цього елемента. В організмі тварин мідь входить до складу окиснювальних ферментів (церулоплазміну, цитохромоксидази, тирозинази, амінооксидази та ін.), які каталізують окремі етапи тканинного дихання. Цитохромоксидазна активність у тварин із недостатнім вмістом міді в організмі у 8 разів нижча за норму.

Мідь є також необхідним елементом для кровотворення: вона посилює мобілізацію депонованого заліза в кістковий мозок, забезпечує перехід мінеральних форм заліза в органічні, чим каталізує включення його у структуру гема і сприяє дозріванню еритроцитів на ранніх стадіях розвитку. При нестачі міді залізо недостатньо використовується для синтезу гемоглобіну, і тому порушується гемопоез, розвивається гіпохромна анемія.

### 9.9.1. Визначення міді в сироватці крові (за реакцією з бетакупріоном)

*Принцип методу.* Бетакупріон утворює з іонами одновалентної міді комплекс оранжевого забарвлення, придатний до фотометричного визначення.

*Обладнання:* КФК-2, КФК-3 або спектрофотометр, центрифуга, мірні колби на 100 мл, піпетки на 1; 5 мл, пробірки.

*Реактиви:* 1) реагент 1 (стандартний розчин міді сульфату 3 ммоль/л) – 2 мл;

2) реагент 2 (50 мл бетакупріону) – 2 x 25 мл;

3) реагент 3 (відновлювальний реактив) – 1,25 г;

4) реагент 4 (розчин для осадження білків) – 50 мл.

*Використовують набір реактивів фірми “Біо-Тест Lachema” (Чехія).*

*Приготування робочих розчинів:*

1. *Калібрувальний розчин.* У мірну колбу на 100 мл відмірюють 1 мл реагенту 1 і бідистильованою водою доводять до мітки. Розчин містить 30 мкмоль міді в 1 л. При кімнатній температурі розчин стабільний декілька тижнів.

2. *Розчин для осадження білків.* Усю наважку реагенту 3 розчиняють у всьому об’ємі реагенту 4. При температурі нижче + 10 °С в темному місці розчин стійкий мінімально 3 місяці.

*Хід визначення.* До 1 мл сироватки крові додають 1 мл розчину для осадження білків. Суміш перемішують. Одночасно готують калібрувальну (1 мл калібрувального розчину + 1 мл розчину для осадження білків) та контрольну (1 мл бідистильованої води + 1 мл розчину для осадження білків) проби. Через 30 хв проби центрифугують 30 хв при 3000 об/хв. У наступні пробірки відбирають по 1,0 мл надосадової рідини, калібрувального та контрольного розчинів і додають 1,0 мл реагенту 2. Перемішують розчин у пробірках і протягом наступних 50–90 хв вимірюють оптичну густину проби ( $A_1$ ) і стандарту ( $A_2$ ) проти контрольного розчину на спектрофотометрі або фотоелектроколориметрі КФК-3 при довжині хвилі 460–500 нм у кюветі з товщиною робочого шару 100 мм.

Уміст міді в сироватці крові визначається за формулою:

$$C_{\text{и}}, \text{ мкмоль/л} = 30,0 \times \frac{A_1}{A_2},$$

де  $A_1$  – оптична густина дослідного зразка,  $A_2$  – оптична густина стандарту.

### **9.9.2. Визначення міді методом атомно-абсорбційної спектрофотометрії**

*Приготування зразків.* Для визначення міді сироватку крові розводять бідистильованою водою у співвідношенні 1:3–1:10 (оптимальне 1:4) без обов'язкового осадження білків.

*Калібрувальний розчин.* Розчини з концентрацією  $\text{Cu}$  0,5; 1 та 2 мкг/мл готують на тих самих рідинах, що і зразки.

*Методика вимірювання.* Атомно-абсорбційний спектрофотометр (С-115-М1, ААС-30) готують до роботи згідно з настановою з експлуатації приладу.

Розпилення калібрувальних розчинів та зразків проводять в окиснювальному полум'ї ацетилен-повітря. Для запобігання розсіюванню світла рекомендується велика робоча висота полум'я (10 мм).

*Аналітична довжина хвилі* – 324,7 нм; *відносна чутливість* – 1; *ширина щілини* – 0,4 нм; *сила струму лампи* – 8 мА; *нижня межа визначення* – 0,02 мг/л; *діапазон оптимальних концентрацій* – 0,2–5,0 мг/л.

*Діагностичне значення.* Фізіологічні величини вмісту міді в сироватці крові тварин наведено в додатку Д. Недостатність міді характеризується розвитком гіпохромної анемії, депігментацією волоссяного покриву, порушенням остеогенезу.

Характерною ознакою недостатності міді в овець є порушення формування білка шерсті – кератину. Шерсть овець при цьому втрачає блиск, еластичність, звивистість, що пояснюється порушенням перетворення сульфогідрильних груп ( $\text{SH}^-$ ) у дисульфідні внаслідок нестачі міді і ферменту сульфідоксидази. Слід зазначити, що конкретний механізм участі міді в процесах кератинізації залишається ще нез'ясованим. Окрім того, при нестачі міді в овець з'являються світлі стяжки на пігментованій шерсті, у великої рогатої худоби – депігментація волосся, в індиків – депігментація оперення. Ці явища пов'язані з порушенням синтезу ферменту тирозинази, яка каталізує реакції біосинтезу меланіну.

Інший добре відомий прояв дефіциту міді – дефектний синтез колагену, що супроводжується ламкістю кісток і деформацією скелета в овець, великої рогатої худоби, собак, свійської птиці. У кістковій тканині тварин за дефіциту міді підвищується вміст розчинного колагену (тропоколагену) і затримується перетворення його в зрілий колаген. Тому недостатність міді призводить до розвитку дифузного остеопору. Порушення синтезу колагену, особливо еластину, виявлено не

лише в кістках, а й в артеріях свиней, позбавлених міді, що проявляється значними внутрішніми крововиливами, розривами аорти, коронарних і легеневих судин. Дефіцит міді в раціоні кітних овець спричинює внутрішньоутробне порушення розвитку ягнят, оскільки внаслідок демієлінізації півкулі мозку перетворюються в тонкостінні міхури, заповнені ліквором. Аплазія мієліну є результатом пригнічення цитохромоксидази, яка забезпечує утворення АТФ, необхідної для синтезу фосфоліпідів – основного компонента мієліну.

*Гіперкупроз* виникає внаслідок порушення правил використання препаратів міді в рослинництві та для лікування тварин, а також при забрудненні навколишнього середовища міддю поблизу промислових підприємств. Найбільш чутливі до інтоксикації вівці, для яких токсичною дозою міді сульфату є 20 мг/кг маси. Тривале надходження невисоких токсичних доз міді через травний канал спричинює розвиток гепатодистрофії, а пізніше – атрофічного цирозу печінки з порушенням усіх її функцій, метгемоглобінемії та гемолізу еритроцитів з появою гемоглобінурії.

## 9.10. Визначення цинку

Біохімічна роль цинку в організмі пов'язана з дією ферментів, для яких він є необхідним компонентом або активатором. Нині цинк знайдений більш як у 200 металоферментах, що беруть участь у різних метаболічних процесах, включаючи синтез і розпад вуглеводів, жирів, білків і нуклеїнових кислот. Цинковмісні ферменти належать до всіх шести класів, але найбільше їх серед гідролаз.

Еритроцити містять карбонатдегідрогеназу, яка каталізує реакцію утворення і розпаду  $\text{H}_2\text{CO}_3$ . При відсутності цинку швидкість видалення вуглекислого газу з організму є недостатньою для підтримання життя. Цинк входить до складу карбоксипептидаз соку підшлункової залози, які гідролізують поліпептиди, стимулює активність ферментів шлункового соку, трипсину, тому його нестача спричинює розлади азотистого обміну, зменшує всмоктування продуктів гідролізу протеїну.

Цинку належить важлива роль у синтезі білка і нуклеїнових кислот. Він необхідний для стабілізації структури ДНК, РНК і рибосом. Входячи до складу аміноацил-т-РНК-синтетази, цинк відіграє важливу роль у процесі трансляції. Тому за його недостатності затримується ріст і розвиток тварин.

Цинк усмоктується, в основному, в тонкому кишечнику, у великої рогатої худоби – частково (близько третини) в сичузі, у курей – у залозисто-му шлунку і кишечнику. Рівень абсорбції в дорослих тварин з однокамерним шлунком становить 7–15 % від прийнятого, у жуйних – 20–40 %. Цинк після всмоктування надходить у скелет, печінку, м'язи, підшлункову залозу. В тілі новонароджених телят міститься близько 500 мг цинку, поросят – 24–25 мг. Майже 75 % цинку крові міститься в еритроцитах, 22 – у плазмі і 3 % – в лейкоцитах.

Основним транспортним білком для цинку в крові є альбумін; невелика кількість цинку зв'язана з гістидином і цистеїном. З організму цинк виділяється через кишковий канал; виділення його із сечею – незначне.

### ***9.10.1. Визначення цинку методом атомно-абсорбційної спектрофотометрії***

*Приготування зразків.* Для визначення цинку сироватку крові розводять бідистильованою водою у співвідношенні 1:3–1:10 (оптимальне 1:4) без обов'язкового осадження білків.

*Калібрувальний розчин.* Розчини з концентрацією Zn 0,5; 1 та 2 мкг/мл готують на тих самих рідинах, що і зразки.

*Методика вимірювання.* Атомно-абсорбційний спектрофотометр (С-115-М1, ААС-30) готують до роботи згідно з настановою щодо експлуатації приладу.

Розпилення калібрувальних розчинів та зразків проводять в окиснювальному полум'ї ацетилен-повітря. Для запобігання розсіюванню світла рекомендується велика робоча висота полум'я (10 мм).

*Аналітична довжина хвилі* – 312,9 нм; *відносна чутливість* – 1; *ширина щілини* – 1,0 нм; *сила струму лампи* – 5 мА; *нижня межа визначення* – 0,001 мг/л; *діапазон оптимальних концентрацій* – 0,4–1,6 мг/л.

*Діагностичне значення.* Фізіологічні величини вмісту цинку в сироватці крові тварин наведено у додатку Д. При цинковій недостатності відбуваються специфічні зміни в епідермісі, характерні для паракератозу. Суть їх полягає в порушенні процесу рогоутворення, пов'язаного з втратою клітинами епідермісу можливості виробляти кератогіалін. Зміни клітин спостерігаються у всіх шарах епідермісу – від гермінативного до рогового включно. Внаслідок цього епідерміс значно потовщується, особливо за рахунок поверхневих шарів. Зернистий і світлий шари зникають, у роговому нагромаджуються недостатньо

ороговілі клітини, в яких помітні тонкі паличкоподібні та пікнотичні ядра, застиглий ексудат з домішками мікробів. Клінічний прояв цинкової недостатності найбільш характерний для поросят віком від 1,5–2 до 4-х місяців. На вухах, у ділянці носа, біля очей, на внутрішній поверхні тазових кінцівок, животі, промежині та інших ділянках тіла утворюються струпоподібні нашарування світло-коричневого, коричневого або чорного кольору. Нашарування часто тріскаються, на дні тріщин скупчується запальний ексудат. Шкіра стає потовщеною, зморшкуватою. Захворювання одержало назву *паракератоз* (*parakeratosis*; від грец. *para* – біля, відхилення від норми + *kerat*, *keratos* – ріг, рогове утворення). Отже, паракератоз – це аномалія ороговіння, коли клітини епідермісу повністю не ороговівають, зберігають ядра або їх залишки, не виробляють кератин.

## ДОДАТКИ

### Додаток А

#### Коефіцієнти перерахунку “старих” одиниць в одиниці SI і навпаки

Система	Компонент і величина	Попередня одиниця	Коефіцієнт перерахунку “старої” одиниці в нову	Нова одиниця	Коефіцієнт перерахунку нової одиниці в “стару”	Відносна молекулярна маса або відносна атомна одиниця маси
1	2	3	4	5	6	7
П (плазма)	азот аміно-кислот	мг%	0,714	ммоль/л	1,40	14,0
С (сироватка)		мг/л	0,0714	ммоль/л	14,01	
П, С	альбумін (69000)	г/дл	10	г/л	0,1	69000
		г/л	1	г/л	1,0	
		г/дл	144,9	ммоль/л	0,6900	
П, С	амоній	мкг/дл мг/л	0,587 58,72	ммоль/л ммоль/л	1,703 0,017	17,03
П, С	аскорбінова кислота	мг/дл	56,78	ммоль/л	0,01761	176,126
П, С	білок	г% мг%	10 0,01	г/л г/л	0,1 100	
П, С	білірубін	мг/дл мг/л	17,1 1,71	ммоль/л ммоль/л	0,05847 0,5847	584,68
П, С	галактоза	мг/дл мг/л	0,0555 0,00555	ммоль/л ммоль/л	18,02 180,2	180,16
К	гемоглобін	пг	0,06206	фмоль	16,11	≈ 64458
К	гемоглобін	г/дл г/дл	0,6206 10	ммоль/л г/л	1,611 0,1	≈ 16114,5
П	гідрокарбонат	мекв/л	1	ммоль/л	1,0	
П, С	глюкоза	мг/дл г/л	0,0555 5,551	ммоль/л ммоль/л	18,02 0,1802	180,57
Добова сеча	глюкоза	г	5,551	ммоль	0,1802	
П, С	залізо	мкг/дл	0,1791	ммоль/л	5,585	55,85
С	імуно-глобуліни	мг/мл	1	г/л	1,0	
		мг/дл	0,01	г/л	100	
		г/дл	10	г/л	0,1	

Продовження

1	2	3	4	5	6	7
П, С	інсулін	МКГ/Л МЕ/Л	172,2 7,175	ПМОЛЬ/Л ПМОЛЬ/Л	0,0058 0,1394	5807,65
П, С	йод зв'язаний білком – БЗЙ) <sup>3</sup>	МКГ/ДЛ МКГ/ДЛ	78,8 7,880	НМОЛЬ/Л ПМОЛЬ/Л	0,01269 0,1269	126,9
П, С	калію іон	ЕКВ/Л МГ/Л	1 0,02558	ММОЛЬ/Л ММОЛЬ/Л	1,0 3910	39,1
П, С	кальцій	МЕКВ/Л МГ/ДЛ	0,5 0,25	ММОЛЬ/Л ММОЛЬ/Л	2 4,0	40,08
П, С	каротиноїди	МКГ/ДЛ МГ/ДЛ	0,01863 18,63	МКМОЛЬ/Л МКМОЛЬ/Л	53,69 0,05369	536,9
П	лактат	МГ/ДЛ МГ/Л	0,111 0,0111	ММОЛЬ/Л ММОЛЬ/Л	9,008 90,08	90,08
П	ліпіди загальні	МГ/ДЛ	0,01	Г/Л	100,0	
П, С	магній	МГ/ДЛ МГ/Л	0,4114 0,04114	ММОЛЬ/Л ММОЛЬ/Л	2,431 24,3	24,3
П, С	мідь	МКГ/ДЛ МГ/Л	0,1574 15,74	МКМОЛЬ/Л МКМОЛЬ/Л	6,355 0,06355	63,55
К	метгемоглобін	Г/ДЛ Г/Л Г/ДЛ	620,6 62,006 10	МКМОЛЬ/Л МКМОЛЬ/Л Г/Л	0,001611 0,01611 0,1	16114,5
П, С	сечовина	МГ/ДЛ Г/ДЛ	0,1665 16,65	ММОЛЬ/Л ММОЛЬ/Л	6,006 0,06006	60,055
П, С	натрію іон	МЕКВ/Л МГ/ДЛ	1 0,4350	ММОЛЬ/Л ММОЛЬ/Л	1 2,23	22,3
П, К	піруват	МГ/ДЛ МГ/Л	113,6 11,36	МКМОЛЬ/Л МКМОЛЬ/Л	0,00806 0,0806	83,063
П, С	ретинол	МКГ% МГ/Л	0,0349 0,00349	МКМОЛЬ/Л МКМОЛЬ/Л	28,65 286,5	296,456
П, С	тироксин	МКГ%	12,87	НМОЛЬ/Л	0,0777	776,9
П, С	токоферол	МГ% МГ/Л	24 2,4	МКМОЛЬ/Л МКМОЛЬ/Л	0,04167 0,4167	416,69
П, С	трансферин	МГ%	0,01	Г/Л	100	80000
П	трийод- тиронін	НГ/ДЛ	0,01536	НМОЛЬ/Л	65,1	65
П, С	фосфор неорг.	МГ/ДЛ МГ/Л	0,3229 0,03229	ММОЛЬ/Л ММОЛЬ/Л	3,097 30,97	
П, С	фосфо-ліпіди	Г/Л	1,292	ММОЛЬ/Л	0,774	774
П, С	хлорид	МЕКВ/Л МГ/ДЛ	1 0,282	ММОЛЬ/Л ММОЛЬ/Л	1 3,545	35,5
П, С	холестерин	МГ/ДЛ Г/Л	0,02586 2,586	ММОЛЬ/Л ММОЛЬ/Л	38,67 0,3867	386,66

**Примітка.** П – плазма; С – сироватка; К – кров; мг/дл = мг в 100 мл; мг% – мг в 100 мл



**Додаток Б**  
**Перерахунок одиниць активності ферментів**

Назва одиниці	Назва одиниці в SI	Коефіцієнт перерахунку
Од/л	мкмоль/хв×л	1
Од/л	нмоль/с×л	16,67
Од/л	нкат/л	16,67
мкмоль/год×мл	нмоль/с×л	278
мкмоль/год×мл	нкат/Л	278
нкат/л	Од/л	0,06
од. Боданські	Од/л	5,37
ммоль/л	мккат/л	3,6

Додаток В  
**Визначення кількості білка в сироватці крові**  
**(г/л) за коефіцієнтом переломлення світла**  
**при 20 °С на рефрактометрі**

Показник рефрактометра	Кількість білка	Показник рефрактометра	Кількість білка	Показник рефрактометра	Кількість білка	Показник рефрактометра	Кількість білка
1,3412	30,6	1,3444	49,0	1,3476	67,7	1,3508	86,2
1,3413	31,0	1,3445	49,5	1,3477	68,2	1,3509	86,9
1,3414	31,5	1,3446	50,0	1,3478	68,8	13510	87,4
1,3415	3,21	1,3447	50,7	1,3479	69,4	1,3511	88,0
1,3416	32,7	1,3448	51,2	1,3480	70,0	1,3512	88,6
1,3417	33,2	1,3449	51,8	1,3481	70,5	1,3513	89,1
1,3418	33,9	1,3450	52,5	1,3482	71,1	1,3514	89,6
1,3419	34,4	13451	53,1	1,3483	71,6	1,3515	90,3
1,3420	35,2	1,3452	53,7	1,3484	72,2	1,3516	90,8
1,3421	35,6	1,3453	54,2	1,3485	72,8	1,3517	91,4
1,3422	36,2	1,3454	54,9	1,3486	73,3	1,3518	92,0
1,3423	36,8	1,3455	55,4	1,3487	74,0	1,3519	92,7
1,3424	37,4	1,3456	56,0	1,3488	74,6	1,3520	93,2
1,3425	37,9	1,3457	56,6	1,3489	75,1	1,3521	93,8
1,3426	38,8	1,3458	57,1	1,3490	75,9	1,3522	94,3
1,3427	39,2	1,3459	57,6	1,3491	76,3	1,3523	95,0
1,3428	39,7	1,3460	58,3	1,3492	76,9	1,3524	95,5
1,3429	40,3	1,3461	58,9	1,3493	77,4	1,3525	96,2
1,3430	40,9	1,3462	59,4	1,3494	77,9	1,3526	96,7
1,3431	41,7	1,3463	60,1	1,3495	78,4	1,3527	97,3
1,3432	42,0	1,3464	60,6	1,3496	79,2	1,3528	97,9
1,3433	42,6	1,3465	61,2	1,3497	79,8	1,3529	98,4
1,3434	43,2	1,3466	61,8	1,3498	80,4	1,3530	99,0
1,3435	43,8	1,3467	62,4	1,3499	80,9	1,3531	99,5
1,3436	44,3	1,3468	62,9	1,3500	81,7	1,3532	100,3
1,3437	44,9	1,3469	63,6	1,3501	82,1	1,3533	100,8
1,3438	45,4	1,3470	64,2	1,3502	82,8	1,3534	101,3
1,3439	46,1	1,3471	64,8	1,3503	83,3	1,3535	101,8
1,3440	46,6	1,3472	65,3	1,3504	83,9	1,3536	102,3
1,3441	47,3	1,3473	65,8	1,3505	84,5	1,3537	102,7
1,3442	47,8	1,3474	66,4	1,3506	85,0	1,3538	103,2
1,3443	48,3	1,3475	67,0	1,3507	85,6	1,3539	103,7

Додаток Г  
Активність ферментів у сироватці крові тварин (од/л)

Назва ферменту	ВРХ	ДРХ	Свині	Коні	Собаки	Коти
Амілаза	800–1200	–	До 3500	15–40	500–1750	500–2000
Аланінамінотрансфераза (АЛТ)	10–30	5–25	5–20	5–15	10–55	10–45
Аспаратамінотрансфераза (АСТ)	10–50	10–65	10–35	50–200	10–25	10–30
Гамма-глутамілтрансфераза (ГГТ)	7–15	10–30	10–25	8–20	0–6	0–5
Глутаматдегідрогеназа (ГЛДГ)	1–8	1–5	1–6	2–6	1–6	1–6
Креатинкіназа (КК)	20–100	10–50	100–1200	20–130	10–100	30–130
Лактатдегідрогеназа (ЛДГ)	500–1500	200–600	300–700	350–800	55–250	90–600
Ліпаза	2–8	–	–	0–10	до 300	до 250
Лужна фосфатаза (ЛФ)	100–200	30–100 (вівці) 100–300 (кози)	30–150	100–250	20–150	20–140
Псевдохолінестераза (ХЕ)	120–280	–	–	1500–3000	1500–3000	900–3000
Сорбітдегідрогеназа (СДГ)	0–5	0–1	0–1	0–2	0–2	0–2

**Додаток Д**  
**Уміст мікроелементів у сироватці крові тварин**

Назва елемента	Одиниці вимірювання	Велика рогата худоба	Вівці	Свині
Залізо	мкг/100 мл	90–150	100–150	110–180
	мкмоль/л	16,1–26,8	17,9–26,8	9,7–32,2
Мідь	мкг/100 мл	80–120	60–100	200–240
	мкмоль/л	12,6–18,9	9,5–15,7	31,5–37,8
Кобальт (у крові)	мкг/100 мл	3,0–5,0	2,5–5,0	2,5–5,0
	мкмоль/л	0,5–0,85	0,42–0,85	0,42–0,85
Цинк	мкг/100 мл	100–150	100–120	100–160
	мкмоль/л	15,4–23,0	15,4–18,5	15,4–24,6
Йод загальний	мкг/100 мл	5,0–10,0	5,0–10,0	5,0–10,0
	нмоль/л	394–788	394–788	394–788
Селен	мкг/100 мл	7,5–10,0	7,5–10,0	7,5–10,5
	мкмоль/л	0,9–1,5	0,9–1,5	0,9–1,5
Марганець	мкг/100 мл	15,0–22,0	5,0–10,0	5,0–10,0
	мкмоль/л	2,5–4,0	0,83–1,66	0,83–1,66

## СПИСОК РЕКОМЕНДОВАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Ангельські С., Якубовські З., Домінічак М.Г. Клінічна біохімія: Пер. з пол. – Сопот, 1998. – 451 с.
2. Березов Т.Т., Коровкин Б.Ф. Биологическая химия. – М.: Медицина, 1998. – 704 с.
3. Ветеринарна клінічна біохімія / В.І. Левченко, В.В. Влізло, І.П. Кондрахін та ін.; За ред. В.І. Левченка і В.Л. Галяса. – Біла Церква, 2002. – 400 с.
4. Витамины в питании животных / А.Р. Вальдман, П.Ф. Сурай, И.А. Ионов, Н.И. Сахацкий. – Харьков, 1993. – 423 с.
5. Внутрішні хвороби тварин / В.І. Левченко, І.П. Кондрахін, В.В. Влізло та ін.; За ред. В.І. Левченка.– Біла Церква, 2001.– Ч. 2.– 544 с.
6. Георгиевский В.И., Анненков Б.Н., Самохин В.Т. Минеральное питание животных. – М.: Колос, 1979. – 471 с.
7. Горячковский А.М. Клиническая биохимия.– Одесса: Астропринт, 1998. – 608 с.
8. Душейко А.А. Витамин А: обмен и функции. – К.: Наукова думка, 1989. – 288 с.
9. Камышников В.С. Справочник по клинико-биохимической лабораторной диагностике: В 2 т.– Минск: Беларусь, 2000. – Т.1. – 495 с.; Т. 2. – 463 с.
10. Клінічна діагностика внутрішніх хвороб тварин / В.І. Левченко, В.В. Влізло, І.П. Кондрахін та ін.; За ред. В.І. Левченка.– Біла Церква, 2004. – 608 с.
11. Клиническая лабораторная диагностика в ветеринарии / И.П. Кондрахин, Н.В. Курилов, А.Т. Малахов и др. – М.: Агропромиздат, 1985. – 286 с.
12. Клінічна біохімія: Навч. посібник / О.П. Тимошенко, Л.М. Вороніна, В.М. Кравченко та ін.; За ред. О.П. Тимошенко. – Харків, 2003. – 239 с.
13. Кононський О.І. Біохімія тварин. – К.: Вища школа, 1994. – 439 с.
14. Маршалл В.Дж. Клиническая биохимия / Пер. с англ.– М.– СПб., 2000.– 368 с.
15. Мережинский М.Ф., Черкасова Л.С. Основы клинической биохимии.– М.: Медицина, 1965. – 359 с.
16. Лабораторные методы исследования в клинике: Справочник / В.В. Меньшиков, Л.Н. Делекторская, Р.П. Золотницкая и др.; Под ред. В.В. Меньшикова. – М.: Медицина, 1987. – 368 с.
17. Руководство по клинической лабораторной диагностике. – Ч. 3: Клиническая биохимия / Под ред. проф. М.А. Базарновой, В.Т. Морозовой. – К.: Вища школа, 1986.– 279 с.
18. Чечоткін О.В., Воронянський В.І., Карташов М.І. Біохімія сільськогосподарських тварин. – Харків, 2000. – 466 с.

## ЗМІСТ

<b>ВСТУП</b> .....	3
<b>1. МІЖНАРОДНА СИСТЕМА ОДИНИЦЬ ВИМІРЮВАННЯ</b> .....	4
<b>2. ДОСЛІДЖЕННЯ БІЛКОВОГО ОБМІНУ</b> .....	8
2.1. Визначення загального білка в сироватці крові рефрактометричним методом .....	8
2.2. Визначення білкових фракцій сироватки крові.....	9
2.2.1. Визначення білкових фракцій сироватки крові нефелометричним (турбідиметричним) методом .....	10
2.3. Визначення загальної кількості імуноглобулінів.....	12
2.3.1. Визначення загальної кількості імуноглобулінів у сироватці крові.....	13
2.3.2. Визначення загальної кількості імуноглобулінів у молозиві.....	14
2.4. Колоїдно-осадові проби.....	14
2.4.1. Сулемова проба (за Грінстедом).....	15
2.4.2. Проба з розчином міді сульфату (за Постніковим В.С.).....	15
2.4.3. Формолова проба .....	16
2.4.4. Проба Вельтмана (в модифікації Тейфля) .....	16
2.4.5. Коагуляційна стрічка Вельтмана .....	17
2.4.6. Цинк-сульфатна проба .....	17
2.4.7. Тимолова проба .....	19
2.5. Залишковий азот .....	21
2.5.1. Колориметричний метод визначення залишкового азоту в сироватці крові .....	21
2.5.2. Визначення сечовини в сироватці крові (за колірною реакцією з діацетилмонооксимом).....	23
2.5.3. Визначення сечовини у сироватці крові та сечі (за Марш).....	24
2.5.4. Визначення сечової кислоти в сироватці крові .....	26
2.6. Визначення креатиніну .....	28
2.6.1. Визначення креатиніну за колірною реакцією Яффе .....	28
2.6.2. Визначення креатиніну в сироватці крові за колірною реакцією Яффе (метод Поппера).....	30
<b>3. ДОСЛІДЖЕННЯ ЛІПІДНОГО ОБМІНУ</b> .....	31
3.1. Визначення загального холестеролу за методом Златкіс-Зака .....	32
3.2. Визначення загального холестеролу за методом Ілька.....	33
3.3. Визначення кетонів у крові йодометричним методом .....	35
3.3.1. Визначення загальної кількості кетонів .....	36
3.3.2. Визначення ацетону і ацетооцтової кислоти .....	36
3.3.3. Визначення бета-оксималяної кислоти .....	37

<b>4. ДОСЛІДЖЕННЯ ОБМІНУ ВУГЛЕВОДІВ</b> .....	39
4.1. Визначення глюкози за колірною реакцією з орто-толуїдином .....	41
4.2. Визначення глюкози у плазмі крові глюкозо-оксидазним методом .....	42
4.3. Визначення вмісту хондроїтинсульфатів у сироватці крові .....	44
<b>5. ФЕРМЕНТОДІАГНОСТИКА</b> .....	45
5.1. Визначення активності аланінамінотрансферази (АЛТ) і аспартат-амінотрансферази (АСТ) (за методом Рейтмана-Френкеля).....	45
5.2. Визначення активності гамма-глутамілтранспептидази (ГГТП) в сироватці крові .....	47
5.3. Визначення $\alpha$ -амілази (за методом Каравея) .....	49
5.4. Визначення активності лужної фосфатази в сироватці крові (за Боданські).....	51
5.5. Визначення активності лужної фосфатази в сироватці крові (за реакцією гідролізу динатрійфосфату) .....	53
5.6. Визначення активності загальної лужної фосфатази (Вагнер В.К., Путілін М.В., Харабуга Г.Г.) .....	55
5.7. Визначення активності термостабільної лужної фосфатази .....	56
5.8. Визначення активності кишкового ізоферменту лужної фосфатази .....	56
<b>6. ДОСЛІДЖЕННЯ КИСЛОТНО-ОСНОВНОГО БАЛАНСУ</b> .....	58
6.1. Визначення лужного резерву крові дифузійним методом за допомогою здвоєних колб (за Кондрахіним І.П.) .....	58
<b>7. ДОСЛІДЖЕННЯ ПІГМЕНТНОГО ОБМІНУ</b> .....	62
7.1. Визначення білірубину в сироватці крові (за методом Ієндрашика, Клеггорна і Грофа у модифікації Левченка В.І., Влізла В.В., 1988) .....	62
7.2. Визначення білірубину за методом Ієндрашика, Клеггорна і Грофа.....	64
7.3. Визначення кількості гемоглобіну в крові геміглобінціанідним методом (за Піменовою Л.М. та Дервізом Г.В.) .....	66
<b>8. ДОСЛІДЖЕННЯ ОБМІНУ ВІТАМІНУ А</b> .....	69
8.1. Визначення вітаміну А та каротину в сироватці крові і молозиві (за методом Бессея О. в модифікації Левченка В.І. зі співавт., 1998).....	69
<b>9. ДОСЛІДЖЕННЯ ОБМІНУ МАКРО- І МІКРОЕЛЕМЕНТІВ</b> .....	72
9.1. Визначення загального кальцію в реакції з кальційарсеназо III.....	72
9.2. Визначення неорганічного фосфору .....	74
9.2.1. Визначення неорганічного фосфору в сироватці крові (за методом УФ-детекції фосфомолібдатного комплексу).....	75

9.3. Визначення магнію в сироватці крові .....	78
9.4. Визначення магнію методом атомно-абсорбційної спектрофотометрії .....	79
9.5. Визначення хлоридів у сироватці крові .....	80
9.6. Визначення натрію методом атомно-абсорбційної спектрофотометрії .....	81
9.7. Визначення калію методом атомно-абсорбційної спектрофотометрії.....	84
9.8. Визначення заліза .....	85
9.8.1. Визначення заліза в сироватці крові (за реакцією з бета-фенантроліном) .....	86
9.8.2. Визначення заліза методом атомно-абсорбційної спектрофотометрії.....	88
9.9. Визначення міді .....	90
9.9.1. Визначення міді в сироватці крові (за реакцією з бетакупріоном).....	90
9.9.2. Визначення міді методом атомно-абсорбційної спектрофотометрії.....	90
9.10. Визначення цинку .....	91
9.10.1. Визначення цинку методом атомно-абсорбційної спектрофотометрії .....	92
Додатки .....	94
Список рекомендованої літератури .....	100



# БІОХІМІЧНІ МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ КРОВІ ТВАРИН

## Методичні рекомендації

**Левченко** Володимир Іванович  
**Новожицька** Юлія Миколаївна  
**Сахнюк** Володимир Володимирович  
**Тишківський** Михайло Ярославович  
**Головаха** Володимир Іванович  
**Москаленко** Валерій Петрович  
**Вовкотруб** Наталія Володимирівна  
**Розумнюк** Андрій Вікторович  
**Голуб** Ольга Юріївна  
**Тишківська** Наталія Василівна  
**Слівінська** Любов Григорівна  
**Фасоля** Валентина Павлівна  
**Жила** Інна Анатоліївна

*Редактор* О. М. Т р е г у б о в а  
*Комп'ютерна верстка:* О.В. К у х а р е в а

Здано до складання 9.08.2004. Підписано до друку 15.10.2004.  
Формат 60×84<sup>1</sup>/<sub>16</sub>. Папір офсетний № 1. Гарнітура Times New Roman.  
Друк офсетний. Ум. друк. арк. 6,1. Тираж 1000 прим. Зам. 27.

Сектор оперативної поліграфії РВІКВ БДАУ.  
09117, Біла Церква, Соборна площа, 8/1, тел. 3-11-01.

Віддруковано на ВАТ “Білоцерківська друкарня”,  
09112, м. Біла Церква, бульвар 50-річчя Перемоги, 22