

**В.І. Левченко, В.І. Головаха, І.П. Кондрахін, М.В. Рубленко,
В.В. Сахнюк, М.І. Цвіліховський, Л.І. Апуховська, В.М. Безух,
Н.В. Вовкотруб, Д.В. Кібкало, В.П. Москаленко, А.В. Розумнюк,
Л.Г. Слівінська, М.Я. Тишківський, О.В. Чуб**

МЕТОДИ ЛАБОРАТОРНОЇ КЛІНІЧНОЇ ДІАГНОСТИКИ ХВОРОБ ТВАРИН

Навчальний посібник

За редакцією
доктора ветеринарних наук,
академіка НААН України В.І. Левченка

*Рекомендовано Міністерством освіти і науки України
як навчальний посібник для студентів вищих навчальних закладів,
які навчаються за напрямом підготовки “Ветеринарна медицина”*

Київ
Аграрна освіта
2010

УДК 619:616(075)
ББК 48.53.4
М 54

*Гриф надано Міністерством освіти і науки України
(лист від 13.04.10 № 1/12- 14735)*

А в т о р и:

В.І. Левченко, В.І. Головаха, І.П. Кондрахін, М.В. Рубленко,
В.В. Сахнюк, М.І. Цвіліховський, Л.І. Апуховська, В.М. Безух,
Н.В. Вовкотруб, Д.В. Кібкало, В.П. Москаленко, А.В. Розумнюк,
Л.Г. Слівінська, М.Я. Тишківський, О.В. Чуб

Р е ц е н з е н т и:

В.В. Влізло – д. вет. н., академік НААН України (Інститут біології тварин УААН);
В.В. Лисенко – к. вет. н., доцент (Дніпропетровський державний аграрний університет)

М54 **Методи** лабораторної клінічної діагностики хвороб тварин / [В.І. Левченко, В.І. Головаха, І.П.Кондрахін та ін.] ; за ред. В.І. Левченка. – К. : Аграрна освіта, 2010. – 437 с.

ISBN 978-966-7906-77-1

У навчальному посібнику висвітлено методи лабораторної діагностики внутрішніх хвороб тварин та системи гемостазу.

Для студентів факультетів аграрних вищих навчальних закладів, магістрів, аспірантів, докторантів і практичних фахівців лабораторій ветеринарної медицини.

**УДК 619:616(075)
ББК 48.53.4**

ISBN978-966-7906-77-1

© В.І. Левченко,
В.І. Головаха, І.П. Кондрахін та ін., 2010

ВСТУП

На сучасному етапі розвитку ветеринарної медицини діагностична інформативність клінічних симптомів за багатьох захворювань є недостатньою, оскільки з початком розвитку патологічного процесу відбувається інтенсифікація захисних компенсаторно-приспосувальних реакцій організму, які допомагають вести боротьбу за збереження гомеостазу, тобто за здоров'я. І лише тоді, коли захисні системи не в змозі більше компенсувати пошкодження органів, виявляються типові ознаки хвороби, тобто виникає той стан, який ми називаємо хворобою. Проте, лікування тварин на цій стадії надто дорого коштує, а то й малоефективне. Тому, насамперед, украй необхідним є проникнення у таємниці компенсаторних механізмів, пошук з-поміж них специфічних для тієї чи іншої патології реакцій і використання їх для ранньої діагностики внутрішніх хвороб органів.

Отже, першим завданням лабораторних досліджень біологічних субстратів є рання діагностика внутрішніх хвороб тварин.

Проте, лабораторний аналіз дає можливість не лише діагностувати хвороби, а й вивчати їх суть, шляхи розвитку, тобто патогенез. Варто назвати лише кілька хвороб, спричинених порушенням метаболізму (кетоз, гіпоглікемія, післяродова гіпокальціємія, уролітіаз, цукровий діабет і т. ін.). Насамкінець, лабораторний аналіз біологічних субстратів дає можливість рекомендувати оптимальні методи лікування хвороб і контролювати його ефективність.

Перераховані проблеми вирішують теоретичні курси спеціальних предметів: клінічна діагностика, клінічна біохімія, внутрішні хвороби тварин. На жаль, у вищих навчальних закладах відсутні навчальні посіб-

ники, в яких були б викладено методи лабораторного дослідження крові, сечі, вмісту рубця та інших біологічних субстратів. Проблема стала вочевидь ще більш актуальною у зв'язку з уведенням у програми підготовки магістрів курсу “Лабораторна справа”.

Вважаємо, що презентований навчальний посібник заповнить цю нішу і буде корисним не лише студентам, а й працівникам хіміко-токсикологічних відділів лабораторій ветеринарної медицини та науковцям-інтернам.

РОЗДІЛ 1

ОРГАНІЗАЦІЯ РОБОТИ БІОХІМІЧНОЇ ЛАБОРАТОРІЇ

1.1. Приміщення лабораторії

Під біохімічну лабораторію відводять просторе, світле приміщення, забезпечене водопроводом, каналізацією, електроенергією, вентиляцією та централізованим опаленням. Середня норма площі на одного працюючого в лабораторії має бути не менше 14 м². Біохімічна лабораторія не має межувати із приміщеннями ферми, в яких повітря забруднене аміаком і сірководнем, що може негативно вплинути на якість досліджень.

У лабораторії мають бути: робочі кімнати; приміщення для взяття матеріалу від лабораторних тварин; приміщення для приготування і зберігання реактивів; центрифужна кімната; мийна та побутова кімнати.

Для зберігання великих ємностей з кислотами і *горючими* реактивами виділяється комора поза приміщенням лабораторії.

Система електропостачання повинна забезпечувати всі вимірювальні і допоміжні прилади лабораторії. Слід передбачити достатню кількість електророзеток різних типів і обов'язково систему забезпечення електрообладнання.

У лабораторії має бути встановлено припливно-витяжну вентиляцію потужністю не менше триразового обміну повітря за зміну. Всі роботи з газоподібними, леткими та токсичними речовинами потрібно проводити у витяжній шафі. Для підтримання оптимальної температури повітря в приміщенні лабораторії в теплу пору року встановлюють кондиціонери.

У біохімічній лабораторії не має бути зайвих меблів, але робочі хімічні столи мають бути великими, приблизно від 1,5 до 3,0 м² корисної поверхні на кожного працюючого. Це необхідно для того, щоб зручно було розкласти досліджуваний матеріал, реактиви та посуд. Столи слід розміщувати таким чином, щоб світло падало збоку, бажано зліва від працюючого. Сучасні лабораторні хімічні столи мають хімічно стійке декоративне покриття. Якщо ж як покриття був використаний лінолеум, то його необхідно обробити кислотостійкою речовиною. У будь-якому випадку бажано покривати столи склом, товщиною не менше 4 мм. Крім хімічної інертності, це дозволяє розміщувати під склом розрахункові таблиці, номограми та інший довідковий матеріал.

На столі, уздовж всієї довжини, встановлюють горизонтальні полицки для робочих реактивів та штативів з піпетками. Зручно, якщо піпетки та реактиви розкладені в порядку черговості їх використання в ході виконання методики. Це створює певний автоматизм у роботі. На

робочому столі слід встановити також місткість для дистильованої води, посуд для промивання піпеток та ємності з дезінфекційними розчинами для обробки столів і рук персоналу. Дистилятор краще розмістити у мийній кімнаті.

Лабораторію має бути укомплектовано спеціальними шафами для зберігання сильнодіючих і отруйних речовин. Стільці краще підходять типу “вертушки” з мийним покриттям.

Зважувальну техніку слід розміщувати в окремій кімнаті, або ж у місцях, віддалених від опалювальних і нагрівних приладів, а також від місць можливих протягів та дії їдких випаровувань реактивів. З особливою ретельністю ці умови мають бути витримані під час вибору місця для встановлення аналітичних терезів. Слід мати на увазі, що аналітичні терези краще всього встановлювати на спеціальних підставках, закріплених на кронштейнах у капітальній стіні. Як виняток, ваги можуть бути розміщені на масивних важких столах. У будь-якому разі повинна бути виключена вірогідність струшування терезів.

Фотометричну апаратуру також необхідно концентрувати в окремій кімнаті-апаратній, або ж на столі, де не виконуються основні робочі маніпуляції. У всіх місцях встановлення лабораторних приладів будь-якого класу обов'язково мають бути правила роботи на них. У доступному місці для персоналу лабораторії розміщують типові правила з техніки безпеки, пожежної безпеки і дотримання правил санітарії та гігієни. Тут же має знаходитись аптечка для надання першої медичної допомоги з урахуванням специфіки роботи лабораторії.

У лабораторії мають бути письмові столи, на яких виконуються розрахунки, здійснюються виписки та проводиться реєстрація результатів. На цих столах знаходяться журнали реєстрації, довідкова література.

1.2. Підготовка лабораторного посуду до аналізу

Хіміко-лабораторний посуд для біохімічного дослідження виготовляється зі скла різних марок залежно від його призначення. У лабораторіях використовують посуд загального (пробірки, хімічні стакани, лійки прості, плоскодонні й конічні колби, холодильники тощо) і спеціального призначення (ексикатори, крапельниці, колби К'ельдаля, хлоркальцієві трубки) та мірну (мірні колби і циліндри, мензурки, градуйовані піпетки, мікропіпетки, бюретки). Окрім скляного, використовують також порцеляновий посуд (стакани, випарювальні чашки, ступки, тиглі), металічне обладнання (штативи, затискачі, пінцети, щипці, тиглі і т. ін.) та інструментарій.

Неодмінною і обов'язковою вимогою для лабораторних досліджень є чистота хімічного посуду. Скляний посуд вважається чистим, якщо під час ополіскування водою на стінках не утворюються краплі і вода стікає тоненькою рівномірною струминкою.

Якщо посуд не забруднений жирами та іншими речовинами, що не розчиняються у воді, його миють теплою водою, а для видалення твердих залишків бруду використовують щітки, волосяні йоржики, скляні палички зі шматочком гумової трубочки, надітої на її нижній кінець. Після миття водопровідною водою посуд обов'язково ополіскують 2–3 рази дистильованою, висушують і лише після цього миють спеціальними сумішами.

Найбільш ефективним мийним засобом є хромова суміш, яка містить два окиснювачі: дихромат (біхромат) калію ($K_2Cr_2O_7$) і сульфатну (сірчану) кислоту (H_2SO_4). Хромова суміш («хромпик») – це 5% за масою розчин $K_2Cr_2O_7$ у концентрованій сульфатній кислоті (густина $1,84 \text{ кг/м}^3$). На 100 мл кислоти беруть 9,2 г подрібненого кристалічного $K_2Cr_2O_7$ і обережно нагрівають у фарфоровій чашці, помішуючи скляною паличкою до розчинення дихромату. Хромову суміш зберігають у скляному ексікаторі з кришкою, краї якої змащені вазеліном.

Сухий посуд поміщають у ексікатор з «хромпиком», через кілька годин обережно виймають тигельними щипцями або пінцетом (працювати слід у гумових рукавицях), поміщають у порцелянову або емальовану посудину денцем догори, потім 7–10 разів обмивають водопровідною і 3–4 рази – дистильованою водою. У великий посуд хромову суміш наливають, обережно повертаючи його, змочують внутрішню стінку, суміш виливають у ексікатор. Після ополіскування водою посуд висушують у сушильній шафі.

Хромову суміш використовують до зміни її кольору від темно-оранжевого до темно-зеленого. З метою більш тривалого використання хромової суміші хімічний посуд миють синтетичними мийними засобами (пральними порошками), ополіскують 10–15 разів водою, сушать, а потім миють «хромпиком».

Робота з розчином калію двохромовоокислого у сульфатній кислоті вимагає дотримання правил техніки безпеки: замочування слід проводити в закритих посудинах, або у витяжній шафі; працювати із сумішшю обережно – слід захищати шкіру рук, очі, одяг від потрапляння на них суміші.

Посуд після молока, крові, жирів, мінеральних масел перед обробкою хромовою сумішшю миють у міцному лузі (40%). Якщо посуд забруднений воском, парафіном, мінеральною олією, то його миють органічними розчинниками. Для деяких досліджень необхідне додаткове миття.

Одноразовий пластиковий посуд (пробірки тощо) після зняття упаковки використовують без миття. Проте для аналітичних досліджень використовувати його не можна.

1.3. Хімічні реактиви

Хімічні реактиви – це речовини, які використовуються в процесі проведення аналізів. Хімічні реактиви випускаються промисловістю з різним ступенем чистоти. У лабораторних дослідженнях використовують реактиви таких типів: а) *технічний реактив* – містить значну кількість домішок і для виконання аналізів непридатний. На етикетці позначається літерою “Т”. Використовується тільки для допоміжних цілей, наприклад, технічна сульфатна кислота застосовується для приготування хромової суміші; б) *чистий реактив* (від лат. *purum* – чистий) має до 0,1% домішок. На етикетці позначається літерою “Ч”; в) *чистий для аналізу реактив* – вміст домішок не перевищує 0,07% (лат. *P.P.A* – *purum pro analisi*). На етикетці позначається літерами “Ч Д А”; г) *хімічно чистий реактив* – вміст домішок не перевищує 0,03% (лат. *P.S.S.* – *purissimus*). На етикетці позначається літерами “Х Ч”.

Реактиви типу “Ч”, “Ч Д А” та “Х Ч” використовуються безпосередньо для проведення біохімічних аналізів.

У лабораторії завжди необхідно мати певний запас реактивів, який забезпечує безперебійне виконання аналізів. Це вимагає від співробітників суворого дотримання багатьох умов і правил зберігання реактивів. По-перше, реактиви повинні зберігатися у добре закритій тарі, як правило, скляній. Винятком є плавикова кислота та її солі, які руйнують скло. Їх зберігають у поліетиленовому посуді. Для реактивів, які розкладаються на світлі, використовується посуд із темного скла. Закупорювати ємності краще всього пластиковими корками. Можна також використовувати коркові та гумові пробки. Однак слід мати на увазі, що гумові пробки руйнуються галогенами, концентрованими кислотами та ін., тому вони непридатні для ємностей, які містять йод, бром та їдкі речовини. Такі ємності закривають притертими скляними пробками. Навпаки, для зберігання розчинів лугів непридатні скляні пробки, краще підходять гумові.

По-друге, якість реактивів значно залежить від температурного режиму їх зберігання. Реактиви, на етикетках яких вказано температуру зберігання не вище 4°С, потрібно утримувати у холодильнику. Це, наприклад, НАД окиснений та відновлений, майже всі набори реактивів вітчизняного й імпортного виробництва. Якщо ж температура зберігання

реактивів не обумовлюється, то вони можуть зберігатися в спеціальних шафах. Для того, щоб швидко знаходити необхідний реактив, ємності з реактивами розміщують у шафах у певному порядку. Наприклад, за класами сполук – солі, кислоти, луги. Назви всіх реактивів, які зберігаються в шафах, записують у спеціальний журнал чи вводять у пам'ять комп'ютера за прізвищем працівника в алфавітному порядку, зазначаючи проти кожного реактиву номер шафи, відсіку і полички, де зберігається цей реактив. Це значно полегшує пошук потрібного реактиву. На етикетках приготовлених реактивів необхідно вказувати дату і прізвище відповідального за приготування.

По-третє, особливих умов зберігання потребують отрути та легкозаймісті реактиви. Отрути в лабораторії слід утримувати в сейфах із суворим обліком їх витрат. Легкозаймісті реактиви зберігаються за межами приміщення лабораторії в коморах чи підвалах із дотриманням усіх заходів безпеки. На робочих місцях легкозаймісті реактиви повинні бути в кількості, яка не перевищує денну норму, до того ж їх розміщують на віддалі від відкритого полум'я і місць можливої появи іскри від електроприладів.

Важливим моментом в організації роботи з реактивами є правильно організований облік руху реактивів у лабораторії. Як правило, його здійснюють за каталожним принципом. На кожний реактив установлюють картку, в якій вказують дату і кількість надходження, дату і кількість витрат, та залишок на поточний момент. Крім того, карткові дані вводяться у пам'ять комп'ютера. Добре налагоджена форма обліку дозволяє мати чітку інформацію про наявність реактивів, своєчасно їх поповнювати і складати звіт про витрати реактивів.

Правила роботи з реактивами

1. Ємності з реактивами, які не мають етикеток з указанням складу їх вмісту, ліквідуються. Це ж саме стосується реактивів із закінченим терміном придатності.

2. Під час визначення запаху реактиву відповідну ємність необхідно тримати на відстані, спрямовуючи до себе рухом долоні пари речовин. Це дозволяє запобігти хімічному опіку слизових оболонок носа та очей.

3. Готуючи розчини кислот, потрібно мати на увазі, що кислота додається в останню чергу. *Тобто, кислоту наливають у воду, а не навпаки.* В іншому випадку це може призвести до сильного нагріву суміші, аж до її закипання та розбризкування кислоти, що особливо характерно для сірчаної (сульфатної) кислоти.

4. Готуючи розчини, можна прискорити процес розчинення твердої речовини, якщо попередньо подрібнити її у порцеляновій ступці.

5. Розчинність речовини можна також підвищити шляхом нагрівання ємності з розчином на водяній бані. Але це виконують лише для речовин,

розчинення яких відбувається з поглинанням тепла. Нагрівати розчини речовин можна тільки до певної температури, щоб не викликати їх розкладання.

6. Реактиви, які зберігалися в холодильнику, перед зважуванням витримують за кімнатної температури не менше 20 хв.

1.4. Приготування і зберігання точних розчинів

Розчини – це однорідні суміші, які складаються із розчиненої речовини, розчинника та продуктів їх взаємодії.

Залежно від способу вираження концентрації речовини, розчини класифікують на відсоткові (або приблизні) і титровані (або точні).

Відсоткові розчини допускають можливість відхилення у наважці речовини в межах $\pm 1\%$. Титровані розчини, навпаки, потребують наважки речовини, взятої з точністю до 0,1 мг на аналітичних терезах. До титрованих розчинів належать молярні і нормальні розчини.

Приготування титрованих (точних) розчинів. Особливістю цих розчинів є те, що для їх приготування немає потреби розраховувати об'єм розчинника. Концентрація їх завжди задається із розрахунку на приготування 1 л розчину. Готують точні розчини обов'язково у мірних колбах. Наважку речовини беруть на 1 л і після розчинення в невеликій кількості розчинника об'єм доводять ним до верхньої позначки колби.

Молярні розчини – це розчини, які містять певну кількість грам-молів речовини в 1 л розчину.

Грам-моль (г/м) речовини – це кількість речовини в грамах, яка чисельно дорівнює її молекулярній масі. Наприклад, молекулярна маса (Мм) NaOH дорівнює 40. Відповідно, 1 грам-моль NaOH дорівнює 40 г, і розчин, який містить таку кількість NaOH, буде одномолярним. Молярну концентрацію позначають великою літерою “М”. Молярні розчини з концентраціями, які відрізняються між собою на один порядок цифрового виразу, мають такі назви: 1 М – молярний; 0,1 М – децимолярний; 0,01 М – сантимольярний; 0,001 М – мілімолярний.

Залежно від характеру речовини, яка розчиняється, розрізняють три варіанти приготування молярних розчинів.

Варіант 1. Речовина, яка розчиняється, тверда, не кристалогідрат. Здійснюють такі операції:

1. Розраховують величину наважки речовини в грамах:

$$P_n, g = \text{задана величина молярності (M)} \cdot M_m \text{ речовини,}$$

де P_n – практична наважка речовини.

2. Переносять наважку речовини у мірну колбу на 1 л і після розчинення доводять об'єм до позначки.

Наприклад: потрібно приготувати 0,25 М розчин натрію гідроксиду (NaOH). Молекулярна маса NaOH = 40.

Розраховуємо необхідну величину наважки в грамах:

$$P_{н, г} = 0,25 \cdot 40 = 10 г.$$

Зважену кількість NaOH – 10 г попередньо розчиняємо в хімічному стакані, приблизно у третій частині необхідного об'єму дистильованої води, тому що процес розчинення лугу супроводжується виділенням значної кількості тепла, а потім, після охолодження розчину, його кількісно переносять у мірну колбу на 1 л і доводять об'єм дистильованою водою до позначки.

Варіант 2. Речовина, яка розчиняється, є кристалогідратом. Здійснюють такі операції:

1. Розраховують величину наважки речовини в грамах:

$$P_{н, г} = \text{задана величина молярності (M)} \cdot M_{м} \text{ кристалогідрату.}$$

2. Переносять наважку речовини у мірну колбу на 1 л і готують водний розчин.

Наприклад: необхідно приготувати 0,5 М розчин міді сульфату із кристалогідрату зі вмістом 5 молекул води. Молекулярна маса $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O} = 249,5$.

1. Розраховуємо необхідну наважку $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ в грамах:

$$P_{н, г} = 0,5 \cdot 249,5 = 124,75 г.$$

2. Зважуємо потрібну кількість мідного купоросу, попередньо розчиняємо його в невеликому об'ємі води в хімічному стакані, кількісно переносимо в мірну колбу на 1 л і доводимо об'єм розчину в колбі дистильованою водою до позначки.

Варіант 3. Речовина, яку необхідно розчинити, є рідиною, але не на 100 відсотків. Здійснюють такі операції:

1. Розраховують величину теоретичної наважки у грамах:

$$T_{н} = \text{задана величина молярності (M)} \cdot M_{м} \text{ рідини,}$$

де $T_{н}$ – теоретична наважка речовини.

2. Розраховують величину практичної наважки в грамах:

$$P_{н, г} = \frac{T_{н} \cdot 100\%}{\% \text{ вихідної рідини}}.$$

3. Розраховують величину практичної наважки в мілілітрах:

$$P_{н, мл} = \frac{P_{н, г}}{\rho},$$

де ρ – густина (щільність) речовини, г/см^3 (кг/м^3).

4. Відміряють потрібний об'єм рідини в мілілітрах, переносять у мірну колбу на 1 л і доводять об'єм до позначки дистильованою водою.

Наприклад: необхідно приготувати 0,1 М розчин HCl з $\rho = 1,16$ із концентрованої хлоридної (соляної) кислоти з вихідною концентрацією 37,1%. Молекулярна маса HCl = 36,5.

1. Розраховуємо величину T_n хлоридної кислоти в грамах:

$$T_n, \text{ г} = 0,1 \cdot 36,5 = 3,65 \text{ г.}$$

2. Розраховуємо величину P_n хлоридної кислоти в грамах:

$$P_n, \text{ г} = \frac{3,65 \cdot 100\%}{37,1\%} = 9,83 \text{ г.}$$

3. Розраховуємо величину P_n хлоридної кислоти в мілілітрах:

$$P_n, \text{ мл} = \frac{9,83}{1,16} = 8,5 \text{ мл.}$$

4. Відміряємо 8,5 мл HCl, переносимо її в мірну колбу об'ємом 1 л, яка вже містить приблизно половинну кількість дистильованої води, перемішуємо і доводимо об'єм колби до позначки водою.

Якщо немає потреби готувати у великій кількості (1 л) молярні розчини, то їх можна готувати у мірній колбі меншого об'єму, але обов'язково в кратну кількість разів, зменшуючи і наважку речовини, яку необхідно розчинити. Наприклад, якщо за результатами останнього розрахунку потрібно приготувати не 1 л, а 100 мл 0,1 М розчину HCl, то відповідно у 10 разів зменшують і об'єм HCl – у мірну колбу на 100 мл поміщають 0,85 мл HCl. Після приготування цей розчин також буде 0,1 М.

Нормальні розчини – це розчини, які містять певну кількість грам-еквівалента речовини в 1 л розчину. *Грам-еквівалент* (Г-е) речовини – це кількість речовини в грамах, яка чисельно дорівнює його еквіваленту. Під еквівалентом речовини розуміють частину її молекули, яка бере участь у реакціях.

Еквівалент лугу дорівнює молекулярній масі лугу, поділеній на кількість гідроксильних груп, які містяться в молекулі лугу.

Наприклад, еквівалент гідрату окису кальцію (кальцію гідроксиду) з молекулярною масою 74 розраховується так:

$$E_{Ca(OH)_2} = \frac{74}{2} = 37, \text{ тобто } 1\text{-г-е } Ca(OH)_2 = 37 \text{ г.}$$

Еквівалент кислоти дорівнює молекулярній масі кислоти, поділеній на кількість атомів водню в її молекулі (для неорганічних кислот) чи на кількість атомів водню в карбоксильній групі кислоти (для органічних кислот).

Наприклад, еквівалент сульфатної (сірчаної) кислоти з молекулярною масою 98 розраховується так:

$$E_{H_2SO_4} = \frac{98}{2} = 49, \text{ тобто } 1\text{-г-е } H_2SO_4 = 49 \text{ г.}$$

Еквівалент солі дорівнює молекулярній масі солі, поділеній на добуток кількості атомів металу на його валентність.

Наприклад, еквівалент алюмінію сульфату з молекулярною масою 342 розраховується так:

$$E Al_2(SO_4)_3 = \frac{342}{2 \cdot 3} = 57, \text{ тобто } 1\text{-е } Al_2(SO_4)_3 = 57 \text{ г.}$$

Нормальну концентрацію позначають літерою “Н”. Нормальні розчини з концентраціями, які відрізняються між собою на один порядок цифрового виразу, мають такі назви: 1 Н – нормальний; 0,1 Н – децинормальний; 0,01 Н – сантинормальний; 0,001 Н – мілінормальний.

Залежно від характеру речовини, яка розчиняється, розрізняють три варіанти приготування розчинів з нормальною концентрацією.

Варіант 1. Речовина, яку необхідно розчинити, тверда, не кристалогідрат.

1. Розраховують еквівалент речовини.

2. Розраховують величину наважки речовини в грамах.

$$P_n, \text{ г} = \text{задана величина нормальності (nH)} \cdot \text{г-е.}$$

3. Переносять наважку речовини у мірну колбу на 1 л і готують водний розчин.

Наприклад: необхідно приготувати 0,1 н розчин NaOH. Молекулярна маса NaOH = 40.

1. Розраховуємо еквівалент NaOH:

$$NaOH = \frac{40}{1} = 40 \text{ г.}$$

2. Розраховуємо величину наважки NaOH в грамах:

$$P_n, \text{ г} = 0,1 \cdot 40 = 4 \text{ г.}$$

3. Зважують 4 г NaOH, поміщають у хімічний стакан, розчиняють у невеликому об’ємі дистильованої води і після охолодження переносять у мірну колбу на 1 л, доводять об’єм колби дистильованою водою до позначки.

Варіант 2. Речовина, яку потрібно розчинити, кристалогідрат.

1. Розраховують еквівалент речовини.

2. Розраховують величину наважки речовини в грамах:

$$P_n, \text{ г} = \text{задана величина нормальності (nH)} \cdot \text{г-е кристалогідрату.}$$

3. Переносять наважку речовини у мірну колбу на 1 літр і готують водний розчин.

Наприклад: необхідно приготувати 0,5 н розчин міді сульфату із кристалогідрату із вмістом 5 молекул води.

$$CuSO_4 \cdot 5H_2O; M_m = 249,5.$$

1. Розраховують еквівалент $CuSO_4 \cdot 5H_2O$:

$$E \text{ CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O} = \frac{249,5}{2} = 124,75.$$

2. Розраховують величину наважки мідного купоросу в грамах:

$$P_{н, г} = 0,5 \cdot 124,75 = 62,375 \text{ г}.$$

3. Зважують 62,375 г $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, поміщають у хімічний стакан, розчиняють у невеликому об'ємі дистильованої води і переносять у мірну колбу на 1 л, доводять об'єм розчину дистильованою водою до позначки на колбі.

Варіант 3. Речовина, яку потрібно розчинити, є рідиною, але не на 100 відсотків.

1. Розраховують еквівалент речовини.

2. Розраховують величину теоретичної наважки в грамах:

$$T_{н} = \text{задана величина нормальності (nH)} \cdot z\text{-e}.$$

3. Розраховують величину практичної наважки в грамах:

$$P_{н, г} = \frac{T_{н} \cdot 100\%}{\% \text{ вихідної рідини}}.$$

4. Розраховують величину практичної наважки в мілілітрах:

$$P_{н, мл} = \frac{P_{н, г}}{\rho}.$$

5. Відміряють необхідний об'єм рідини в мілілітрах, переносять у мірну колбу на 1 л і доводять об'єм до позначки дистильованою водою.

Наприклад, потрібно приготувати 0,2 н розчин сульфатної (сірчаної) кислоти з $\rho = 1,83$ з концентрованої з вихідною концентрацією 93,8%. Молекулярна маса $\text{H}_2\text{SO}_4 = 98$.

1. Розраховують еквівалент H_2SO_4 :

$$E \text{ H}_2\text{SO}_4 = \frac{98}{2} = 49.$$

2. Розраховують теоретичну наважку H_2SO_4 в грамах:

$$T_{н, г} = 0,2 \cdot 49 = 9,8 \text{ г}.$$

3. Розраховують практичну наважку H_2SO_4 в грамах:

$$P_{н, г} = \frac{9,8 \cdot 100\%}{93,8} = 10,4 \text{ г}.$$

4. Розраховують практичну наважку H_2SO_4 в мілілітрах:

$$P_{н, мл} = \frac{10,4}{1,83} = 5,7 \text{ мл}.$$

5. Відміряють 5,7 мл H_2SO_4 , переносять її в хімічний стакан, який містить приблизно 0,5 л дистильованої води, перемішують і після

охолодження переносять у мірну колбу на 1 л, доводять об'єм у колбі невеликими порціями дистильованої води до позначки.

Як і у випадку з молярними розчинами, якщо немає необхідності готувати великий об'єм нормального розчину, можна використовувати мірну колбу меншої ємності, ніж 1 л, однак обов'язково у кратну кількість разів зменшуючи наважку речовини, яку потрібно розчинити.

Приготування точних розчинів із фіксаналів. Фіксанали використовуються для швидкого приготування точних розчинів. Фіксанал являє собою завчасно приготовлену і запаяну в скляні ампули точно зважену кількість речовини, яка необхідна для приготування 1 л, як правило 0,1 н розчину, хоча є й інші вихідні концентрації речовин. На кожній ампулі нанесено назву речовини і її грам-еквівалент. Зручність у користуванні фіксаналами полягає в тому, що у разі необхідності приготувати точний розчин випадають етапи попереднього розрахунку наважки речовини і її зважування.

Правила використання фіксаналу наступні.

1. Видаляють з ампули напис. Це можна зробити змоченим у спирті ватним тампоном, після чого ампулу обмивають дистильованою водою.

2. У мірну колбу на 1 л вставляють скляну лійку, в яку кладуть скляний бойок, що прикладається до набору фіксаналів. Бойок перед використанням також обмивають дистильованою водою.

3. Вставляють у лійку ампулу таким чином, щоб її втягнуте дно торкалося бойка. Після цього злегка б'ють дном ампули по бойку. Одночасно пробивають отвір у верхньому заглибленні ампули і після її випорожнення промивають внутрішні стінки невеликими порціями дистильованої води, змиваючи залишки вмісту в колбу.

4. Після здійснених процедур об'єм розчину доводять дистильованою водою до позначки і ретельно перемішують, закривши колбу скляною пробкою.

З 0,1 н розчину фіксаналу можна готувати і нормальні розчини з іншою концентрацією, для чого достатньо маніпулювати об'ємом розчинника.

Наприклад, із 0,1 н наважки фіксаналу можна приготувати 1 н розчин, якщо його вміст перенести у мірну колбу на 100 мл. Можна отримати 0,2 н розчин, розчинивши фіксанальну наважку в мірній колбі ємністю на 500 мл. Для приготування 0,5 н розчину використовують мірну колбу ємністю 200 мл.

1.5. Контроль якості біохімічних досліджень

Контроль якості біохімічних досліджень передбачає систему заходів, які спрямовані на підвищення збіжності, відтворюваності, правильності і точності результатів діагностичного лабораторного обстеження хворих тварин. Контроль якості дозволяє своєчасно виявляти і попереджувати випадкові й систематичні похибки в ході виконання аналізу.

У системі лабораторного контролю використовуються спеціальні контрольні матеріали (еталонні розчини різних речовин, контрольні сироватки типу “Сероконт-В”, “Сероконт-П-еквін”, “Патосероконт-П-еквін”, “Серотрол”, “Сермікс” та ін.), а також різні методи статистичної обробки результатів контрольних досліджень.

Контроль якості біохімічних досліджень поділяють на внутрішньолабораторний та міжлабораторний.

Внутрішньолабораторний контроль – вирішує завдання підвищення якісного рівня роботи лабораторій за рахунок покращення збіжності, відтворюваності та правильності виконаних досліджень, а також запобігає випадковим похибкам у процесі аналізу.

Внутрішньолабораторний контроль на відтворюваність здійснюється статистичним методом контрольних карт. Для його проведення використовують контрольну сироватку “Сероконт-В”. Це суха ліофілізована сироватка коней, яку використовують саме з метою відтворюваності біохімічних досліджень. Роботу умовно поділяють на чотири етапи.

Етап 1 – підготовчий – полягає в зборі даних для статистичної обробки. З цією метою кожний день, паралельно з пробами матеріалу від хворих тварин, досліджується проба з контрольною сироваткою. По кожному тесту, взятому на контроль, необхідно набрати не менше 20–25 результатів.

Етап 2 – статистична обробка одержаних результатів

Розраховуються наступні результати:

а) Середньоарифметична величина:

$$\bar{X} = \frac{\sum X_n}{n},$$

де \bar{X} – середньоарифметична величина; X_n – сума всіх набраних результатів; n – кількість взятих до розрахунку результатів.

б) Середньоквадратичне відхилення:

$$S = \pm \sqrt{\frac{\sum (\bar{X} - X_n)^2}{n-1}},$$

де S – середньоквадратичне відхилення.

в) Коефіцієнт варіації:

$$V = \frac{S}{\bar{X}} \cdot 100\%,$$

де V – коефіцієнт варіації.

Для більшості біохімічних тестів коефіцієнт варіації не повинен перевищувати 5, а для ферментів – 10%.

Якщо значення коефіцієнта кореляції не перевищує вказаних величин, то переходять до наступного етапу контролю на відтворюваність – побудови контрольної карти. Якщо ж значення коефіцієнта кореляції вище цих величин, то необхідно з вибірки даних виключити сумнівні результати за допомогою критерію “Т” за формулою:

$$T = \frac{\bar{X} - X_n}{S}.$$

Якщо критерій “Т” вище 2,62, то цей результат виключається. Далі слід повторити всі розрахунки спочатку, аж до одержання прийнятної величини коефіцієнта варіації “V”.

Ще кращий перехід – відразу ж перед початком розрахунків виключити з вибірки ті результати, які суттєво відрізняються від основної маси даних. Це дозволяє уникнути необхідності багаторазових перерахунків.

Етап 3 – побудова контрольної карти

а) Спочатку визначають контрольні межі $\pm 1S$; $\pm 2S$; $\pm 3S$. Наприклад, за результатами статистичної обробки контрольного тесту одержали $\bar{X} = 6,0$ ммоль/л; $S = 0,3$; $V = 5\%$. Контрольні межі розраховуємо так:

$$+1S = \bar{X} + S = 6,0 + 0,3 = 6,3 \text{ ммоль/л;}$$

$$-1S = \bar{X} - S = 6,0 - 0,3 = 5,7 \text{ ммоль/л;}$$

$$+2S = \bar{X} + 2S = 6,0 + 0,6 = 6,6 \text{ ммоль/л;}$$

$$-2S = \bar{X} - 2S = 6,0 - 0,6 = 5,4 \text{ ммоль/л;}$$

$$+3S = \bar{X} + 3S = 6,0 + 0,9 = 6,9 \text{ ммоль/л;}$$

$$-3S = \bar{X} - 3S = 6,0 - 0,9 = 5,1 \text{ ммоль/л;}$$

На основі одержаних параметрів будують контрольну карту. Її готують на спеціальних бланках або ж на міліметровому папері.

Будують систему координат: на осі абсцис зазначають дату дослідження, а на осі ординат – відкладають значення концентрації, дотримуючись певного вибраного масштабу. Середньоарифметичну величину концентрації (\bar{X}) відкладають у центрі осі ординат. Із цієї точки до осі ординат встановлюють перпендикуляр, який паралельний осі абсцис і називається “лінією середньоарифметичного значення” (\bar{X}). Вгору від лінії \bar{X} вздовж осі ординат відкладають плюсові значення концентрації, а донизу – мінусові значення концентрації. З обох боків осі ординат крапками відзначають контрольні межі $\pm 1S$; $\pm 2S$; $\pm 3S$. Від них проводять лінії, які

паралельні лінії середньоарифметичного значення. У такому вигляді контрольна карта готова до використання. Загальний вигляд контрольної карти показаний на рисунку 1.1.

Етап 4 – робота з контрольною картою

Контрольна карта з позначеними на ній результатами дослідження контрольної сироватки, як дзеркало, відображає можливі похибки в роботі і дозволяє своєчасно вжити заходи для їх усунення. Про помилки сигналізують на контрольній карті так звані “Попереджувальні” і “Контрольні” критерії.

Попереджувальні критерії свідчать про створене неблагополуччя в роботі і загрозу появи грубих помилок. У разі появи цих критеріїв дослідник зобов’язаний ретельно проаналізувати весь хід роботи: перевірити розчини реактивів, які використовувалися для досліджень, калібрувальні графіки, стандартні розчини, роботу вимірювальних і допоміжних приладів. Якщо цього не зробити чи застосувати малоефективні засоби, то на контрольній карті з’являться “контрольні критерії”.

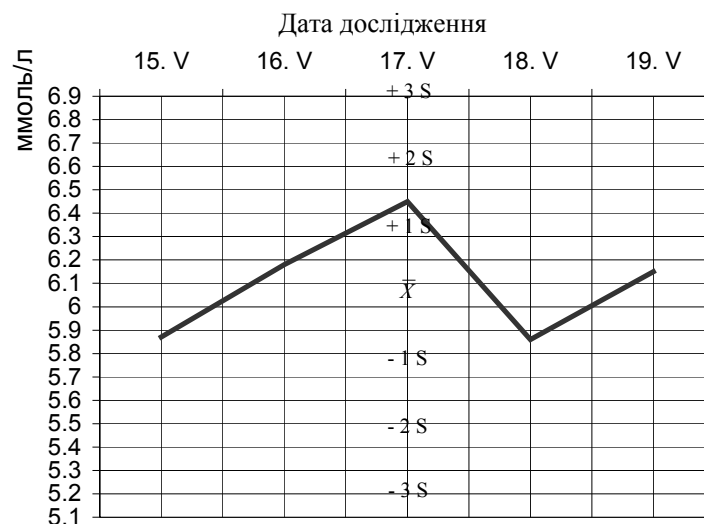


Рис. 1.1. Контрольна карта

Контрольні критерії свідчать, що всі результати аналізів, які виконані для хворих тварин за даним тестом, не мають діагностичного значення і вважаються грубою похибкою. У лабораторії необхідно здійснити заходи щодо виявлення причини помилки і усунути її. Тільки після цього можна повторно взяти матеріал у хворих тварин і виконати дослідження.

Попереджувальні критерії

1. Шість результатів підряд знаходяться по один бік від лінії середньоарифметичного значення.

2. Шість результатів підряд мають тенденцію до одноманітного підвищення чи пониження.

3. Три результати підряд знаходяться за межами одного середньоквадратичного відхилення.

4 Один результат розміщений за межами двох середньоквадратичних відхилень.

Контрольні критерії

1. Вісім результатів поспіль знаходяться по один бік від лінії середньоарифметичного значення.

2. Вісім результатів поспіль мають тенденцію до одноманітного підвищення чи зниження.

3. П'ять результатів поспіль знаходяться за межами одного середньоквадратичного відхилення.

4. Три результати поспіль виходять за межі двох середньоквадратичних відхилень.

5. Один результат виходить за межі трьох середньоквадратичних відхилень.

Внутрішньолабораторний контроль на правильність досліджень здійснюється за необхідності. Наприклад:

а) у разі появи попереджувальних або контрольних критеріїв на контрольній карті;

б) у процесі відпрацювання нових методів дослідження;

в) під час використання нової вимірювальної апаратури;

г) під час використання нової партії реактивів;

д) для контролю за роботою працівників у лабораторії.

Для проведення внутрішньолабораторного контролю на правильність досліджень використовуються контрольні сироватки з атестованим вмістом компонентів типу “Сероконт-П-еквін”, “Сероконт-П” та “Патосероконт-П”. Якщо одержаний результат вкладається в допустимі межі коливань ($\bar{X} \pm 2S$) для цього компонента згідно з наведеними паспортними даними контрольної сироватки, то такий результат вважається правильним.

Міжлабораторний контроль здійснюється одночасно у великій групі лабораторій шляхом дослідження однакового контрольного матеріалу за повною програмою. Всі контрольні тести виконуються уніфікованими методами. Це дозволяє проводити порівняння результатів досліджень, виконаних у різних лабораторіях, між собою, тобто оцінювати відтворюваність результатів досліджень щодо кожного тесту. В цілому, міжлабораторний контроль дозволяє одержати достатньо об'єктивний матеріал для того, щоб зробити висновки про якісний рівень роботи кожної лабораторії.

Метою міжлабораторного контролю є досягнення порівнювальних результатів досліджень у лабораторіях і ліквідація похибок в їх роботі. Міжлабораторний контроль дає можливість не лише виявити випадкові

похибки, а й виявляє систематичні похибки, які неможливо встановити на рівні внутрішньолабораторного контролю.

1.6. Основна апаратура в лабораторній клінічній діагностиці

Матеріально-технічне обладнання клініко-діагностичних лабораторій залежить від рівня закладу, на базі якого вона працює, а також від завдань і перспективи розвитку лабораторії. Однак є перелік лабораторного обладнання, зокрема оптичні прилади (фотоелектроколориметри, спектрофотометри, рефрактометри тощо), витяжна і сушильна шафи, термостат, водяна баня, ваги аналітичні, технічні та ін., центрифуги, дистилятор, камери для електрофорезу, термометри, урометри, секундоміри тощо, без чого клініко-діагностична лабораторія будь-якого рівня функціонувати не може.

В останні роки відомчі централізовані клініко-діагностичні лабораторії, спеціалізовані діагностичні центри комплектуються автоматичними біохімічними та гематологічними аналізаторами, атомно-абсорбційними спектрофотометрами, газовими і рідинними хроматографами, хроматомаспектрометрами, комплектами обладнання для імуноферментного аналізу (ІФА) та полімеразно-ланцюгової реакції (ПЛР).

У клінічній лабораторній діагностиці використовуються наступні групи вимірювальних приладів: а) *оптоелектричні* (для проведення оптичних вимірювань); б) *електрохімічні* (для електрохімічних вимірювань); в) прилади, що дозволяють виконувати дві функції – вимірювальну і препаративну: хроматографи та обладнання для електрофорезу.

Оптоелектричні прилади використовуються для різноманітних вимірювань, зокрема:

а) світлопоглинання (абсорбція світла) – колориметри, спектрофотометри;

б) флуоресценції – флуориметри, спектрофлуориметри;

в) оптичної активності розчинів – поляриметри;

г) інтенсивності світловипромінювання (інтенсивності забарвлення полум'я) – полум'яні фотометри;

д) світлорозсіювання (мутні суспензії та емульсії) – нефелометри, турбідиметри).

До приладів для електрохімічних вимірювань відносять потенціометри (рН-метри), полярографи та обладнання для визначення кислотно-основного балансу.

Оптичний кількісний аналіз оснований на реєстрації змін, що відбуваються з світловим променем під час проходження його через досліджуваний зразок. Якщо реєструється інтенсивність поглинання – це абсорбційна фотометрія; світіння молекул і атомів речовини – флюорометрія та полуменева фотометрія; величина відхилення монохроматичного світлового потоку від початкового напрямку його поширення – рефрактометрія; зміна кута обертання плоскополяризованого світла – поляриметрія.

У міжнародній системі одиниць СІ одиницею довжини світлової хвилі є метр. За одиницю довжини хвилі в ультрафіолетовій, видимій та інфрачервоній зонах спектра прийнято нанометр ($1 \text{ нм} = 10^{-9} \text{ м}$).

Залежно від довжини хвилі змінюється характер випромінювання, тому електромагнітний спектр розділено на зони:

- а) гамма- і космічні промені з довжиною хвилі 0,1–0,9 нм;
- б) ультрафіолетовий спектр – 100–380 нм;
- в) видима зона спектра – 380–760 нм;
- 3) інфрачервоний спектр – 760–3000 нм.

У клінічній хімії найбільш широко використовують випромінювання видимої, а також ультрафіолетової та інфрачервоної зон спектра.

Фотоколориметрія – це вимірювання інтенсивності поглинання видимої зони спектра забарвленими розчинами. При цьому оптична щільність вимірювальних розчинів прямо пропорційна концентрації забарвленого розчину. Використовуються найбільш прості за конструкцією та правилами експлуатації прилади – колориметри (ФЕК-56М, КФК), які обладнані комплектом змінних світлофільтрів. Це дозволяє проводити вимірювання дослідних зразків у широкому діапазоні фіксованих (ФЕК, КФК-2) і нефіксованих (КФК-3) значень довжини світлової хвилі. Діапазон вимірювань ФЕК, КФК – 315–990 нм. Нині в практику лабораторій впроваджують напівавтоматичні та автоматичні біохімічні аналізатори (рис. 1.2, 1.3).



Рис. 1.2. Біохімічний напівавтоматичний аналізатор з мікрокуветою



Рис. 1.3. Автоматичний біохімічний аналізатор крові

Спектрофотометрія – вимірювання поглинання (пропускання) прозорих розчинів у широкому діапазоні хвиль від ультрафіолетового до інфрачервоного (210–1100 нм) і дослідження забарвлених та безбарвних розчинів у вузькій зоні спектра, у зоні максимального поглинання – монохроматичного потоку світла, що підвищує чутливість і точність кількісного визначення. Завдяки високій чутливості і вибірковості спектрофотометричні методи дають змогу визначати концентрацію низки речовин у сумішах без їх відділення, що значно спрощує аналіз. Як освітлювач у спектрофотометрах використовують дві лампи: лампа прожарювання – для вимірювання в зоні довжини хвиль від 320 до 1100 нм і дейтерієва (воднева) – для вимірювань в ультрафіолетовій зоні спектра (від 210 до 350 нм). Спектрофотометри мають два типи фотоелементів: сурм'яно-цезієвий (для вимірювань у зоні 210–650 нм) і киснево-цезієвий (600–1100 нм). Замість світлофільтрів у спектрофотометрах встановлено монохроматор – оптичну систему, яка виділяє з усього спектра джерела світла випромінювання в 1 нм, тобто вузького діапазону хвиль. Найбільш поширеними приладами цього класу є спектрофотометри СФ-46, СФ-2000, РV 1251С «Солар-Україна» та ін.

Рефрактометрія – це метод визначення концентрації речовини шляхом вимірювання в ній показника заломлення променя світла. За переходу променя світла з одного середовища в інше спостерігається відхилення його від початкового напрямку, тобто заломлення світла, що пов'язано з різницею швидкості поширення світла в різних середовищах. Показники заломлення твердих і рідких речовин встановлені відносно повітря. Залежить величина показника заломлення від характеру дослідного зразка, його концентрації, довжини хвилі нисхідного світла, температури і тиску. Показники заломлення й відповідні їм значення концентрації речовини наводяться для вимірювань за температури 20° С і тиску 760 мм рт. ст. У разі відхилення від цих умов вводяться відповідні поправки. Рефрактометрію виконують за допомогою приладів – рефрактометрів, найбільш поширеним серед яких є універсальний рефрактометр лабораторний (УРЛ). У ветеринарній медицині використовують для визначення вмісту білка в сироватці крові та вологи в меді.

Нефелометрія – метод вимірювання інтенсивності розсіяного (або поглинутого) суспензією світла. Базується на утворенні в результаті реакції малорозчинних сполук, які залишаються в розчині. Нефелометричні методи поступаються перед фотометричними тим, що розсіювання або поглинання дисперсної фази залежить не тільки від кількості частинок, а й від їх форми, розміру, характеру.

Похибки під час фотометрії зумовлені низькою якістю апаратури, поганим заземленням, електричною наводкою від близько розташованої потужнішої апаратури, недостатньо прогрітим приладом, не сфокусованим джерелом світла, неправильно встановленими темновим струмом (ноль) і

чутливістю, запиленням джерела світла та оптичної системи, брудними кюветами (з механічними пошкодженнями, відбитками пальців, нашаруваннями рідин), недостатнім об'ємом досліджуваної рідини в кюветах, неправильним положенням кювет у кюветотримачах, нерегулярним метрологічним контролем оптичних приладів тощо.

Атомна абсорбційна фотометрія – absorbcio – поглинання – метод аналізу, оснований на вимірюванні ступеня послаблення монохроматичного світлового потоку в результаті вибіркового поглинання світла розчиною речовиною (C-115M1, AAS-30, AA-6650 Shimadzu). Використовуються прилади для визначення макро- і мікроелементів, солей важких металів (рис. 1.4, 1.5).



Рис. 1.4. Атомно-абсорбційний спектрофотометр



Рис. 1.5 Рідинний хроматограф

Флюорометрія – це метод дослідження, оснований на ефекті флюоресценції, який виникає в результаті енергетичного збудження досліджуваного зразка під впливом жорсткого короткохвильового опромінення ультрафіолетовими променями.

Полуменева фотометрія – як енергетичний агент, що викликає стан збудження досліджуваного зразка, використовується полум'я газового пальника. Іони металів забарвлюють полум'я в різні кольори, залежно від характеру спектра пропускання світла. З цією метою використовують спеціальні світлофільтри, після чого проводять необхідні вимірювання. Використовують в основному для визначення концентрації іонів калію і натрію.

1.7. Автоматичні прилади відбору і дозування рідини

До цієї групи приладів належать автоматичні піпетки та дозатори. Автоматичні піпетки являють собою пристрій з пневматичним механізмом, дія якого основана на видаленні рідини повітрям і використовуються з метою забезпечення точного відбору і дозування рідин під час лабораторних досліджень. За особливостями будови всі автоматичні піпетки поділяються на: механічні; електронні; одноканальні; багатоканальні; фіксованого та перемінного об'ємів (рис. 1.6, 1.7).

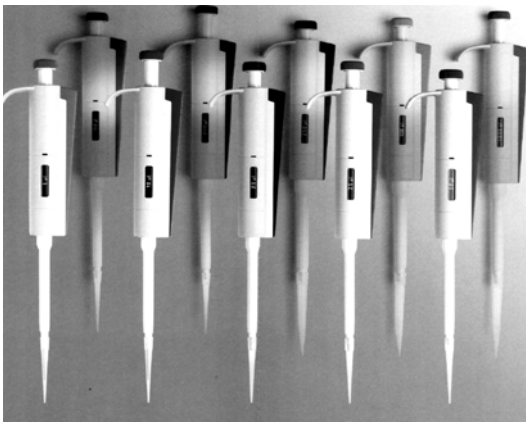


Рис. 1.6. Одноканальні дозатори перемінного об'єму

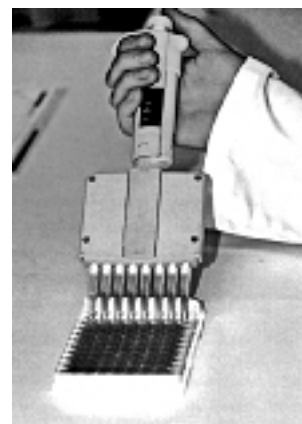


Рис. 1.7. Багатоканальний механічний дозатор

В основі конструкції механічних піпеток є пружинний механізм і мікрометричний гвинт (дозувальний пристрій). Необхідний для дослідження об'єм рідини відбирається в ручному режимі. В електронних піпетках пневматичний механізм приводиться в дію за допомогою вмонтованого мікроелектродвигуна, керування яким здійснюється мікрокомп'ютером з живленням від акумуляторів. У неробочому стані піпетка знаходиться в спеціальному тримачі, який одночасно є зарядним пристроєм для акумуляторів піпетки і підключається до електромережі.

Багатоканальні піпетки за продуктивністю значно переважають одноканальні, однак спектр їх застосування часто обмежується через коанфігурацію будови нижньої частини лише проведенням імунологічних, імуноферментних та ПЛР-досліджень і розраховані на роботу з плашками точно визначених розмірів.

Автоматичні піпетки *фіксованого* об'єму використовуються лише для вимірювання одного чітко визначеного об'єму рідини, а тому для проведення досліджень необхідно мати їх достатню кількість.

Автоматичні піпетки *перемінного* об'єму використовують для проведення вимірювань і дозувань рідин у широкому діапазоні. Так, наприклад, сучасні піпетки відомих фірм «Eppendorf» (Німеччина), «Labsystems» і «Biohit» (Фінляндія), «Колор» («Ленпіпет») та ін. забезпечують відбір і дозування будь-яких об'ємів рідин у межах від 5 до 5000 мкл.

Електронні піпетки – мають багато унікальних якостей (висока продуктивність і швидкість дозування, одно- й багаторазове дозування, змішування рідин, висока точність дозування та відтворюваність результатів тощо) і через це мають значні переваги перед механічними. Піпетка приводиться в дію лише легким натискуванням великим пальцем на кнопку «Пуск», що виключає ризик розвитку професійних захворювань, оскільки багаторазове натискування на поршень великим пальцем під час дозування і динамічне навантаження на ліктьовий суглоб можуть призвести до розвитку синдрому зап'ясткового каналу, що супроводжується дискомфортом, больовими відчуттями та порушенням функції руки.

Незважаючи на високу вартість, електронні піпетки перспективні щодо впровадження в клініко-діагностичні лабораторії. Серед виробників електронних піпеток найбільш відомими у світі є «Eppendorf» (Німеччина), «Labsystems» і «Biohit» (Фінляндія), «Bekman» (Швейцарія), «Abbot» (США) та ін.

Автоматичні дозатори, на відміну від піпеток, розраховані на дозування великих об'ємів рідини. Вони випускаються в двох варіантах: а) для ручного використання; б) стаціонарні.

Ручні автодозатори складаються з резервуару для рідини, в який реактив набирається і, за необхідності, дозується в потрібному об'ємі. Під час роботи дозатор слід тримати у вертикальному положенні.

У лабораторіях позитивно зарекомендував себе в роботі стаціонарний автоматичний дозатор типу А-2 виробництва Одеського заводу «Медлаборобладнання». Прилад складається з дозувальної шприцевої насадки та електродвигуна, що приводить її в дію, простий і зручний у роботі (рис. 1.8).

Ефективним у використанні є багатофункціональний стаціонарний дозуючий пристрій Edos «Eppendorf», в якому використовуються насадки «Combitip plus».

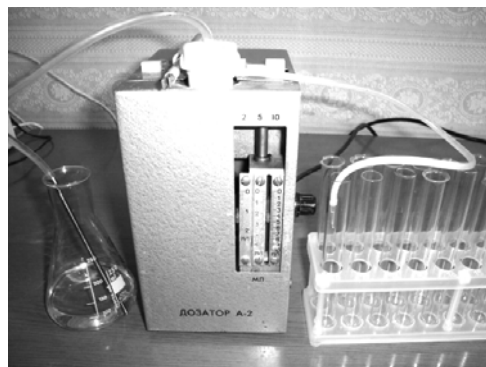


Рис. 1.8. Стаціонарний автоматичний дозатор типу А-2

Робота електронного дозатора (рис. 1.9) програмується за допомогою мікропроцесора з клавіатурою, а задані функціональні параметри фіксуються на рідиннокристалічному дисплеї.



Рис. 1.9. Електронний дозатор з мікропроцесорною клавіатурою



Рис. 1.10 Флакони-диспенсер «Eppendorf»

Перспективними у використанні можуть бути так звані «флакони-диспенсери» (проспенсер «Biohit» і варіоспенсер «Eppendorf») (рис. 1.10), розраховані на дозування рідини безпосередньо з флакона, на якому він кріпиться за допомогою спеціального пристрою – адаптера. Цей дозувальний пристрій має градуйовану шкалу для вибору об'єму рідини від 0,5 до 50 мл.

Література: [21, С. 8–139; 22, С. 11–150; 60, С. 5–42].

П р и м і т к а. Перша цифра означає номер джерела зі списку використаної літератури; ”С“ – сторінка. У невеликих за об'ємом джерелах сторінки не наведено.

РОЗДІЛ 2

ОБ'ЄКТИ ДОСЛІДЖЕНЬ КЛІНІЧНОЇ ЛАБОРАТОРНОЇ ДІАГНОСТИКИ

Об'єктами досліджень клінічної лабораторної діагностики є кров, сеча, молоко, органи і тканини, уміст рубця, шлунковий сік, слина, ліквор та інші біологічні субстрати організму тварин.

Кров є основним об'єктом досліджень. Для біохімічного дослідження у великої рогатої худоби, коней, овець, кіз та верблюдів кров беруть із яремної вени; у корів, окрім того – з молочної і хвостової; у свиней – із судин хвоста, краніальної порожнистої вени, орбітального венозного синуса; у м'ясоїдних (собак, котів) – із поверхневих вен кінцівок (підшкірної вени передпліччя, латеральної підшкірної вени гомілки – вени сафена); у хутрових звірів – із м'якушів пальців; у птахів – з підкрильцевої вени; у кролів – з яремної вени, судин хвоста, вуха, серця; у риб – із серця, підшкірної чи хвостової артерій. Відбір крові у птиці проводять у пластикові пробірки з підкрилової вени голкою без канюлі (Greiner, Австрія), просвіт якої попередньо зрошений 5% розчином гепарину (Москаленко В.П., Розумнюк А.В., Мельник А.Ю.).

У моногастричних тварин кров відбирають уранці натще, у жуйних – зранку через 4 год після годівлі. Час годівлі моногастричних тварин впливає на вміст у крові ліпідів, глюкози, холестеролу та деяких інших показників. Надмірне збудження тварини під час відбору крові зумовлює зміни рівня глюкози, кислотно-основної рівноваги, гормонів, тому слід уникати зайвого насилля над нею, а інколи слід застосовувати транквілізатори. Визначаючи стан обміну речовин під час диспансеризації, кров чи інші біологічні субстрати відбирають у тварин без ознак запального характеру (хірургічна інфекція, ендометрит, ретикулоперитоніт та ін.), тому що за таких умов змінюються біохімічні показники субстрату.

У ході клінічного лабораторного аналізу найчастіше досліджують сироватку і плазму крові. У стабілізованій крові визначають морфологічний склад, гематокритну величину, уміст гемоглобіну, глюкози, кетонових тіл, міді, цинку, кобальту, марганцю, селену, показники кислотно-лужного балансу та ін.; у плазмі крові – резервну лужність, уміст натрію, калію, можливо, неорганічного фосфору, у сироватці крові – загального білка та його фракцій, залишкового азоту, сечовини, ліпідів, білірубіну, кальцію, фосфору, магнію, загального й зв'язаного з білками йоду, заліза, міді, цинку, кобальту, селену, марганцю, каротину, вітамінів, ферментів, виконують білково-осадові проби і т.д. У дрібних тварин і

птиці замість сироватки можна використовувати плазму крові, враховуючи підбір антикоагулянта.

Зважаючи на характер дослідження, готують одну або дві пробірки. Для стабілізації крові чи одержання плазми у пробірки вносять один із антикоагулянтів із розрахунку на 10 мл крові: 3 краплі 1 розчину гепарину, 2–3 краплі гепарину, що містить 500 ОД в 1 мл; 0,3–0,5 мл 10% розчину натрію лимоннокислого (цитрату); 0,3–0,5 мл 20% розчину натрію чи калію щавлевокислого (оксалату); 3–4 краплі трилону Б (ЕДТА-натрію); 5–10 крапель 10% розчину натрію фториду. Вибір антикоагулянта залежить від мети дослідження. Наприклад, стабілізовану гепарином кров використовують для підрахунку формених елементів крові, дослідження кислотно-основного балансу, проте в одержаній плазмі не можна визначати активність ферментів і показники гемостазу. В останньому випадку використовують 3,8% розчин натрію цитрату або 1,34% натрію чи калію оксалату (1:9). Плазма, стабілізована оксалатами чи трилоном Б, непридатна для визначення кальцію. Основні вимоги до підбору матеріалу, вибору антикоагулянта, умов зберігання зразка крові та строку виконання аналізів викладено в табл. 2.1.

Таблиця 2.1

Матеріал для дослідження, антикоагулянт, умови зберігання зразка, строки проведення аналізу

Показник	Матеріал для дослідження, антикоагулянт	Умови зберігання, строки дослідження
1	2	3
Гематокрит	К, трилон-Б	Величина стабільна 48 год за температури зберігання 4° С або 6 год за 23° С
Гемоглобін	К, можливі трилон-Б, гепарин, цитрат, оксалат	Стабільний протягом 48 год за температури 4° С, 24 год – за 23° С
Глюкоза	К, ПК, натрію □н.□и. Осаджування білків відразу після взяття крові	Зберігання крові не більше 2 год. Для одержання плазми кров негайно центрифугують, білок осаджують, підготовлений матеріал зберігають за 4° С не більше 24 год
Кетонові тіла	К, гепарин. Приготування безбілкового фільтрату в день відбору крові	Зберігання безбілкового фільтрату в холодильнику до 3-х діб
Резервна лужність	ПК, СК, гепарин, ЕДТА-натрію та □н..	Зберігання в холодильнику до 3-х діб
Фосфор неорганічний	СК, ПК, гепарин та □н.. Швидко відділити сироватку чи плазму, не допускати гемолізу еритроцитів	Зберігати в холодильнику до двох діб. За тривалого зберігання вміст фосфору зростає

Закінчення табл. 2.1

1	2	3
Калій	СК без слідів гемолізу. ПК, гепарин та ін.	Зберігання в холодильнику до 5-ти діб
Кальцій	СК без слідів гемолізу	Зберігання в холодильнику до трьох діб
Залізо	СК без слідів гемолізу	Зберігання в холодильнику 3 доби
Загальний білок	СК без слідів гемолізу. ПК, гепарин та ін.	Зберігання в холодильнику до трьох діб
Білкові фракції	СК без слідів гемолізу	Зберігання в холодильнику до трьох діб
Білірубін	СК без слідів гемолізу	Зберігання в холодильнику до 3-х діб. Захищати від сонячного проміння
Холестерол (холестерин)	ПК, ЕДТА-натрію, гепарин, натрію цитрат. СК або ПК без слідів гемолізу	Проба стабільна за кімнатної температури до 5-ти діб
Ретинол, каротин	СК без слідів гемолізу	Захищати від сонячного світла. Заморожена проба стабільна упродовж двох тижнів
Вітамін С	ПК. Гепарин та ін. СК без слідів гемолізу	Проба стабільна протягом 3-х год за її охолодження
Вітамін Е	СК без слідів гемолізу	Плазму та сироватку крові стабілізують метафосфорною кислотою: 5 г/100 мл або ТХО: 10 г/100 мл. Зберігають за 20° С протягом однієї доби. Захищають від сонячного світла. Зберігають у холодильнику кілька днів за 4° С
Лактатдегідрогеназа	СК або ПК без слідів гемолізу. Гепарин	Не охолоджують, досліджують у день відбору крові
Аспартатаміно-трансфераза	СК або ПК без слідів гемолізу. Гепарин	Досліджують протягом 24 год після відбору крові. Можна зберігати 4–7 днів за 2–4° С
Аланінаміно-трансфераза	СК без слідів гемолізу. Гепарин	Досліджують протягом 24 год після взяття крові. Можна зберігати протягом 4-х днів за 4° С
Холінестераза	ПК, СК без слідів гемолізу. Гепарин, ЕДТА-натрію	Стабільна за кімнатної температури 6 год, за 4° С – один тиждень

П р и м і т к а. К – кров, ПК – плазма крові, СК – сироватка крові.

Сеча. Проби сечі беруть від тварин у ранковій годині під час природного сечовипускання або спонукання їх до цього масажем шкіри біля соромітних губ у самок, а також спеціальними методами (катетеризація, цистоскопія). У коней діурез стимулюють наступними прийомами: а) після перебування в загоні тварину завести у денник (особливо взимку);

б) після тривалого лежання примусити коня встати (після сну); в) у присутності коня занести у денник свіжу соломку. Для відбору сечі у жеребців і меринів використовують сечозбиральні мішки. У собак та кішок можливий цистоцентез. Аналіз сечі проводять безпосередньо на фермі або в лабораторії в день її взяття. Сечу збирають у чистий сухий посуд. Зберігають до тестування не більше 11–12 год у холодильнику. Як виняток, допускають застосування консервантів (кристалик тимолу на 100–150 мл сечі). Під час дослідження уробіліногену сечу захищають від сонячного світла, аналіз доцільно виконувати протягом 30 хв після відбору зразка сечі (див. розділи 15; 17).

Молоко. З діагностичною метою молоко досліджують рідко. Як правило, його досліджують для діагностики кетозу в корів та вівцематок. Зразки молока саме для цієї мети беруть із здорових чвертей вимені. Зазвичай проводять якісні реакції безпосередньо на фермі. У молоці можна визначити вміст загального білка, кальцію, фосфору, магнію, мікроелементів, вітамінів А, Е та ін. Досліджують молоко ранкового надою. Велике значення має біологічне оцінювання якості молозива, особливо визначення в ньому вмісту імунних глобулінів (IgG, IgM, IgE, IgA), від чого залежить стан здоров'я новонароджених тварин. Зразки молозива відбирають із здорових чвертей вимені з обов'язковим позначенням порядкового номера надою, оскільки склад молозива дуже швидко змінюється: молозиво першого надою за своїм складом відрізняється від молозива другого та наступних надоїв. Підготовка зразків молока і молозива залежить від характеру дослідження.

Вміст рубця. Вміст рубця беруть через 3–4 год після годівлі за допомогою зонда, не допускаючи попадання в нього слини, і відразу фільтрують через 4 шари марлі. Склянку із вмістом закривають, ставлять у холодильник і відразу ж досліджують. Якщо проби відбирають у господарстві, то їх консервують хлороформом або толуолом з розрахунку 6–8 крапель на 20 мл вмісту. Транспортиують проби у термосі з льодом. Якщо у пробах планується підрахунок кількості найпростіших, то як консервант використовують 10% розчин формаліну з розрахунку 5–6 крапель на 20 мл вмісту. Від формаліну найпростіші втрачають рухомість, припиняється як їх розвиток та розмноження, так і лізис (див. розділ 19.1).

Шлунковий вміст і сік. Проби шлункового вмісту та шлункового соку беруть за допомогою спеціальних шлункових зондів після попередньої підготовки тварини в режимі голодної дієти. Методику підготовки тварин, взяття шлункового вмісту та шлункового соку викладено у підручнику “Клінічна діагностика внутрішніх хвороб тварин” (Біла Церква, 2004. – 608 с.).

Найбільше діагностичне значення має дослідження шлункового соку, оскільки в ньому немає залишків кормових мас. Інформативними є

такі показники: рН, загальна кислотність, вільна та зв'язана соляна кислота, пептидна активність соку, лейкоцити.

Ліквор (спинномозкова рідина) секретується судинними сплетіннями центральної нервової системи і циркулює у спеціальних резервуарах чи цистернах у ділянці основи мозку, омиваючи звивини головного мозку, випуклу його поверхню, центральний канал і підпаутинний простір спинного мозку. Утворюється ліквор у бокових шлуночках мозку та субарахноїдальних проміжках. Вода й електроліти швидко проникають у церебральну рідину і так само швидко виходять з неї.

Ліквор виконує функцію "подушки" для мозку, запобігаючи його зміщенню. Метаболічна роль ліквору досі не вивчена. Тому дослідження його виконують здебільшого з метою діагностики запальних процесів у центральній нервовій системі.

Одержують ліквор шляхом люмбальної, субокципітальної і постокципітальної пункцій, які виконують спеціальними голками з мандреном: у великих тварин – довжиною 80–150 і діаметром 1,2–1,8 мм. Для лабораторних досліджень ліквор беруть фракціями у 3–4 пробірки загальною кількістю 5–15 мл. Для підрахунку клітин достатньо 0,5 мл. До ліквору, який містить фібриноген, що буває за менінгітів, додають антикоагулянт.

Відносна густина ліквору здорових тварин – 1,004–1,008 кг/л, вміст глюкози – 2,2–3,5 ммоль/л, загального білка – 0,15–0,30 г/л, лейкоцитів – від 0 до 8×10^6 /л (0–8 в 1 мкл). Лейкограма ліквору в основному представлена лімфоцитами (60–80%) і моноцитами (20–40%).

Спинномозкова рідина світла і прозора. Її помутніння вказує на наявність гнійного менінгіту. Виявлення в 1 мкл більш ніж 500 еритроцитів свідчить про наявність крові в лікворі. Зниження вмісту глюкози в лікворі спостерігають за менінгоенцефаліту, пухлин, післяпологової гіпокальціємії. Підвищення концентрації глюкози в лікворі виявляють у разі стресу, цукрового діабету, лістеріозу, травм. Дослідження кількості білка у лікворі має важливе діагностичне значення за патології мозку. Підвищення його вмісту (*гіперпротеїнарація*), в основному за рахунок високодисперсних фракцій, буває у разі пухлин, лістеріозу, менінгіту, менінгоенцефаліту.

Підвищення кількості лейкоцитів (*плеоцитоз*) вказує на ураження патологічним процесом мозкових оболонок чи розвиток у них запальних явищ. Особливо різкий плеоцитоз виявляють за менінгіту. За серозного менінгіту в 1 мкл ліквору міститься від декількох десятків до сотень клітин (за норми 3–8 клітин), в основному лімфоцитів. У разі гнійного менінгіту в гострій стадії захворювання кількість клітин досягає кількох тисяч і навіть десятків тисяч у 1 мкл ліквору, причому серед клітин переважають нейтрофіли.

Кістково-мозковий пунктат. Одержують із 2–3-го сегментів грудної кістки за допомогою спеціальних голок (ГС–2 та ін.) з мандреном. Дослідження виконують для діагностики гемобластозів. У пунктаті визначають кількість еритроцитів, оксифільних нормоцитів, поліморфноядерних нормоцитів (ядерновмісних клітин). У фарбованих мазках підраховують мієлограму. Аналізуючи мієлограму, визначають кількісне співвідношення між клітинами різного ступеня зрілості еритро- та лейкоцитопоезу.

Біопсійний пунктат печінки. Біопсію печінки виконують для гістологічних, гістохімічних та ультрамікроскопічних досліджень. Біоптат отримують за допомогою спеціальних голок з мандренами американського (*Tru-cut-Biopsienadel*) і японського (*Menghini Aspiration biopsy, Set*) виробництва та голок, які сконструювали В.В. Влізло і М.В. Утеченко, діаметром 2,3–4,0 мм завдовжки 125–200 мм, або троакарами конструкції С.Нікова, Б.В.Уша та інших дослідників. Біоптат фіксують і обробляють різними методами, залежно від мети досліджень. Гістологічні дослідження проводять для диференційної діагностики хвороб печінки, переважно – характеру дистрофії: гістохімічні та електронномікроскопічні – для функціональної та структурної оцінки гепатоцитів і їх органел.

Досліджуючи зразки біологічних субстратів (крові, сечі та ін.), враховують вік, породу, фізіологічний стан тварини. Наприклад, уміст імунних глобулінів сироватки крові телят проводять через 24–48 год після народження, тобто, коли в їх організм надходять колостральні імунні білки з молозива. Потім дослідження цих показників (за необхідності) виконують у віці трьох тижнів та трьох місяців.

Вік тварин враховують у процесі дослідження в крові загального білка та його фракцій, глюкози, фосфору, холестеролу, класів ліпідів та деяких інших показників, що мають суттєві відмінності у молодих і дорослих особин.

Література: [12, С. 8–13; 24; 25; 26; 60, С. 43–47].

РОЗДІЛ 3

МІЖНАРОДНА СИСТЕМА ОДИНИЦЬ ВИМІРЮВАННЯ

У ході вивчення явищ і предметів навколишньої природи часто доводиться вимірювати ті або інші фізичні величини, які характеризують їх. Значення і роль вимірювань у науці досить чітко сформулював Д.І. Менделєєв: *“Наука починається тоді, коли починають вимірювати”*. Суттєвим для вимірювання фізичних величин є вибір їх одиниць. У зв’язку з тенденцією до збільшення кількості одиниць виникла необхідність їх уніфікації. Тому в 1960 р. у Парижі була прийнята міжнародна система одиниць, універсальна для всіх галузей науки і техніки. Ця система одержала скорочену міжнародну назву – SI, або в українській транскрипції – СІ.

СІ включає одиниці трьох типів: а) основні; б) похідні; в) додаткові, а також деякі префікси, за допомогою яких можуть бути утворені десяткові кратні й часткові одиниці.

За основу в СІ було вибрано 7 основних одиниць (табл. 3.1).

Перемножуючи основну одиницю на саму себе або поєднуючи дві і більше основних одиниць шляхом простого множення чи ділення, можна сформувати велику кількість одиниць, які відомі як похідні одиниць SI. Наприклад, похідною одиницею об’єму є кубічний метр, молярної концентрації – моль на кубічний метр (табл. 3.2).

Деяким похідним одиницям SI присвоєні спеціальні назви, більша частина яких – це імена учених, які зробили значний вклад 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).

Таблиця 3.1

Основні одиниці SI

№ з/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

Таблиця 3.2

Деякі похідні одиниці SI

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

Крім одиниць SI, у колишньому СРСР був прийнятий стандарт СТСЭВ 1052–78, який дає можливість використовувати деякі одиниці нарівні з одиницями SI, що досить важливі для лабораторних вимірювань. Зокрема, важливою є така одиниця об'єму, як літр (л). ВООЗ рекомендує позначати концентрацію за кількістю речовини не у метрі кубічному, а в літрі. Для вимірювання венозного і артеріального кров'яного тиску до цього часу використовують позасистемні одиниці: міліметр водяного стовпчика (мм вод. ст. = 9,8 Па) і міліметр ртутного стовпчика (мм рт. ст. = 133,3 Па).

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 деякі префікси, за допомогою яких можна утворити десяткові кратні або часткові одиниці SI (табл. 3.3).

Таблиця 3.3

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

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) тощо.

У лабораторній практиці концентрацію різних речовин раніше виражали в мікрограмах, міліграмах або грам-відсотках. 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/м³. 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) тощо. 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/м³). ВООЗ допускає використання в чисельнику часткових основної одиниці маси (грам, міліграм, мікрограм і т.д.), а в знаменнику замість м³ 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/м³, 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). У перерахунку на 1 л субстрату ця величина виражається таким чином:

$$\text{Од/л} = \text{мкмоль}/(\text{хв} \times \text{л}) \text{ (табл. 3.4).}$$

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); мккат/л = мкмоль/(с·л); нкат/л = нмоль/(с·л). Співвідношення міжнародної одиниці (Од) і каталу є таким: 1 Од = 16,67 нкат. Найчастіше слід

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 становитиме: $1,9 \times 60 = 114$ Од/л.

Таблиця 3.4

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
ммоль/год×л	од/л	0,06

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:

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

$$1 \text{ ммоль}/(год \times л) = Од/л : 16,67 \text{ або } 1 \text{ ммоль}/(год \times л) = Од/л \times 0,06.$$

Для визначення активності α -амілази застосовують такий вираз: г/год×л.

Результати морфологічного дослідження крові в SI виражають в об'ємі 1 м³, але ВООЗ дозволяє в об'ємі 1 л. Тоді, наприклад, кількість еритроцитів 5 млн/мкл у SI матиме наступний вираз: $5 \times 10^{15}/м^3$ ($5 \times 10^{15} \cdot м^{-3}$). Проте поруч з цим дозволяється наступний запис: $5 \times 10^{12}/л$ ($5 \times 10^{12} \cdot л^{-1}$). Можна використовувати префікс – тера (Т): $1 \times Т = 10^{12}$, тоді кількість еритроцитів виражатиметься так: $5 \times Т/л$. Кількість лейкоцитів 5 тис./мкл можна записати в SI як: $5 \times 10^{12}/м^3$, або $5 \times 10^9/л$, або $5 \times Г/л$ (Г – гіга; $Г = 10^9$).

Література: [12, С. 13–16; 30; 60, С. 499–506].

РОЗДІЛ 4

ЗАГАЛЬНИЙ КЛІНІЧНИЙ АНАЛІЗ КРОВІ

Загальний клінічний аналіз крові включає: визначення вмісту гемоглобіну, підрахунок кількості еритроцитів, лейкоцитів, тромбоцитів, виведення лейкограми, визначення величини гематокриту, осмотичної і кислотної резистентності еритроцитів, швидкості осідання еритроцитів (ШОЕ) і згортання крові, ретракції кров'яного згустку. На підставі визначення вмісту гемоглобіну, кількості еритроцитів та величини гематокриту розраховують показники, які характеризують стан гемопоезу: вміст гемоглобіну в одному еритроциті (ВГЕ, МСН), колірний показник (КП) та середній об'єм еритроцитів (*MCV*).

4.1. Визначення вмісту гемоглобіну

Запропоновано кілька методів визначення гемоглобіну: колориметричний (метод Салі); ціанідний, фотометричний, газометричний (гемоглобін насичується киснем або вуглекислою і за їх кількістю визначають вміст гемоглобіну); за вмістом заліза в гемоглобіні, за допомогою діагностичних паперових смужок, поміщених на пластикові підставки у фотометри фірми "Еймс" США. Як уніфікований рекомендується геміглобінціанідний метод за Л.М. Піменовою та Г.В. Дервізом.

Визначення кількості гемоглобіну в крові методом Салі

Принцип методу. Гемоглобін крові в розчині хлоридної кислоти перетворюється в гематину хлорид, який порівнюється з гематином визначеної концентрації, взятої як стандарт.

Обладнання, посуд: гемометр Салі, очні піпетки, скляні палички.

Реактиви: 0,1 н розчин хлоридної (соляної) кислоти.

Хід визначення: у середню пробірку до позначки 2 очною піпеткою наливають 0,1 н розчин НСІ. Капіляром набирають 20 мкл (0,02 мл) крові, витирають кінчик капіляра ватою і кров обережно видують на дно пробірки, а верхнім шаром кислоти промивають капіляр. Обережно перемішують і залишають на 5 хв (кров птиці на 15 хв).

Внаслідок гемолізу еритроцитів з гемоглобіну утворюється солянокислий гематин коричневого кольору. У пробірку добавляють краплями дистильовану воду, перемішуючи вміст пробірки скляною

паличкою до тих пір, поки колір у ній не порівняється з кольором стандартів. Кількість гемоглобіну у грамах на 100 мл визначають по нижньому меніску рідини. У міжнародній системі (SI) кількість гемоглобіну визначають у грамах на 1 л крові, тому одержаний результат необхідно помножити на 10. Нині метод Салі не використовується у науково-дослідній роботі.

Визначення вмісту гемоглобіну (геміглобінціанідним методом)

Принцип методу. Гемоглобін під час взаємодії з калієм залізоціаністим (червона кров'яна сіль) окиснюється у метгемоглобін (геміглобін), що утворює з ацетонціангідрином кольоровий геміглобінціанід, інтенсивність забарвлення якого пропорційна концентрації гемоглобіну.

Обладнання: фотоелектроколориметр; піпетки мірні на 0,02 мл і 5 мл; пробірки; колби мірні на 250 мл та 1 л.

Реактиви: 1) реагент 1 – 5% розчин NaHCO_3 , хч – 100 мл; 2) реагент 2 – 1% розчин калію заліzosинеродистого, що містить 2,5% розчин ацетонціангідрину, чда – 100 мл; 3) стандартний розчин гемоглобіну.

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

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

Хід визначення. До 5 мл робочого розчину у пробірку добавляють 0,02 мл крові і перемішують (розведення у 251 разів). Аналогічно готують стандартну пробу. Через 10 хв знімають показники на фотоелектроколориметрі за довжини хвилі 540 нм (зелений світлофільтр) у кюветі з товщиною робочого шару 1 см проти контрольної проби (робочий розчин). Записують показники оптичної щільності розчинів і за формулою чи калібрувальним графіком визначають вміст гемоглобіну у крові (г/100 мл або г/л). Стандартний розчин вимірюють за тих же умов, що й дослідні проби.

Розрахунок вмісту гемоглобіну (г/100 мл) проводять за формулою:

$$Hb = (E_{\text{досл.}} : E_{\text{ст.}}) \times 59,75 \times 251 \times 0,001,$$

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

Для побудови калібрувального графіка готують кілька розведень з різним умістом гемоглобіну (табл. 4.1).

Таблиця 4.1

Розведення гемоглобіну для побудови калібрувального графіка

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

П р и м і т к а. Вимірювання проводять проти контрольного розчину.

Збільшення вмісту гемоглобіну в крові тварин (*плейохромія, гіперхромемія*) спостерігається у разі згущення крові (діарея, утворення ексудатів, трансудатів), серцево-легеневої недостатності, еритремії, еритремії і поєднується, як правило, зі збільшенням кількості еритроцитів (табл. 4.2).

Таблиця 4.2

Вміст гемоглобіну у крові тварин

Вид тварин	г/100 мл крові	г/л крові
Велика рогата худоба	9,5 – 12,5	95 – 125
Вівці	9,0 – 13,5	90 – 135
Кози	10,0 – 15,0	100 – 150
Коні	9,0 – 14,0	90 – 140
Свині	9,0 – 11,0	90 – 110
Собаки	14,5 – 22,0	145 – 220
Коти	9,0 – 15,5	90 – 155
Кури	8,0 – 12,0	80 – 120
Качки	10,0 – 12,5	100 – 125
Гуси	9,0 – 13,5	90 – 135
Індики	7,0 – 11,0	70 – 110
Кролі	10,5 – 12,5	105 – 125
Норки	15,0 – 17,5	150 – 175
Песці	12,0 – 17,0	120 – 170
Соболі	13,0 – 16,0	130 – 160
Лисиці сріблясто-чорні	12,0 – 16,0	120 – 160

Зменшення вмісту гемоглобіну (*олігохромемія*) спостерігається за анемії різного походження, причиною яких є дефіцит міді, кобальту, заліза, вітамінів В₂, В₁₂, В_с, С, кровотечі, посилений гемоліз еритроцитів, піроплазмідози, лептоспіроз, інфекційна анемія коней, пригнічення функції кісткового мозку різними токсинами.

4.2. Підрахунок кількості еритроцитів

Підрахунок еритроцитів проводять за допомогою мікроскопа в лічильних камерах або із застосуванням різних електронних лічильників.

Камера – товсте предметне скло, розділене неглибокими борознами на три пластини: дві бокові і середня, яка розміщена нижче бокових на 0,1 мм, поділена на 2 половини, на кожній з яких нанесено сітку (рис. 4.1). Нині використовують лічильні камери із сіткою Горяєва, яка складається з 225 великих квадратів, із яких 25 поділені на 16 маленьких квадратиків, 100 – на прямокутники і 100 квадратів залишаються чистими.

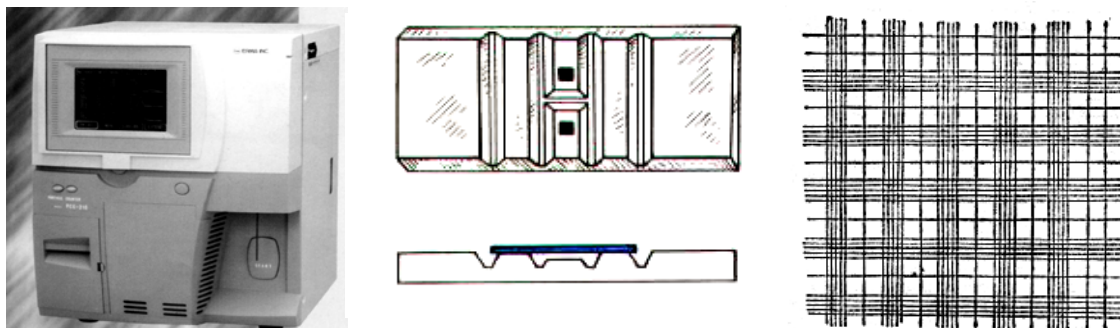


Рис. 4.1. Схема камери і сітки Горяєва

Меланжерний метод підрахунку еритроцитів

Принцип методу: Точну кількість крові змішують у меланжері з визначеною кількістю рідини і вносять у камеру відомого об'єму.

Обладнання: еритроцитарні меланжери, лічильні камери з сіткою Горяєва, мікроскопи. Меланжер – це капілярна трубочка, довжиною 10 см, з грушоподібним розширенням (ампулою), всередині якого є скляна кулька для змішування крові і рідини. На капілярній частині меланжера нанесені мітки 0,5 і 1, а відразу за розширенням – 101, що показують співвідношення між об'ємами капіляра і ампули. Після підрахунку формених елементів меланжери промивають водою, а потім етиловим спиртом і ефіром, висушують у термостаті. У добре просушеному меланжері скляна кулька не прилипає до стінок ампули.

Реактиви: 3% розчин натрію хлориду.

Хід виконання. Набирають кров у меланжер до мітки 0,5 або 1 (розведення відповідно у 200 або 100 разів). Кінчик меланжера витирають ватою. Для правильного наповнення меланжер тримають спочатку під кутом, а потім переводять у вертикальне положення. 3% розчин натрію хлориду набирають до позначки 101 обережно, щоб в ампулу не потрапило повітря. Знімають гумову трубочку, меланжер закривають з обох кінців

пальцями і струшують. Отримують розведення крові у 200 разів (якщо кров набрали до позначки 0,5). На бокові пластини лічильної камери кладуть покривне скло і, притискаючи його великими пальцями рук, рухами вперед – назад притирають так, щоб були помітні райдужні кільця. Між ним і середньою пластинною камери утворюється щілина висотою 0,1 мм. Із меланжера видаляють на вату перші 2–3 краплі розведеної крові, а наступною краплею торкаються збоку до покривного скла і середньої пластинки камери. Внаслідок сили капілярності рідина заповнює камеру. Зайву рідину видаляють ватою. Якщо у лічильну камеру потрапило повітря, то покривне скло необхідно зняти, камеру витерти насухо і всю роботу повторити.

Підрахунок еритроцитів проводять через 1–2 хв після заповнення камери за малого збільшення (ок. 10 або 15; об. 8) у дещо затемненому полі зору мікроскопа. Клітини підраховують у п'яти великих квадратах, розміщених уздовж діагоналі сітки, кожний з яких розділений на 16 маленьких квадратів. Клітини у великому квадраті починають рахувати з лівого верхнього маленького квадратика, а потім переходять уздовж горизонталі на другий, третій і четвертий. Після верхнього ряду рахують еритроцити у нижче розміщеному ряду, починаючи з першого правого квадрата тощо. Рахують еритроцити, що знаходяться всередині маленьких квадратів, а також на лівому і верхньому боках великого квадрата, а еритроцити на нижньому і правому боках не враховують (рис. 4.2).

Якщо камера заповнена правильно, то еритроцити рівномірно розподілені по всій сітці.

Кількість еритроцитів (X) в 1 мкл крові визначають за формулою:

$$X = \frac{a \times c}{n \times s \times h},$$

де: a – кількість еритроцитів, підрахованих у п'яти великих квадратах; c – розбавлення крові (у 200 або 100 разів); n – кількість квадратів, у яких рахували еритроцити; s – площа великого квадрата ($1/25 \text{ мм}^2$); h – висота камери (0,1 мм). Скорочена формула має вигляд $X = a \cdot 10\,000$ (за розведення крові у 200 разів). За міжнародною системою одиниць (SI) кількість еритроцитів виражають у таких одиницях: $a \times 10^{15} \times \text{м}^{-3}$ або $a \times 10^{12} / \text{л}$. Їх можна замінити префіксом тера (Т). Наприклад, раніше писали $5,0 \times 10^6$ в 1 мкл; нині – $5,0 \times 10^{12}$ в 1 л, або 5,0 Т/л.

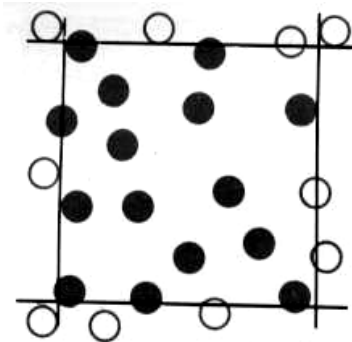


Рис. 4.2 Правила підрахунку клітин у квадратах сітки Горєва

Підрахунок еритроцитів пробірковим методом

Посуд, обладнання: скляні піпетки об'ємом 5 мл або автоматичні дозатори; капілярні піпетки об'ємом 0,02 мл; пробірки Флоринського з пробками (короткі) або флакони з-під антибіотиків.

Реактиви: 3% розчин натрію хлориду.

Хід виконання. Відмірюють у флакон або пробірку 3,98 мл (за методом П'ятницького) або 4 мл 3% розчину натрію хлориду. Капілярною піпеткою набирають 0,02 мл крові і вносять у розчин натрію хлориду. Флакони закривають пробками і суміш перемішують. Одержують розведення 1:200 (за методом П'ятницького). Заряджають лічильну камеру і ведуть підрахунок клітин так само, як і за розведення крові меланжерним методом. Під час розрахунку враховують ступінь розведення крові. Якщо підрахунок виконують у нестабілізованій крові, капіляр на 0,02 мл потрібно промити антикоагулянтом.

Діагностичне значення. Кількість еритроцитів залежить від виду (див. табл. 4.3) і віку тварин (у новонароджених їх дещо більше), м'язового напруження, особливо у коней, продуктивності та породи, рівня годівлі.

Серед змін еритроцитів найчастіше спостерігають зменшення їх кількості нижче мінімальних фізіологічних показників (*еритроцитопенія, олигоцитемія*), що зустрічається за анемії, зумовлених порушенням кровотворення внаслідок недостатньої годівлі (нестача протеїну, вітамінів В₂, В₁₂, В_с, С, мікроелементів кобальту, заліза, міді, марганцю), пригніченням функції кісткового мозку у разі інтоксикацій, отруєння гемолітичними отрутами, піроплазмідозів, структурних змін кісткового мозку за променевої хвороби та лейкозу, крововтрат. Відповідно до причини анемії поділяються на *гіпопластичні* (аліментарно-дефіцитна і мієлотоксична), *гемолітичні* (спричинені надмірним руйнуванням еритроцитів) та *постгеморагічні* (внаслідок крововтрат). Від істинної анемії слід відрізняти гідремію, яка зумовлена збільшенням об'єму плазми за рахунок припливу тканинної рідини.

Збільшення кількості еритроцитів (*еритроцитоз, поліцитемія*) буває фізіологічним (у гірській місцевості, новонароджених) і патологічним.

Патологічна поліцитемія за походженням буває відносною та абсолютною. Відносний еритроцитоз спостерігається за втрати організмом води і згущення крові внаслідок різних хвороб, які супроводжуються діареєю, блюванням, за розвитку трансудатів та ексудатів.

Абсолютний патологічний еритроцитоз спостерігається: а) за посилення еритропоетичної функції кісткового мозку в результаті хвороб серця, рідше – легень; б) за деяких пухлин – нирок, кіркового шару надниркових залоз, аденоми гіпофіза; в) за гіпоксії нирок.

Від патологічного еритроцитозу в людей необхідно відрізнити *еритремію*, в основі якої лежить пухлинно-проліферативний процес у кістковому мозку всіх трьох ростків кровотворення – червоного, гранулоцитарного і мегакаріоцитарного, однак домінуючим є червоний. У крові збільшується кількість тромбоцитів, дозріваючих еритроцитів, вміст гемоглобіну і гематокритна величина. ШОЕ сповільнена, в'язкість крові значно підвищена, швидкість течії крові зменшується.

4.3. Визначення індексів “червоної крові”

Визначення у крові вмісту гемоглобіну та кількості еритроцитів не завжди дає змогу виявити характер анемії і, відповідно, її причини. Для цього додатково потрібно визначити співвідношення між кількістю еритроцитів і гемоглобіном, тобто вирахувати так звані індекси “червоної крові” – колірний показник (КП) і середній вміст гемоглобіну (ВГЕ, МСН*) в одному еритроциті.

Колірний показник свідчить про насиченість еритроцитів (Er_2) гемоглобіном (Hb_2) у хворої тварини порівняно з аналогічним середнім показником у здорових тварин цього ж виду. Визначають його за формулою:

$$КП = \frac{Hb_2}{Er_2} \cdot \frac{Hb_1}{Er_1} = \frac{Hb_2 \cdot Er_1}{Er_2 \cdot Hb_1},$$

де: Hb_2 і Er_2 – кількість гемоглобіну і еритроцитів у дослідної тварини; Hb_1 і Er_1 – середній вміст гемоглобіну та еритроцитів у здорових тварин.

Колірний показник – величина відносна. Він коливається у таких межах: у великої рогатої худоби і свиней від 0,85 до 1,15, коней і собак – 0,8–1,2, овець – 0,5–0,7, кролів – 0,8–1,0, курей – 2,0–3,0.

Середній вміст гемоглобіну в одному еритроциті (ВГЕ; за міжнародною номенклатурою – МСН) визначають діленням вмісту гемоглобіну в 1 л крові на кількість еритроцитів у тому ж об'ємі. ВГЕ (МСН) вираховують у пікограмах (пг; 1 г = 10^{12} пг). Наприклад, вміст гемоглобіну становить 100 г/л, кількість еритроцитів – $5 \cdot 10^6$ в 1 мкл або $5 \cdot 10^{12}$ в 1 л. Отже:

$$МСН (ВГЕ) = 100 \cdot 10^{12} : 5 \cdot 10^{12} = 20 \text{ пг.}$$

* МСН – mean corpuscular hemoglobin

ВГЕ дорівнює (пг): у великої рогатої худоби – 15–20; овець – 10–13; свиней – 16–19; коней – 17–20; собак – 21,5–33; кролів – 21–23; курей – 36–40.

Діагностичне значення. Збільшення ВГЕ і колірного показника називають *гіперхромією*. Вона залежить виключно від збільшення об'єму еритроцитів, а не від підвищеного насичення їх гемоглобіном, тому що максимальна концентрація гемоглобіну в еритроциті становить 0,33 пг в 1 мкм³ об'єму еритроцита. Отже, гіперхромія завжди поєднується з макроцитозом. Зустрічається вона за хронічних гемолітичних, мієлотоксичних анемій, нестачі кобальту і вітаміну В₁₂. Особливо характерна для перніціозної анемії, за якої у крові виявляють “гігантські еритроцити” – мегалоцити.

Зменшення ВГЕ і колірного показника (*гіпохромія*) спостерігається за нестачі в раціоні міді, заліза, протеїну (аліментарно-дефіцитна анемія), рідше – внаслідок зменшення об'єму еритроцитів та порушення засвоєння заліза еритробластинами (залізорефрактерності).

Для здорових тварин характерна *нормохромія*, проте вона може діагностуватися за деяких анемій (гіпопластичної, гострого перебігу постгеморагічної і гемолітичної).

4.4. Підрахунок кількості лейкоцитів

Існує кілька методів підрахунку кількості лейкоцитів: меланжерний, пробірковий та електронно-автоматичний.

Підрахунок кількості лейкоцитів меланжерним методом

Обладнання: лейкоцитарні меланжери, камера з сіткою Горяєва, мікроскоп.

Реактиви: рідина Тюрка (3%-ний розчин оцтової кислоти, забарвлений 1% розчином метиленового синього).

Хід виконання. У меланжер набирають до мітки 0,5 або 1 кров, а потім до мітки 11 – рідину Тюрка. Одержують розведення відповідно у 20 або 10 разів. Готують лічильну камеру, дотримуючись тих же правил, що й за підрахунку еритроцитів.

Підрахунок лейкоцитів проводять у 100 великих чистих квадратах сітки Горяєва за малого збільшення мікроскопа (ок. 15, об. 8) у притемненому полі зору (опускають конденсор або звужують діафрагму). Кількість лейкоцитів у одному мікролітрі крові (*X*) визначають за формулою:

$$X = \frac{a \times c}{n \times s \times h},$$

де: a – кількість підрахованих лейкоцитів; c – розбавлення крові (у 10 або 20 разів); n – кількість квадратів (100); s – площа великого квадрата ($1/25 \text{ мм}^2$); h – висота камери (0,1 мм).

Кількість лейкоцитів у крові залежить від виду тварин (табл. 4.3) та їх віку. За міжнародною системою одиниць їх кількість виражають у таких одиницях: $a \times 10^{12}$ в 1 м^3 , або $a \times 10^9$ в 1 л. Їх можна замінити префіксом гіга (Г). Наприклад, раніше писали $5,0 \times 10^3$ в 1 мкл крові, нині $5,0 \times 10^9$ в 1 л, або 5,0 Г/л.

Таблиця 4.3

Кількість еритроцитів, лейкоцитів і тромбоцитів у крові тварин

Вид тварини	Еритроцити, млн/мкл; Т/л	Лейкоцити, тис/мкл; Г/л	Тромбоцити, тис/мкл; Г/л
Велика рогата худоба	5,0–7,5	6,0–10,0	260–700
Вівця	7,0–12,0	6,0–14,0	270–500
Коза	12,0–18,0	8,0–17,0	300–900
Кінь	6,0–9,0	7,0–12,0	200–500
Осел	5,0–7,0	7,0–9,0	200–500
Свиня	6,0–7,5	8,0–16,0	180–300
Собака	5,0–8,0	6,0–16,0	200–550
Кішка	6,0–10,0	6,0–18,0	200–600
Кріль	4,5–7,5	6,5–9,5	80–160
Норка	8,0–9,5	4,5–7,0	–
Лисиця	8,0–10,0	4,2–7,0	–
Песець	7,5–9,0	4,5–7,0	–

Підрахунок лейкоцитів за методом П'ятницького

Обладнання: скляні піпетки П'ятницького на 0,38 мл, капіляри об'ємом 0,02 мл, лічильна камера із сіткою Горяєва, мікроскоп, пробірки Флоринського або флакони з-під антибіотиків.

Реактиви: рідина Тюрка.

Хід роботи. У пробірки Флоринського або флакони піпеткою вносять 0,38 мл розчину Тюрка, додають 0,02 мл крові. Отримують розведення у 20 разів. Перемішують і заправляють лічильну камеру. Підрахунок лейкоцитів ведуть так само, як і за використання меланжерного методу. Кількість лейкоцитів вираховують за такою ж

формулою. Якщо піпеток П'ятницького об'ємом 0,38 мл немає, то 0,4 мл розчину Тюрка набирають звичайною піпеткою.

Діагностичне значення. Кількість лейкоцитів залежить від виду тварин, віку та фізіологічного стану. Збільшення кількості лейкоцитів у крові називають *лейкоцитозом*. Лейкоцитоз буває *фізіологічним, медикаментозним, реактивним і патологічним*.

До *фізіологічних лейкоцитозів* відносять: *травний* – спостерігається через 2–3 год після приймання корму; *міогенний* – кількість лейкоцитів збільшується під час м'язового навантаження; лейкоцитози *вагітних і новонароджених*.

Медикаментозний лейкоцитоз виникає після парентерального введення білкових препаратів (протеїноterapia), вакцин, сироваток, кортикостероїдів.

Реактивний лейкоцитоз є супутником більшості інфекційних хвороб, деяких неінфекційних (пневмонія, перикардит, плеврит, перитоніт, ендометрит, мастит, гастроентерит та ін.). Вираженість лейкоцитозу залежить від характеру хвороби та реактивності організму. Зміни лейкоцитів мають захисний характер, оскільки в кров надходять зрілі клітини, здатні виконувати захисні функції. Реактивний лейкоцитоз буває *абсолютним*, коли збільшується загальна кількість лейкоцитів, і *відносним*, який характеризується збільшенням кількості лейкоцитів одного виду за рахунок інших.

За *патологічного лейкоцитозу*, на відміну від фізіологічного, у крові з'являються лейкоцити зі зміненою структурою, морфологічно і функціонально незрілі, що є показником органічних змін органів кровотворення (пухлини, лейкоз). Окрім того, зміни у разі реактивного лейкоцитозу тимчасові і з поліпшенням стану здоров'я тварин склад крові нормалізується, а за лейкозу зміни крові стійкі; реактивний лейкоцитоз супроводжується помірним збільшенням кількості лейкоцитів, яка не перевищує меж, характерних для сублейкемічної стадії лейкозу (20–30 тис. в 1 мкл у великої рогатої худоби).

Зменшення кількості лейкоцитів називається *лейкопенією*, що завжди є патологічним явищем, показником зниження реактивності організму. Особливо небезпечна лейкопенія під час захворювань, які, як правило, супроводжуються лейкоцитозом. Лейкопенія може бути зумовлена: а) посиленням руйнування лейкоцитів у кров'яному руслі під впливом лейкоаглютининів (класична чума свиней, сальмонельоз телят та опромінення радіонуклідами; б) пригніченням функції органів лейкопоезу продуктами життєдіяльності бактерій, грибів, вірусів, деякими отрутами, лікарськими засобами, іонізуючим випромінюванням. Часто токсичні речовини спричиняють органічні зміни органів лейкоцитопоезу.

4.5. Підрахунок кількості клітин крові у птиці

У крові птиці спочатку підраховують загальну кількість клітин в одному мікролітрі крові. Для цього використовують методику підрахунку еритроцитів у тварин. Потім готують мазки крові, фарбують як і в ході виведення лейкограми. У пофарбованих мазках за великого збільшення мікроскопа під імерсійним об'єктивом підраховують 1000 клітин з поділом їх на еритроцити, тромбоцити та лейкоцити, на підставі чого вираховують кількість клітин окремих видів в 1 мкл крові. Наприклад: за підрахунку в лічильній камері у 1 мкл крові було 3 400 тис. клітин. У пофарбованому мазку підраховано еритроцитів – 980, лейкоцитів – 8, тромбоцитів – 12, що у відсотках складає відповідно 98; 0,8 та 1,2%. Складають співвідношення:

$$\begin{aligned} 3\,400\,000 \text{ клітин} &= 100\% \\ x &= 98\%. \end{aligned}$$

Виходячи із співвідношення :

$$x = (98 \cdot 3\,400\,000) : 100 = 3\,332\,000.$$

Отже, еритроцитів у 1 мкл крові 3 332 тис.

У такий же спосіб визначають кількість лейкоцитів і тромбоцитів (табл. 4.4).

Таблиця 4.4

Кількість еритроцитів, лейкоцитів і тромбоцитів у крові птиці

Вид птиці	Еритроцити, млн/мкл; Т/л	Лейкоцити, тис/мкл; Г/л	Тромбоцити, тис/мкл; Г/л
Кури	3,0–4,0	20–40	32–100
Гуси	2,5–3,5	20,5–30	35–80
Качки	3,0–4,5	20–40	35–80
Голуби	3,0–3,5	10–15	10–72

4.6. Виведення лейкограми

Визначення загальної кількості лейкоцитів не дає уявлення про кількість окремих їх видів. Такі дані можна отримати у процесі дослідження лейкограми – відсоткового співвідношення окремих форм лейкоцитів. Лейкограму виводять у зафарбованих мазках крові.

Приготування мазків крові. Мазки крові готують на добре знежирених та чистих предметних скельцях з рівною, без подряпин і шорсткостей поверхнею. Нові скельця протирають щіткою у теплій мильній воді і промивають у проточній. Використані скельця після механічного очищення у теплій мильній воді витримують протягом декількох днів у хромовій суміші (100 г двохромовокислого калію розчиняють в 1 л гарячої води і поступово підливають 100 мл сульфатної кислоти). Від кедрової олії скельця очищають бензином або ксилолом. Після ополіскування в проточній воді їх витирають чистою сухою ганчіркою і кладуть у банку з сумішшю 96% етилового спирту та діетилового ефіру у рівній кількості. Після цього скельця витирають чистою тканиною і зберігають у закритій посудині.

Краплю крові для приготування мазка беруть кутом шліфованого скельця, паличкою або капіляром і переносять на предметне скельце. Крапля має бути таких розмірів, щоб мазок уміщувався на скельці, не доходячи 1 см до його вузьких країв. Якщо крапля дуже велика, мазки виходять товстими, нерівномірними і, не закінчуючись, доходять до кінця скельця. Якщо ж крапля мала, то мазки виходять короткими, переривчастими, мають виступи і закінчуються довгими “язичками” (рис. 4.3).

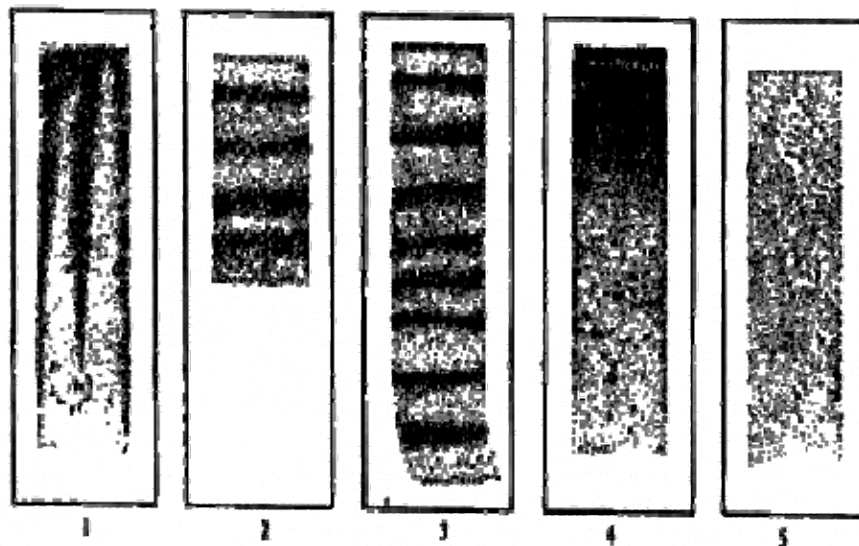


Рис. 4.3. Мазки крові: 1–4 – неякісні; 5 – якісний мазок

Для приготування мазка в ліву руку беруть предметне скельце і затискають його короткі ребра між великим та середнім пальцями. Маленьку краплю крові наносять на праву сторону скельця, відступивши

1–1,5 см від його краю. Кінчиками великого і вказівного пальців правої руки беруть за довгі ребра шліфованого скельця, яке має бути вужчим, ніж предметне, ближче до його краю. Шліфоване скельце ставлять *перед краплею* під кутом 45° і просувають його праворуч до краплі, вичікують, щоб крапля розпливлася краєм скельця. Після цього шліфоване скельце *під тим же кутом* проводять уздовж предметного вперед так, щоб кров безперервно і рівномірно тягнулась за його краєм. Шліфоване скельце слід забирати від предметного не раніше, ніж на лівому кінці. При цьому горбики пальців повинні ковзати по ребрах предметного скельця, створюючи рівномірний рух. Якщо рух руки не рівномірний, місцями призупиняється, то мазок буде хвилястим.

Мазок слід висушувати на повітрі. У разі повільного його висихання в холодну погоду можна попередньо скельця підігріти на грілці або кришці стерилізатора, наповнених теплою водою, або, взявши мазок пальцями за ребра, помахати ним у повітрі до зникнення вологого блиску. Мазок повинен висихати швидко, оскільки клітини зморщуються і втрачають свою форму. Найбільша збереженість клітин спостерігається за звичайного висихання мазка без підігріву, на сухому повітрі. Під час роботи зі стерилізатором або грілкою треба стежити, щоб підігріті скельця були теплими, але не гарячими, від цього також травмуються клітини.

Після висихання мазка на його початковому верхньому кінці простим олівцем чи голкою маркують інвентарний номер або кличку тварини і дату приготування мазка. Хімічним олівцем або чорнилами маркувати не можна, бо під час фіксування або фарбування мазка фарба від них розпливається по склу. За повного висихання мазки можна перекласти в коробку або загорнути в папір.

Під час приготування мазків у сирому приміщенні краще перекласти їх сірниками. У ході оцінювання якості мазка звертають увагу на довжину, ширину, густину мазка і рівномірність розподілення крові по скельцю. Добре виготовлений мазок повинен бути жовтуватого кольору, тонким, рівним і, якщо дивитись на світло, вилискувати кольорами веселки. В ньому не повинно бути розривів, просвітів, нерівномірності розподілення крові (рис. 4.4). За довжиною мазок має займати не більше $2/3$ предметного скельця, а закінчуватись, вільно обриваючись у вигляді бахроми. Він має бути вужчим, ніж предметне скельце, і розміщуватися посередині так, щоб з обох його боків були вільні поля. Кров не має потрапляти під шліфоване скельце, а має тягнутися за ним з тим, щоб уникнути травмування клітин.

У холодну пору року під час приготування мазків слід захищати їх від дії парів води, оскільки вони, конденсуючись на холодній поверхні скла, швидко гемолізують клітини.

Фіксування мазків. Закріплення клітин крові на скельці в такому вигляді, щоб форма і структура їх не змінювалися, досягають за допомогою різних хімічних речовин. Нефіксовані мазки у разі довгого зберігання втрачають здатність сприймати фарбу. Тому рекомендується мазки фіксувати не пізніше, ніж через 1 добу після приготування, а фарбувати не пізніше 2–3 тижнів. Свіжі мазки фарбуються набагато краще, і клітини добре диференціюють за кольором ядер та протоплазми.

Мазки, виготовлені за мінусової температури, після просушування на повітрі треба опустити у фіксатор. Під час перенесення в тепле приміщення без фіксування вони швидко потіють, а еритроцити гемолізуються.

Для фіксування використовують звичайну хімічну склянку, куди вертикально парами ставлять мазки так, щоб вони не торкалися один до одного лицевим боком. Під час фіксування склянку закривають від доступу повітря. Після закінчення терміну фіксування мазки виймають і ставлять вертикально для просушування на спеціально виготовлені для цього дошки. Із існуючих численних реактивів для фіксування мазків крові та пунктатів кровотворних органів найкращим є метиловий спирт. Тривалість фіксування 3–5 хв. У 100 мл спирту можна фіксувати 100-150 мазків. У разі помутніння та забруднення спирт стає непридатним для подальшого застосування. За відсутності метилового спирту можна застосовувати наступні фіксатори: суміш Нікіфорова з рівних частин абсолютного етилового спирту та ефіру (тривалість фіксування 15-20 хв); абсолютний етиловий спирт (15–20 хв); метиловий спирт з ацетоном (5 хв); ацетон (5 хв); денатурований спирт (15 хв); 1% розчин осмієвої кислоти (1/2–1 год) і 1% спиртовий розчин формаліну (тривалість фіксування 1 хв). Денатурований та етиловий спирти дають багато артефактів.

Для розведення фарб необхідно використовувати воду, реакція якої близька до нейтральної (рН 6,8). Готують з великою точністю два розчини буферних солей (фосфатів): натрію фосфат двозаміщений ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$) в кількості 17,814 г на 1 л (рН 8,302) і калію фосфат однозаміщений (KH_2PO_4) в кількості 13,638 г на 1 л (рН 4,529). Змішуючи розчини фосфатів натрію та калію в різних пропорціях (табл. 4.5), отримують суміш потрібної реакції. Найкраща реакція для фарбування мазків крові встановлюється за змішування рівної кількості першого і другого розчинів, при цьому рН суміші буде 6,813. Розчини фосфатів треба зберігати в темному місці, для їх консервування додають тимол. На 1 л води достатньо 10 мл суміші фосфатів.

**Розрахунок співвідношення суміші розчинів фосфатів
для нейтралізації води**

Буферний розчин з концентрацією іонів (рН)	Кількість розчинів солей у 1 л води		Буферний розчин з концентрацією іонів (рН)	Кількість розчинів солей у 1 л води	
	Na ₂ HPO ₄	KH ₂ PO ₄		Na ₂ HPO ₄	KH ₂ PO ₄
4,529	–	10,0	6,976	6,0	4,0
5,305	0,25	9,75	7,346	8,0	2,0
5,910	1,0	9,0	7,863	9,5	0,5
6,643	4,0	6,0	8,171	9,9	0,1
6,813	5,0	5,0	8,302	10,0	–

Фарбування мазків. Для якісного фарбування слід дотримуватися наступних правил:

а) посуд має бути абсолютно чистим, сухим і не використовуватись для інших робіт. Після закінчення фарбування треба відразу мити посуд, краще в дистильованій воді;

б) фарби необхідно берегти від світла, тепла, холоду, парів кислот та лугів, перед використанням не збовтувати. Якість нової партії фарби треба попередньо перевірити шляхом фарбування 2–3 мазків, встановити рН і придатність її для використання.

Пофарбовані мазки потрібно сушити на повітрі у вертикальному положенні.

Найбільш розповсюдженим є фарбування за методами Романовського-Гімзи, Паппенгейма, Май-Грюнвальда, Нохта, Лейшмана, прискорене за Романовським, спеціальні методи за Фрейфельдом, фарбування для підрахунку тромбоцитів.

Фарбування за Романовським-Гімзою. Робочий розчин фарби готують перед використанням з розрахунку 2 краплі фарби заводського виробництва (азур-еозинава суміш) на 1 мл дистильованої води або 5 мл фарби на 100 мл води.

Техніка фарбування мазків наступна: мазки ставлять вертикально у спеціальний контейнер або кладуть вузькими ребрами (лицьовим боком вниз) на сірники чи скляні палички в чашку Петрі і наливають приготовлений робочий розчин фарби. Розчин фарби наливають не на мазок, а під нього з тією метою, щоб осад фарби осідав на дно чашки і не бруднив мазок. Тривалість фарбування – 20–30 хв, після цього мазок промивають водою. Добре вимитий мазок висушують у вертикальному положенні і потім на декілька секунд занурюють у спирт для кращої диференціації ядра. Не

змиваючи спирту, препарат швидко висушують і досліджують під мікроскопом. Добре зафарбований мазок – рожево-фіолетового кольору, нефарбований має червоний відтінок на поверхні, перефарбований – темно-фіолетовий.

За якісного фарбування мазків ядра лейкоцитів повинні бути забарвлені в червоно-фіолетовий колір, а цитоплазма – у блакитний. Цитоплазма нейтрофілів блідо-рожева або світла з дрібною зернистістю. Зернистість еозинофілів яскраво-рожева, цитоплазма моноцитів – блакитно-сіра. Фарба нейтральної або кислої реакції забарвлює еритроцити в рожевий, а лужної – у блакитний кольори. Сині тони мазків вказують на лужність, червоні – на кислотність води. Перефарбовані мазки можна частково відновити, якщо прополоскати їх в етиловому спирті.

Фарбування за Паппенгеймом. На фіксований мазок наносять 1–2 мл готової фарби Май-Грюнвальда, що являє собою розчин еозиновокислого метиленового синього (0,5 мл) у метиловому спирті (100%) і чистий гліцерин (50 мл). Через 3 хв до фарби додають рівну кількість дистильованої води і продовжують фарбувати ще 1–2 хв. Після цього фарбу змивають і мазок дофарбовують свіжоприготовленим розчином фарби Романовського-Гімзи впродовж 10–15 хв. Цей метод вважається найкращим, особливо для вивчення тонкої структури клітинних елементів крові та кровотворних органів.

Фарбування за Май-Грюнвальдом. На фіксований мазок наливають 1–2 мл готової фарби Май-Грюнвальда пополам з водою. Через 2–3 хв мазок промивають водою і дофарбовують за Романовським-Гімзою протягом 10–15 хв.

Фарбування за Нохтом. Попередньо готують дві фарби: 0,1% водний розчин основної фарби азуру II і 0,1% розчин кислої фарби жовтого еозину (тобто по 1 г сухої фарби на 1 л дистильованої води, краще з нейтральним рН). Фарби готові до використання через 2 тижні після приготування. Їх треба зберігати подалі від кислот та лугів. Для фарбування фіксованих мазків готують робочий розчин фарби із розрахунку дві частини розчину еозину, три частини розчину азуру II і п'ять частин води. Фарбують протягом 20–25 хв.

Фарбування за Нохтом – найбільш простий і зручний метод. Добре виявляє специфіку кожної клітини, диференціює ядро. Використовують для фарбування мазків крові і кістково-мозкового пунктату.

Прискорене фарбування за Романовським. На свіжий нефіксований мазок наносять 15–20 крапель суміші в рівній кількості концентрованого розчину фарби Романовського-Гімзи і ацетону. Через 1 хв, обережно перемішуючи, додають 1–2 мл слаболужної дистильованої води. Через 5–10 хв препарат ополіскують і висушують.

Виведення лейкограми. Реактиви: імерсійне масло, діетиловий ефір або етиловий спирт.

Лейкограму визначають у мазках крові диференційованим підрахунком 100 або 200 клітин під імерсійним об'єктивом (х 90) і окуляром (х 10 або 20) світлового мікроскопа, краще бінокулярного (табл. 4.6). Під час мікроскопії об'єктив очей мають бути відкритими, правою рукою постійно повертають мікрометричний гвинт для отримання чіткого зображення. Конденсор піднімають догори, діафрагму широко розкривають, часто використовують штучне освітлення (освітлювачі марки ОІ–31 або ОІ–7). Пересувають мазок хрестоподібним столиком. У ході диференціювання окремих форм лейкоцитів початківцям слід користуватися атласами крові. Утруднення може викликати диференціація великих лімфоцитів і моноцитів (у останніх ядро неправильної форми, сітчасте, ніжне, у лімфоцита – округле, хроматин грубої структури й інтенсивно зафарбований).

Таблиця 4.6

Лейкограма крові тварин різних видів

Вид тварини	Базофіли	Еозинофіли	Нейтрофіли			Лімфоцити	Моноцити
			юні	паличко-ядерні	сегментоядерні		
Велика рогата худоба	0–2	5–8	0–1	2–5	20–35	40–65	2–7
Коні	0–1	2–6	0–1	3–6	45–62	25–44	2–4
Свині	0–1	1–4	0–2	2–4	40–48	40–50	2–6
Вівці	0–1	1–6	0–2	3–6	30–45	40–50	2–5
Кози	0–1	3–8	–	1–5	20–40	45–64	2–4
Собаки	0–1	3–9	–	1–6	45–60	21–40	1–5

Оскільки окремі види лейкоцитів на мазку розподілені нерівномірно, то необхідно дотримуватися визначених однотипних правил виведення лейкограми. Запропоновано два методи підрахунку лейкоцитів у мазках: Шіллінга і Філіпченка.

Метод Шіллінга. Знаходять вільний край мазка, підраховують клітини у першому полі зору, пересувають мазок вглибину ще на одне поле. Так підраховують клітини у чотирьох полях зору, потім мазок пересувають праворуч або ліворуч ще на чотири поля зору і так само повертають назад до вільного краю препарату. Таким чином, одержують ламану лінію за формою букви “П” (лінія меандра). У такому порядку підраховують 4 ділянки (по дві) з кожного краю мазка, по 50 або 25 клітин у кожному, всього 200 або 100 лейкоцитів. Результати фіксують рахівником, 11 клавіш якого позначені літерами лейкограми.

Метод Філіпченка. Мазок умовно поділяють на 3 частини: початкову, середню і кінцеву. Від одного краю мазка у кожній частині просуваються до іншого краю і підраховують 100 або 200 клітин.

Під час підрахунку 100 клітин кількість лейкоцитів того чи іншого виду буде відповідати такій же кількості у лейкограмі. За підрахунку 200 клітин одержану кількість ділять на 2.

Знаючи загальну кількість лейкоцитів та лейкограму, можна визначити абсолютну кількість клітин кожного виду в 1 мкл крові і з'ясувати характер лейкоцитозу чи лейкопенії – відносні вони чи абсолютні.

Інтерпретація змін лейкограми. За патології кількість окремих видів лейкоцитів може збільшуватися (базофілія, еозинофілія, нейтрофілія, лімфо- і моноцитоз) або зменшуватися (базопенія, еозинопенія, нейтропенія, лімфоцитопенія, моноцитопенія). Збільшення або зменшення кількості окремих видів лейкоцитів може бути абсолютним і відносним. За *абсолютного видового лейкоцитозу* збільшується як відносна, так і абсолютна кількість цих клітин в 1 мкл крові, за *відносного* – лише відносна кількість лейкоцитів цього виду, водночас абсолютна кількість їх знаходиться в межах норми.

У клінічній практиці найчастіше зустрічаються зміни еозинофілів, нейтрофілів і лімфоцитів.

Збільшення кількості еозинофілів у крові називають *еозинофілією*, *зменшення* – *еозинопенією*, а відсутність їх у крові – *анеозинофілією*. *Еозинофілія* спостерігається у разі захворювань, які перебігають з явищами алергії; паразитарних хвороб (фасціольоз, ехінококоз та інші гельмінтози); хронічного мієлолейкозу; хронічної альвеолярної емфіземи у коней. *Еозинопенія* реєструється за гострого перебігу міокардиту, пневмонії, інфекційних і паразитарних хвороб, сепсису, стресу, травматичного перикардиту.

Прогностичне значення змін еозинофілів слід оцінювати в комплексі з іншими змінами крові. Поява у крові еозинофілів у разі захворювань, які супроводжуються еозинопенією, на фоні деякого зменшення кількості нейтрофілів і збільшення лімфоцитів, може розглядатися як сприятливий симптом (“зоря одужання”).

Збільшення кількості нейтрофілів – *нейтрофілія* – може перебігати без змін співвідношень окремих форм нейтрофілів або супроводжуватися підвищенням кількості молодих форм нейтрофілів у периферичній крові – *зрушення ядра вліво*, або, навпаки, збільшенням кількості сегментоядерних клітин – *зрушення ядра вправо*. За ступенем регенерації нейтрофільний лейкоцитоз буває:

а) з *простим (регенеративним)* зрушенням ядра – загальна кількість лейкоцитів у межах норми або незначно збільшена, паличко-ядерних

нейтрофілів збільшена в 1,5–2 рази, порівняно з максимальною нормою, з'являються поодинокі юні (1–3%). Це зрушення характерне для легкої форми гострих інфекційних та запальних процесів з відносно сприятливим перебігом;

б) з *різким регенеративним (гіперрегенеративним)* зрушенням – характеризується вираженим лейкоцитозом, появою в лейкограмі великої кількості юних нейтрофілів, навіть мієлоцитів, а кількість паличкоядерних більша, ніж удвічі, порівняно з нормою. Відносна кількість сегментоядерних нейтрофілів і лімфоцитів зменшена. Діагностується така різновидність нейтрофілії за гострих гнійних запальних процесів з тяжким перебігом (гнійний перикардит, гнійний перитоніт), септичних інфекцій. Прогноз – від обережного до несприятливого;

в) нейтрофілія з *гіпопластичним (регенеративно-дистрофічним)* зрушенням ядра проявляється лейкопенією, збільшенням кількості молодих форм нейтрофілів, у яких відбуваються дистрофічні зміни ядра і цитоплазми, у поєднанні зі зменшенням кількості сегментоядерних нейтрофілів. Спостерігається за тривалого й сильно вираженого впливу на кровотворні органи бактерійних отрут і є показником пригнічення функції кісткового мозку. Прогноз у таких випадках несприятливий.

Нейтрофілія зі зрушенням ядра вправо характеризується збільшенням кількості сегментоядерних нейтрофілів за нормальної або зниженої кількості паличкоядерних. Незначні нейтрофілія і лейкоцитоз спостерігаються за легкого перебігу інфекцій та м'язового навантаження, а нейтрофілія на фоні нормальної або зниженої кількості лейкоцитів – у старих і виснажених тварин. Значне збільшення кількості сегментоядерних нейтрофілів, поява в них дистрофічних змін у поєднанні з вираженою лейкопенією і зменшенням у лейкограмі кількості паличкоядерних форм буває за хронічного перебігу септичних процесів і є показником виснаження кісткового мозку. Прогноз – несприятливий.

Лімфоцитоз буває стійким і короткотерміновим. Стійкий розвивається за хронічного перебігу інфекційних хвороб (лімфолейкоз, бруцельоз, туберкульоз, чума свиней та ін.). Короткотерміновий лімфоцитоз, що супроводжується збільшенням кількості еозинофілів, є сприятливим симптомом, який свідчить про близьке видужання. Коли ж лімфоцитоз перебігає на фоні лейкопенії, супроводжується значною нейтро- і еозинопенією, то це означає перехід гострого процесу в хронічний і є показником зниження захисних сил організму. Прогноз у таких випадках обережний.

Моноцитоз зустрічається під час імунізації тварин, за лістеріозу, піроплазмідозів, хронічних септичних процесів, а також у ході видужання після гострих запальних та інфекційних хвороб. *Моноцитопенія* зустрічається на початковій стадії гострих запальних процесів,

інфекційних та септичних захворювань (у поєднанні з нейтрофілією). Це короткотермінове явище є закономірним і не повинно оцінюватися як несприятливе. Стійка моноцитопенія супроводжує інфекції з хронічним перебігом і, як ознака пригнічення функції моноклеарної фагоцитарної системи (МФС), є несприятливим прогностичним показником.

Базофілія зустрічається за гемофілії, мієлоїдного лейкозу, після парентерального введення гіперімунних сироваток.

4.7. Гематологічний профіль

Використовуючи методи варіаційної статистики, професор Г.В.Домрачов і доцент С.П.Гоженко, незалежно один від одного, розробили гематологічні профілі для сільськогосподарських тварин різних видів. Гематологічний профіль являє собою стандартну картку, яка містить дані про гематологічні показники у межах фізіологічних коливань. Після дослідження крові результати зазначають у картці нанесенням точок у графі відповідного показника.

Гематологічний профіль С.П.Боженка

Картка профілю має графі для нанесення даних про кількість еритроцитів, гемоглобіну, лейкоцитів, ВГЕ та лейкограму. Межа фізіологічних коливань кожного показника виділена жирними лініями. Дані про лейкограму наведені у відсотках та абсолютних числах. Абсолютну кількість окремих форм лейкоцитів розраховують із врахуванням загальної кількості лейкоцитів і відносної кількості їх у лейкограмі (рис. 4.5).

Результати дослідження крові наносять на картку у вигляді крапок. Якщо крапка не знаходиться у межі окресленого прямокутника, то це означає, що цей показник виходить за межі фізіологічних коливань. Опускаючи перпендикуляри від нанесених крапок на нульову лінію, отримують діаграму про стан досліджених показників крові.

Гематологічний профіль Г.В. Домрачева

Графік нанесено на стандартну картку. На жирній лінії М (*Media*) сітки розміщені середньоарифметичні дані для тварин кожного виду: кількість еритроцитів, лейкоцитів, вміст гемоглобіну, колірний показник, лейкограма (рис. 4.6).

Доверху і донизу від середньої лінії М нанесено на однаковій відстані одна від одної дві паралельні лінії, на яких показано цифри з різницею в 1 сигму (δ). Величина середнього квадратичного відхилення для кожного показника позначена внизу картки.

Показник	Еритроцити 5–7,5 Т/л	Лейкоцити, 6–12 Г/л	Hb 95–125 г/л	ВГЕ 15–20 пг	Лейкоцити, абс. од.	Лейкограма								
						Б	Е	М	Ю	П	С	Лім	Мон	
						0–2	3–7	0	0–1	2–6	20–36	40–68	2–6	
						0-180	270-630	0	0-90	180-540	1800-3240	3600-6120	180-540	
15				30	7500									
14				28	7000									
13				26	6500									
12				24	6000									
11				22	5500									
10				20	5000									
9				18	4500									
8				16	4000									
7				14	3500									
6				12	3000									
5				10	2500									
4				8	2000									
3				6	1500									
2				4	1000									
1				2	500									
0				0	0									
Дані					%									
					Абс.									
					од.									

Дата _____

Підпис _____

**Рис. 4.5. Гематологічний профіль
для великої рогатої худоби (за Гоженком С.П.)**

№ або кличка тварини _____										
Порода _____										
Вік _____										
Стать _____										
Вгодованість _____										
+ 2δ	125,0	7,5	10,0	2,0	7,0	6,0	36,0	68,0	6,0	1,15
+ 1δ	117,5	6,875	9,0	1,5	6,0	5,0	32,0	61,0	5,0	1,075
м.	110,0	6,25	8,0	1,0	5,0	4,0	28,0	54,0	4,0	1,0
	Нь, г/л	Ер., Г/л	Л., Г/л	Б	Е	П	С	Л	М	КП
-1 δ	102,5	5,625	7,0	0,5	4,0	3,0	24,0	47,0	3,0	0,925
-2 δ	95,0	5,0	6,0	0	3,0	2,0	20,0	40,0	2,0	0,85
Якісні зміни крові:										
Примітка:										
Міелоцити _____										
Юні _____										
δ	7,5	0,625	1,0	0,5	1,0	1,0	4,0	7,0	1,0	0,075

Дата _____

Підпис _____

**Рис. 4.6. Гематологічний профіль
для великої рогатої худоби (за Домрачевим Г.В.)**

Після дослідження крові тварини на картку наносять крапки, які сполучають лінією. Крива лінія показує реакцію організму на патологічний процес і дає змогу робити висновок про стан здоров'я тварини.

Показники вмісту гемоглобіну, еритроцитів і лейкоцитів наносять на сітку в абсолютних, а показники лейкограми – у відносних величинах, що є недоліком цього профілю, оскільки відносні величини не показують справжньої кількості того чи іншого різновиду лейкоцитів у крові.

Після заповнення гематологічних профілів проводять їх аналіз. Збільшення чи зменшення певного показника крові записують у таблиці (табл. 4.7) спеціальними термінами: зменшення кількості еритроцитів – олігоцитемія (еритропенія), збільшення кількості лімфоцитів – лімфоцитоз, відсутність базофілів – анбазофілія тощо.

Таблиця 4.7

Аналіз показників гематологічних профілів

Показник	Гематологічний профіль	
	за Г.В.Домрачевим	за С.П.Гоженком
Лейкоцити	лейкоцитоз	
Еритроцити	норма	норма
Гемоглобін	плейохромія	плейохромія
Базофіли	анбазофілія	
Нейтрофіли	мієлоцити	відсутні
	юні	відсутні
	паличкоядерні	нейтрофілія; просте зрушення ядра
	сегментоядерні	норма
Лімфоцити	норма	лімфоцитоз
Моноцити	норма	моноцитоз

4.8. Зміни морфологічної структури еритроцитів і лейкоцитів

Анізоцитоз – поява еритроцитів, розмір яких менший (*мікроцити*) або більший (*макроцити*), ніж нормальний. Діагностується електронними лічильниками крові, мікроскопічним методом або розрахунковим діленням гематокритної величини на кількість еритроцитів. Прямий мікроскопічний метод полягає у вимірюванні діаметра еритроцитів у зафарбованих мазках крові з використанням окуляр- і об'єктив-мікрометрів. Вимірюють діаметр 200–300 різних еритроцитів. Залежно від діаметра еритроцитів результати розподіляють за групами (мікро-, нормо- і макроцити) та визначають відносну кількість кожної (у відсотках).

Пойкілоцитоз – зміна форми еритроцитів, які стають зірчастими, витягнутими, грушоподібними або іншої форми. Визначається мікроскопією мазків.

Анізохромія – зміна забарвлення еритроцитів. Вони бувають інтенсивно (*гіперхромні*), слабо забарвлені (*гіпохромні*) чи забарвлені неоднорідно (*поліхроматофільні*). За значного зменшення вмісту гемоглобіну еритроцит зафарбовується тільки у периферичній частині у

вигляді вузького кільця. Поліхроматофілія (поліхромазія) спостерігається у разі гемолітичної, гострої постгеморагічної та В₁₂-фолієво-дефіцитної анемії.

Базофільна зернистість еритроцитів виявляється краще в мазках, зафарбованих метиленовим синім. Мазок фіксують упродовж 3 хв у метиловому спирті (метанолі), потім після висушування заливають фарбою (5 крапель 1% водного розчину метиленового синього на 20 мл дистильованої води) на 1 годину. Фарбу зливають, мазок просушують. Базофільна зернистість у еритроцитах забарвлюється у фіолетово-синій колір. Підраховують 10000 еритроцитів, зазначаючи кількість, що мають базофільну зернистість.

Тільця Жоллі – залишки ядра у вигляді 1–2 яскраво-червоних невеликих круглих крапок. Вони зустрічаються за тяжкого перебігу анемії.

Кільця Кебота – залишки оболонки ядра у формі овалу або вісімки червоно-фіолетового кольору, утворюються за різних видів анемії.

Патологічні зміни лейкоцитів. У нейтрофілах спостерігається анізоцитоз, підвищена сегментація ядра (понад 5 сегментів), втрата зв'язку між сегментами (виявляють мікроскопією мазків, зафарбованих для виведення лейкограми), вакуолізація й токсична зернистість цитоплазми, вакуолізація, пікноз і рексис ядра.

Токсичну зернистість у цитоплазмі нейтрофілів у вигляді синюватих зернят спостерігають за деяких інфекційних хвороб, крупозної пневмонії, гнійно-септичних та інших запальних процесів. Токсична зернистість утворюється в результаті коагуляції білка цитоплазми. Виявляють *фарбуванням мазків за Фрейфельдом*. До 20 мл води додають 7 крапель фуксину Ціля, 5 крапель 1% розчину метиленового синього і добре змішують. Суміш наливають на фіксовані сухі мазки на 1 год, потім змивають її водою і мазки просушують.

4.9. Підрахунок кількості тромбоцитів

Підрахунок кількості тромбоцитів проводять у лічильних камерах або забарвлених мазках крові (метод Фоніо). Зважаючи на те, що тромбоцити поза кров'яним руслом збираються в купки, де підрахувати їх неможливо, необхідно запобігти їх склеюванню. Цього досягають застосуванням 1% розчину магнію сульфату або 5% натрію цитрату. Після взяття крові для підрахунку еритроцитів місце уколу протирають і наносять краплю зазначеного розчину, потім видавлюють краплю крові. Мазок роблять звичайним способом, фіксують і забарвлюють. Підрахунок ведуть в імерсійній системі. Тромбоцити мають вигляд маленьких

(діаметром 2–3 мкм) плоских структур круглої або овальної форми, забарвлених у фіолетовий колір, які зрідка розміщені по одному серед еритроцитів. У ссавців їх розмір 2–3, у птахів – 4–5 мкм. Слід паралельно рахувати еритроцити і тромбоцити. З'ясувавши, скільки пластинок припадає на 1000 еритроцитів, і знаючи абсолютну кількість їх у 1 мкл крові, легко вирахувати кількість тромбоцитів у цьому об'ємі крові. У 1 мкл крові великої рогатої худоби міститься 260–700 тис. тромбоцитів; овець – 270–500; кіз – 300–900; коней – 200–500; свиней – 180–300 тис. (див. табл. 4.3).

Існує метод підрахунку тромбоцитів у камері. Кров розводять у 5–7% розчині трилону Б для запобігання згортанню і аглютинації кров'яних пластинок, заповнюють камеру й підраховують тромбоцити за звичайними правилами.

Діагностичне значення. *Тромбоцитопенія* спостерігається за екзота ендогенних (уремія, патологія печінки) інтоксикацій, інфекційно-токсичних і токсико-алергічних станів. У виникненні тромбоцитопенії має значення розпад тромбоцитів у периферичному руслі, а також гальмування їх дозрівання у кістковому мозку під впливом токсичних і алергічних факторів. Подібні тромбоцитопенії належать до симптоматичних, мають гострий перебіг і закінчуються одужанням за умови усунення основної хвороби.

Тромбоцитопенія буває наслідком гіперспленічного стану, який виникає за паразитарних (бабезіоз) та інфекційних (лептоспіроз) хвороб і гемолітичних анемій, деяких інтоксикацій. У цих випадках тромбоцитопенія є наслідком гальмівного впливу селезінки на кістковий мозок – гіперспленізму.

Тромбоцитопенія може бути наслідком гіпопластичної анемії, органічного ураження кісткового мозку. Тромбоцити можуть руйнуватися антитілами: у новонароджених переважають *трансімунні* тромбоцитопенії, зумовлені переданням аутоантитіл від матері через молозиво, а в молодняку також реєструють *гетероімунні* тромбоцитопенії, спричинені зміною антигенної структури тромбоцитів під дією лікарських речовин, токсинів і вірусів. У дорослих тварин частіше спостерігають аутоімунні форми тромбоцитопеній (Карпуть І.М., 1991).

Значно рідше реєструють *збільшення* кількості тромбоцитів – *тромбоцитоз*: після хірургічних операцій, травм м'язів, у стадію видужання після інфекційних хвороб.

Література: [21, С. 443–445; 22, С. 448–450; 38, С. 435–450; 40, С. 5–30; 81–93; 49, С. 98–147; 60, С. 48–60; 80, С. 53–89].

4.10. Визначення відносної густини крові

Відносна густина крові характеризує відношення між щільними складовими крові та водою. Вона залежить від вмісту у крові гемоглобіну, білків та солей. Найбільш простий метод визначення (за Гаммершлягом) полягає в опусканні краплі крові у суміш хлороформу і бензолу (20:50). За однакової відносної густини крові й суміші крапля займає середнє положення в циліндрі. Потім ареометром вимірюють відносну густину суміші.

Метод Філіпса більш надійний. Для його виконання готується основний розчин міді сульфату з відносною щільністю 1,1 (159,6 г солі розчиняють в 1 л води). Потім у кількох циліндрах готуються робочі розчини з відносною густиною, близькою до густини крові: 1,030; 1,035; 1,040;...1,060. Для приготування розчину з відносною щільністю 1,040 потрібно відміряти 40 мл основного розчину міді сульфату і 60 мл дистильованої води; 1,045 – відповідно 45 і 55 мл тощо. Рідини необхідно перемішувати.

Потім у кожний циліндр з приготовленим розчином піпеткою обережно опускають 1–2 краплі свіжої досліджуваної крові і зазначають той із них, у якому крапля знаходиться протягом 3–5 с у підвішеному стані (не спливати і не опускатись на дно). Відносна густина крові відповідатиме густині рідини у цьому циліндрі (табл. 4.8).

Таблиця 4.8

Відносна густина крові здорових тварин, г/см³ або кг/л

Вид тварини	Коливання
Велика рогата худоба	1,045 – 1,055
Вівці, кози	1,047 – 1,055
Коні	1,045 – 1,055
Свині	1,042 – 1,060
Собаки	1,044 – 1,056
Кролі	1,048 – 1,060
Кури	1,039 – 1,057

Збільшення відносної густини спостерігається за поліцитемії, згущення крові внаслідок втрати води, що відбувається за діарей різної етіології, поліурії, утворення ексудатів і трансудатів, блювання, надмірного потіння; *зменшення* є характерною ознакою анемії різної етіології, кахексії, гідремії.

Література: [38, С. 408; 49, С. 84–85].

4.11. Визначення швидкості осідання еритроцитів (ШОЕ)

Осідання еритроцитів – це властивість їх осідати на дно посудини під час зберігання стабілізованої крові. Швидкість осідання еритроцитів залежить від багатьох факторів. Основними з них є кількісні та якісні зміни білків плазми крові. *Збільшується* ШОЕ за зростання у крові вмісту холестеролу та великодисперсних білків (глобулінів, фібриногену), оскільки вони сприяють процесу агрегації еритроцитів, зрушенню кислотно-основного балансу плазми вбік алкалозу, зменшенню кількості еритроцитів і збільшенню їх об'єму.

Зменшення ШОЕ може відбуватися за ацидозу, збільшення вмісту в крові жовчних кислот, дрібнодисперсних білків (альбумінів) і кількості еритроцитів, зменшення їх об'єму та насичення гемоглобіном (гіпохромія).

Принцип визначення ШОЕ. Кров беруть із судин кінчика вуха чи яремної вени, змішують з 5% розчином натрію цитрату у співвідношенні 1:4, набирають у градуйовану піпетку або пробірки, ставлять їх вертикально у штативі. ШОЕ визначають через годину.

Реактиви: 5% розчин натрію цитрату.

Метод Панченкова. Прилад Панченкова складається з дерев'яного або пластмасового штатива з гніздами і скляних капілярів з позначками 0, К, Р. Мітки 0 і К знаходяться на одному рівні – 100 мм від кінця піпетки. На початку роботи капіляр змочують 5% розчином натрію цитрату. Потім розчин набирають до мітки Р (50 мм), переносять на предметне скло або у фарфорову чашку. Із судин вуха піпеткою беруть кров до мітки К і змішують її з натрію цитратом. Стабілізовану кров набирають у піпетку до мітки 0 і ставлять у штатив. У зв'язку з тим, що у тварин (крім коней і свиней) ШОЕ невелика, піпетки інколи ставлять не вертикально, а під кутом 50°. Швидкість осідання еритроцитів визначають за висотою стовпчика плазми, який знаходиться над осадом крові (у мм).

Метод Неводова. Кров беруть у спеціальну пробірку, куди попередньо вносять порошок натрію цитрату, або 1 мл його 5% розчину. Кров набирають до позначки 0, обережно перемішують кілька разів, перевертаючи пробірку, і ставлять у штатив. ШОЕ визначають через 15, 30, 45, 60 хв і 24 год. Середню швидкість визначають діленням суми результатів 4-х вимірювань на їх кількість.

Нормативи ШОЕ у тварин різних видів значно коливаються (табл. 4.9).

Швидкість осідання еритроцитів у здорових тварин, мм

Вид тварин	Метод дослідження				
	за Панченковим через 1 год		за Неводовим через		
	вертикальне положення піпетки	піпетка під кутом 50°	15 хв	1 год	24 год
Коні	40–70	–	30–40	62–65	65–70
Велика рогата худоба	0,5–1,5	17–24	0,1–0,3	0,6–0,8	1–2
Вівці	0,5–1,0	12–25	0,1–0,3	0,7–1,0	1–2
Кози	0,3–1,0	10–12	–	0,3–1,0	–
Свині	2–9	–	2–5	20–35	25–40
Собаки	2–6	30–33	0–0,4	2,0–3,5	3–5
Кролі	1–2	26–32	0–0,1	1,0–2,0	1,5–2,5

Діагностичне значення. ШОЕ не є специфічною для якого-небудь захворювання, але її зміни завжди є показником наявності патологічного процесу в організмі, що нерідко має діагностичне та прогностичне значення і може бути показником ефективності лікування. *Збільшенням* ШОЕ супроводжуються: інфекційно-запальні процеси, нефрит і нефроз, які перебігають з гіпопротеїнемією та протеїнурією; гемобластози (підвищення ШОЕ пов'язане з диспротеїнемією, що виникає внаслідок розвитку пухлини у печінці, а також через анемію, що розвивається); анемії різної етіології, зокрема інфекційної та паразитарної, наприклад за піроплазмідозів; ревматичне запалення копит (внаслідок збільшення кількості фібриногену); деякі хвороби печінки як результат розвитку гіпоальбумінемії, але за її патології ШОЕ може зменшуватися через підвищення у крові вмісту жовчних кислот.

Уповільнення ШОЕ у тварин буває рідше й спостерігається під час захворювань, що супроводжуються втратою рідини і згущенням крові (діарея, поліурія), механічною і паренхіматозною жовтяницями, за стахіботріотоксикозу, колік, декомпенсації серцевої діяльності.

Література: [38, С. 409–410; 49, С. 85–89].

4.12. Визначення гематокритної величини

Гематокритна величина – це відношення об'єму формених елементів крові (еритроцити) до загального об'єму взятої крові. Для визначення

величини гематокриту застосовують методи мікроцентрифугування (за Шклярром), центрифугування у градуйованих піпетках із приладу Панченкова (за Тодоровим Й.) та електронно-автоматичні.

Метод Тодорова. Стабілізовану кров набирають у піпетки із приладу Панченкова до позначки 0. Кінці піпеток закривають гумовим кільцем або кришкою. Піпетки центрифугують за 1500 об/хв протягом 1-1,5 год або за 3000 об/хв упродовж 30 хв. Потім визначають частину піпетки, яку займають еритроцити.

Метод мікроцентрифугування (за Шклярром). У капіляр набирають стабілізовану кров і ставлять у гніздо. Центрифугують 5 хв за 7 тис. об./хв. Капіляр прикладають до спеціальної лінійки і визначають гематокритну величину.

Електронно-автоматичний метод. У приладах типу “Целлоскоп”, “Культер” та інших вимірювання гематокритної величини відбувається одночасно з підрахунком червоних кров’яних тілець. Величина електричних імпульсів, які виникають під час проходження клітин через капіляр, прямо пропорційна їх об’єму. За допомогою спеціальної електронної апаратури сила імпульсів додається і отримана сума ділиться на загальну кількість еритроцитів. Загальний об’єм еритроцитів вираховують шляхом множення цієї цифри на їхню кількість.

Клінічне значення. Гематокритну величину вираховують у відсотках, а за міжнародною системою (SI) – у $\text{м}^3/\text{м}^3$ або в л/л. Наприклад, 45% або $0,45 \text{ м}^3/\text{м}^3$, або 0,45 л/л (табл. 4.10).

Таблиця 4.10

Показники гематокритної величини та середнього об’єму еритроцитів у здорових тварин

Вид тварин	Гематокритна величина				Середній об’єм еритроцитів, мкм^3
	коливання		середнє значення		
	у відсотках	л/л	у відсотках	л/л	
Корови, молодняк	35–45	0,35–0,45	40	0,40	56
Телята	30–40	0,30–0,40	35	0,35	55
Вівці	25–40	0,25–0,40	30	0,30	31
Свині	35–43	0,35–0,43	39	0,39	58
Коні	35–45	0,35–0,45	40	0,40	50
Собаки	35–55	0,35–0,55	43	0,43	70 (53,0–90,0)
Кішки	26–48	0,26–0,48	37	0,37	43–53
Кролі	35–45	0,35–0,45	40	0,40	68
Кури	38–42	0,38–0,42	40	0,40	127

Збільшення гематокритної величини буває у разі захворювань, що супроводжуються згущенням крові, наприклад за діарей, поліцитемії. Цей показник використовують для визначення ступеня зневоднення

новонароджених телят у разі захворювань з діарейним синдромом інфекційної та незаразної етіології.

Зменшення гематокритної величини спостерігають за анемії різної етіології, гідремії.

Гематокритну величину використовують для визначення середнього об'єму одного еритроцита діленням її показника на кількість еритроцитів у 1 мкл крові і виражають у кубічних мікрометрах (мкм³). Наприклад, гематокритна величина – 50%, тобто в 1 мкл крові еритроцити займають об'єм 0,5 мкл або 500 млн/мкм³, а кількість еритроцитів – 5 млн у 1 мкл. Середній об'єм еритроцита (MCV) дорівнює:

$$MCV = \frac{500000000}{5000000} = 100 \text{ мкм}^3.$$

Цей показник використовують для характеристики окремих видів анемії. Збільшення об'єму еритроцитів (*макроцитоз*) спостерігається за мегало- і макроцитарних анемії, а його зменшення (*мікроцитоз*) – залізодефіцитних.

Література: [38, С. 410–411].

4.13. Визначення швидкості згортання крові

Із всіх методів визначення швидкості згортання крові найбільш зручний і простий – метод Моравця. На предметне скло наносять краплю крові діаметром 4–6 мм і кожні 30 с у неї опускають тоненький скляний капіляр. Швидкість згортання крові визначають появою першої нитки фібрину під час витягування капіляра з крові. У середньому швидкість згортання крові становить: у великої рогатої худоби – 5–7 хв, овець – 8–10, коней – 8–10, свиней – 10–15, собак – 3–8, кролів – 4 хв, курей – 20–40 с.

Швидкість згортання крові *підвищується* за крововтрат і захворювань, що супроводжуються згущенням крові, а *знижується* – у разі анемії, лейкозу, асфіксії, холемії, гломерулонефриту, К- і С-гіповітамінозів. Кров майже не згортається за гемофілії, сибірки, інфекційної анемії, піроплазмідозів.

4.14. Визначення рефракції кров'яного згустку

Ретракція – це самовільне відокремлення сироватки крові від її згустку під час відстоювання, а відношення кількості сироватки, що відокремилася від згустку, до об'єму взятої крові, називають *коефіцієнтом (індексом) ретракції*. Залежить ретракція від вмісту в крові кальцію, фібриногену, тромбоцитів, виду тварин, температури тіла тварини і навколишнього середовища.

У здорових тварин часткова ретракція настає через 1–3 год, а повна – 12–24 год, індекс ретракції становить 0,3–0,7. *Зниження ретракції кров'яного згустку або повна її відсутність (іррєктрактильність)* спостерігаються за лейкозу, мікотоксикозів, часто у разі хвороб, які супроводжуються гарячкою.

Література: [38, С. 408–409].

4.15. Визначення осмотичної резистентності еритроцитів

Принцип методу: резистентність еритроцитів – це властивість їх протистояти руйнівній дії: осмотичній, механічній, тепловій та ін. Осмотична резистентність визначається стійкістю еритроцитів до гіпотонічних розчинів натрію хлориду. Ізотонічний розчин натрію хлориду, в якому еритроцити зберігають свою форму та величину – 0,85–0,9%. У гіпертонічному розчині еритроцити зморщуються, у гіпотонічному – набрякають і гемолізуються.

Початкова стадія гемолізу найменш стійких еритроцитів, яка проявляється в гіпотонічному розчині натрію хлориду, близькому до ізотонічного, визначає мінімальну резистентність еритроцитів. Концентрація гіпотонічного розчину, яка викликає повний гемоліз, визначає максимальну резистентність еритроцитів.

Обладнання: центрифуга, капіляр на 0,02 мл, пробірки, піпетка на 1 або 2 мл.

Реактиви: 0,2–0,8% розчини натрію хлориду.

Хід визначення. Готують розчини натрію хлориду різної концентрації (від 0,8 до 0,2%), потім до них додають по 0,02 мл крові і залишають за кімнатної температури на 1 год. Пробірки центрифугують за 3000 об./хв упродовж 10 хв і визначають початок гемолізу за легким порожевінням розчину, а повний гемоліз – за інтенсивним червонолаковим кольором розчину.

Клінічне значення. Молоді еритроцити осмотично малостійкі, а старі – стійкі. Тому визначення максимальної і мінімальної стійкості дозволяє міркувати про процеси регенерації крові. Зниження осмотичної резистентності спостерігають під час голодування, анемії, отруєнь, посилення функцій кісткового мозку.

Підвищення осмотичної стійкості еритроцитів проявляється у разі ослаблення еритропоетичної функції кісткового мозку, дії гемолітичних отрут.

Література до підрозділів 4.10–4.15: [38, С. 408–411; 40, С. 31–42; 49, С. 80–90].

4.16. Визначення кислотної резистентності еритроцитів (за Гітельзоном І.І., Терських І.А. у модифікації Москаленка В.П.)

Принцип методу полягає у фотоелектричній реєстрації зменшення кількості еритроцитів у процесі гемолізу, який розвивається під дією гемолітика в стабільних умовах. Стійкість еритроцитів визначають за часом виходу гемоглобіну з клітини.

Обладнання: центрифужні та хімічні пробірки, піпетки на 0,02, 2,0 та 10,0 мл, фотометр.

Реактиви: ізотонічний (0,85%) розчин натрію хлориду; розчин соляної кислоти (0,00005 н – для великої рогатої худоби і свиней; 0,00125 н – для собак) (концентрація HCl підібрана експериментально В.П.Москаленком).

Хід визначення. 1. Кров для досліджень відбирають у центрифужні пробірки, куди попередньо додають гепарин з розрахунку 10 МО на 10 мл кро-ві. Плазму відділяють шляхом центрифугування (1500 об/хв упродовж 20 хв).

2. Суспензію еритроцитів тричі відмивають охолодженим до 4° С (для запобігання окиснення ліпопротеїнів) 0,85%-ним розчином натрію хлориду з наступним центрифугуванням за тих же умов (*чітке дотримання цих умов дозволяє отримати однакову щільність суспензії еритроцитів і їх кількість в одиниці відібраного для дослідження об'єму залишається стабільною в усіх пробах*).

3. Суспензію еритроцитів відбирають капіляром від гемометра Салі (0,02) і переносять у пробірки, куди попередньо вносять 10 мл ізотонічного розчину натрію хлориду. Капіляр промивають у верхньому шарі розчину і вміст пробірки ретельно перемішують. При цьому отримують 0,2% суспензію еритроцитів.

4. Вимірювання оптичної щільності розчинів проводять на фотометрі за довжини хвилі 540 нм (кювети з товщиною робочого розчину 10 мм). Перед дослідженням в обидві кювети на 5–10 хв вносять розчин гемолітика з досліджуваною концентрацією. В контрольну кювету наливають 4 мл 0,85% розчину натрію хлориду, а в дослідну – 2 мл розчину гемолітика і додають 2 мл 0,2% суспензії еритроцитів. Гемолітик із суспензією еритроцитів перемішують кінчиком піпетки. Відразу після перемішування визначають екстинцію проби. Зміни екстинції записують через кожні 30 с до постійного показника (упродовж 30 с).

Різницю між початковою і кінцевою (по закінченні гемолізу) оптичною щільністю приймають за 100% і вираховують відсоток ΔE (від попереднього показника екстинції відняти наступний і прийняти його за “X”), який відображає відносний відсоток негемолізованих еритроцитів через кожні 30 с. За такого розрахунку виключається залежність результатів від кількості еритроцитів і концентрації гемоглобіну. Отримані дані зображують графічно. На осі абсцис відкладають час від 0 і кожні 30 с, ординат – відсоток гемолізу еритроцитів (рис. 4.7).

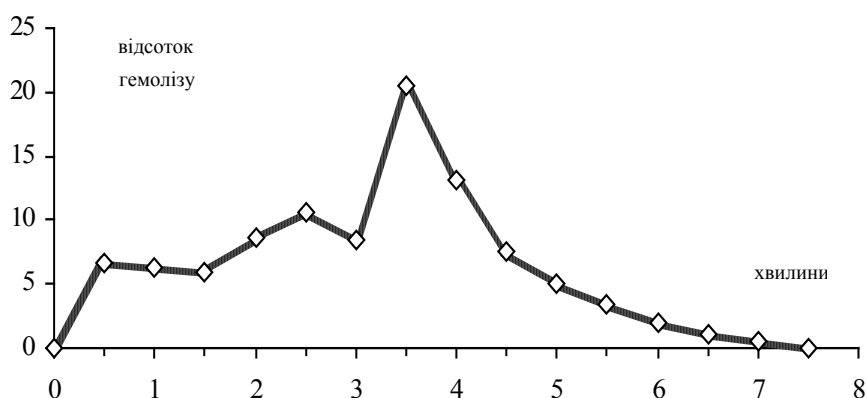


Рис. 4.7. Приклад еритрограми

Діагностичне значення. Ліва частина еритроцитограми вказує на гемоліз “старих” популяцій еритроцитів, центральна, включаючи пік, утворюється внаслідок руйнування “зрілих” та частково “молодих” клітин, права – є результатом гемолізу лише “молодих” еритроцитів. Зменшення часу гемолізу еритроцитів указує на зниження їхньої кислотної стійкості (за великої кількості “старих” і незначної – “молодих” клітин), а збільшення – на зростання резистентності еритроцитів до гемолітика (надмірна концентрація “зрілих” і “молодих” клітин).

Література: [20; 87].

4.17. Визначення популяційного (вікового) складу еритроцитів у тварин (за методом І. Сизової зі співавт., 1980)

Принцип методу полягає у розподілі різновікових популяцій еритроцитів (залежно від їхньої відносної щільності) у розчинах сахарози різної концентрації з наступною їх фотоелектричною реєстрацією.

Обладнання: пробірки центрифужні, градуйовані хімічні (на 10 мл) та Флорінського, піпетки на 0,1, 0,5, 1,0, 2,0 та 10,0 мл, скляна колонка (внутрішній діаметр 2 см), фотометр.

Реактиви: 1) ізотонічний (0,85%) розчин натрію хлориду; 2) розчини сахарози (6, 10, 14, 18, 22, 24 та 30% концентрації).

Хід визначення. 1. Кров для досліджень відбирають у центрифужні пробірки, куди попередньо додають гепарин з розрахунку 10 МО на 10 мл крові. Плазму відділяють шляхом центрифугування (1500 об/хв, 20 хв).

2. Суспензію еритроцитів тричі відмивають охолодженим до 4°С (для запобігання окисненню ліпопротеїнів) 0,85% розчином натрію хлориду з наступним центрифугуванням за тих же умов (чітке дотримання цих умов дозволяє отримати однакову щільність суспензії еритроцитів і їх кількість в одиниці відібраного для дослідження об'єму залишається стабільною в усіх пробах).

3. Суспензію еритроцитів відбирають піпеткою на 0,1 мл і переносять у пробірки Флорінського, куди попередньо вносять 0,9 мл ізотонічного розчину натрію хлориду. Піпетку промивають у верхньому шарі розчину і вміст пробірки ретельно перемішують (при цьому отримують 10% суспензію еритроцитів).

4. 0,5 мл суспензії еритроцитів вносять у колонку, яка нахилена під кутом 45° і почергово по стінці колонки нашаровують розчини сахарози (першим – найвищої концентрації, останнім – найнижчої). При цьому проходить розподіл еритроцитів у різній концентрації сахарози залежно від віку еритроцитів.

5. Колонку обережно вирівнюють під 90° так, щоб не відбулося перемішування шарів сахарози, і кожний з останніх обережно відділяють в окрему градуйовану пробірку (загалом 7). У кожену пробірку додають ізотонічний розчин натрію хлориду до загального об'єму 10 мл. Ретельно перемішують і перевіряють оптичну щільність всіх 7-ми пробірок.

6. Вимірювання оптичної щільності розчинів проводять на фотометрі за довжини хвилі 520 нм (кювети з товщиною робочого шару 10 мм). Контролем є 0,85% розчин натрію хлориду. Суму отриманих екстинцій приймають за 100%, а показник кожної пробірки – за “X” і

вираховують відсоток окремої фракції. Показники перших трьох проб (у розчинах сахарози 30, 26 і 22% концентрації) додають. Отриманий результат є відсотковим показником кількості “старих” еритроцитів. Те ж саме проводять з четвертим і п’ятим показником (18 і 14% розчини), вираховуючи концентрацію “зрілих” клітин, під час додавання відсотків шостого і сьомого результатів (10 і 6% розчини сахарози) отримують відносний показник вмісту “молодих” популяцій.

Діагностичне значення. Після виходу еритроцитів з червоного кісткового мозку у периферійну кров, вони проходять три вікові стадії: “молоді”, “зрілі” та “старі”. Це залежить від інтенсивності окиснення мембран клітин та їх антиоксидантної спроможності. Норми популяцій еритроцитів венозної крові у клінічно здорових телят 1,5–3-місячного віку наступні (у відсотках): “старі” – 9–14,5; “зрілі” – 31,5– 40,5; “молоді” – 48–58. У телят за тяжкого перебігу бронхопневмонії збільшується кількість “старих” еритроцитів як у венозній, так і артеріальній (з $14,0 \pm 0,2$ до $22,3 \pm 0,6\%$) крові, окрім того, в артеріальній крові зменшується частка “молодих” і “зрілих” еритроцитів (Розумнюк В.Т., 2002) [76].

У клінічно здорових коней частка “старих” еритроцитів становить 7,6–13,2; “зрілих” – 30,4–42,1; “молодих” – 45,3–61,5%. За анемічного синдрому відбувається руйнування “старих” форм еритроцитів, проте процеси проліферації та дозрівання еритроїдних клітин кісткового мозку гальмуються [68].

Література: [36; 68; 73; 76; 79].

4.18. Визначення білка та ліпідних компонентів у мембранах еритроцитів

Принцип полягає у відмиванні еритроцитів від плазми крові, гемолізу їх, отриманні безгемоглобінової суспензії мембран еритроцитів та ізоляції білка і ліпідних компонентів відповідними реактивами з оболонки клітин з наступним визначенням їх концентрації за допомогою фотоелектроколориметра.

Обладнання: фотометр, струшувач пробірок, водяні бані – тепла (37°C) та льодяна.

Реактиви: 1) ізотонічний (0,85%) розчин натрію хлориду; 2) буфер 1: 2,24 г Tris-HCl + 818 мг NaCl + 746 мг KCl + 6,84 г сахарози + 1 л H_2O до рН 7,4 доводимо 3н HCl (термін зберігання 2–2,5 міс. у холодильнику; 3) буфер 2: 605 мг Tris-HCl + 409 мг NaCl + 372 мг Трилону Б + 1 л H_2O_d ; до рН 7,4 доводимо 3 н HCl (термін зберігання 2–2,5 міс. у холодильнику; 4) реактив С (готується безпосередньо перед дослідженням):

24,5 мл 2% розчину Na_2CO_3 + 0,5 мл 0,5% CuSO_4 (приготовлений на 1% розчині К, Na-виннокислому – 50 мг CuSO_4 + 10 мл 1% розчину К, Na-виннокислому); 5) реактив Фоліна: у дволітрову колбу вносять 100 г вольфрамату натрію, 25 г молібдату натрію і 700 мл H_2O , після розчинення додають 50 мл 85% розчину H_3PO_4 і 100 мл концентрованої HCl . Приєднують до колби зворотний холодильник і обережно кип'ятять 10 год. Після чого додають 150 г Li_2SO_4 , 50 мл H_2O і 2–3 краплі бром, знову нагрівають (без зворотного холодильника) для видалення надлишку бром. Реактив розводять так, щоб 1 мл його був еквівалентним 9 мл 0,1 н NaOH (контролюють титруванням за знебарвленням фенолфталеїну); 6) концентрована хлоридна (соляна) кислота; 7) 4,6% розчин аскорбінової кислоти в 0,36 н H_2SO_4 (кислота має бути за Савалем і не містити фосфору – 10,1 мл концентрованої кислоти доводять до 1 л H_2O); 8) 0,9% розчин молібденового реактиву в 0,36 н H_2SO_4 ; 9) Хлороформ-метанольна суміш: 2 ч. хлороформу і 1 ч. метанолу; 10) Концентрована сульфатна (сірчана) кислота за Савалем; 11) Ваніліновий реактив: 1,25 мл ваніліну, 667 мл 0,85% ортофосфорної кислоти і доводять до 1 л H_2O (спочатку в невеликому об'ємі води розчиняють ванілін, потім додають кислоту і доводять H_2O до 1 л); 12) Реактив 1 – 0,2% розчин хлорного заліза ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) в льодяній (99,9%) оцтовій кислоті (CH_3COOH), чда; 13) Реактив 2 – концентрована сульфатна кислота, ч.

Хід визначення. Одержання суспензії мембран еритроцитів.

1. Кров для досліджень відбирають у центрифужні пробірки, куди попередньо додають гепарин з розрахунку 10 МО на 10 мл крові. Плазму відділяють шляхом центрифугування (1500 об/хв, 20 хв).

2. Суспензію еритроцитів тричі відмивають охолодженим до 4°C (для запобігання окисненню ліпопротеїнів) 0,85% розчином натрію хлориду з наступним центрифугуванням за тих же умов (чітке дотримання цих умов дозволяє отримати однакову щільність суспензії еритроцитів і їх кількість в одиниці відібраного для дослідження об'єму залишається стабільною в усіх пробах).

3. Суспензію еритроцитів відбирають піпеткою на 1 мл, переносять у пластикову пробірку і заливають 30 мл буферу 1. Для гемолізу еритроцитів проби ставлять у морозильну камеру на 30 хв. Гемолізат центрифугують за 6000 обертів, протягом 20 хв, при цьому мембрани еритроцитів осідають на дно пробірки. Надосадову рідину зливають, а мембрани ще двічі промивають буфером 1, з наступним центрифугуванням. Після цього їх заливають 30 мл буфера 2 і витримують у морозильній камері протягом 2 год (можна залишати на ніч) з наступним центрифугуванням за тих же умов. Проби знову двічі промивають буфером 1. Мембрани, які стають безколірними або злегка рожевими, суспензують (розбивають) товкачем у спеціальній пробірці з лійкою,

залишаючи мінімум буфера. Об'єм суспензії доводять до 1,5–2,0 мл ізотонічним розчином хлориду натрію.

4.18.1. Визначення білка в мембранах еритроцитів за Лоурі

До 0,1 мл суспензії мембран еритроцитів додають 0,1 мл 6% розчину NaOH і ставлять у киплячу водяну баню на 5 хвилин. У пробу додають 1,8 мл H₂O і 4 мл реактиву С, перемішують та залишають на 10 хв за кімнатної температури. Після цього додають 0,2 мл реактиву Фоліна, перемішують і через 45–50 хв визначають оптичну щільність у кюветах з товщиною робочого розчину 10 мм за довжини хвилі 620 нм проти контролю, який готують аналогічно пробам, тільки замість 0,1 мл суспензії мембран еритроцитів додають 0,1 мл H₂O. Кількість білка визначають за калібрувальним графіком за водорозчинним альбуміном крові (табл. 4.11).

Таблиця 4.11

Визначення вмісту білка у мембранах еритроцитів за Лоурі

Е	γ	Е	γ	Е	γ	Е	γ	Е	γ
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
0,105	50	0,151	77	0,189	104	0,221	131	0,252	158
0,107	51	0,152	78	0,190	105	0,222	132	0,253	159
0,110	52	0,153	79	0,191	106	0,223	133	0,254	160
0,112	53	0,155	80	0,192	107	0,224	134	0,255	161
0,114	54	0,156	81	0,193	108	0,225	135	0,257	162
0,115	55	0,157	82	0,194	109	0,226	136	0,258	163
0,117	56	0,159	83	0,196	110	0,227	137	0,259	164
0,118	57	0,160	84	0,197	111	0,228	138	0,260	165
0,120	58	0,162	85	0,198	112	0,229	139	0,261	166
0,121	59	0,163	86	0,199	113	0,230	140	0,262	167
0,123	60	0,165	87	0,200	114	0,232	141	0,263	168
0,125	61	0,167	88	0,201	115	0,233	142	0,265	169
0,127	62	0,168	89	0,202	116	0,234	143	0,266	170
0,129	63	0,169	90	0,205	117	0,235	144	0,267	171
0,130	64	0,170	91	0,206	118	0,236	145	0,268	172
0,132	65	0,171	92	0,207	119	0,237	146	0,269	173
0,133	66	0,173	93	0,208	120	0,239	147	0,270	174
0,136	67	0,175	94	0,209	121	0,240	148	0,272	175
0,138	68	0,177	95	0,210	122	0,243	149	0,273	176
0,139	69	0,178	96	0,212	123	0,245	150	0,274	177
0,140	70	0,179	97	0,213	124	0,246	151	0,275	178
0,141	71	0,180	98	0,215	125	0,247	152	0,276	179

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
0,143	72	0,183	99	0,216	126	0,248	153	0,278	180
0,145	73	0,185	100	0,217	127	0,249	154	0,279	181
0,147	74	0,186	101	0,218	128	0,249	155	0,280	182
0,149	75	0,187	102	0,219	129	0,250	156	0,281	183
0,150	76	0,188	103	0,220	130	0,251	157	0,282	184

П р и м і т к а. γ – мкг/100 мл суспензії мембран еритроцитів.

4.18.2. Визначення сумарних фосфоліпідів у мембранах еритроцитів

До 0,2 мл суспензії мембран еритроцитів додають 1 мл концентрованої хлоридної кислоти і озолують на пісочній бані протягом 5 год (має залишитись крапля кислоти). Охолоджують і додають 5 мл H_2O , 0,5 мл аскорбінової кислоти і 0,5 мл молібденового реактиву. Витримують 10 хв на водяній бані за температури 37 °С, охолоджують на льоду 10 хв і фотометрують за довжини хвилі 670 нм у кюветах з товщиною робочого шару 10 мм проти контролю, який готують аналогічно пробі, тільки без суспензії мембран еритроцитів. Стандарт готують аналогічно пробі, проте замість суспензії мембран еритроцитів вносять 0,2 мл стандартного розчину (1 ммоль фосфору в 1 л). Розрахунок вмісту сумарних фосфоліпідів проводять за формулою:

$$X(\text{ммоль/г білка мембран еритроцитів}) = \frac{E_{\text{проби}} \cdot 0,2 \cdot 1000}{E_{\text{стандарту}} \cdot \text{кількість білка у пробі } (\gamma)}$$

Екстракція ліпідів з мембран еритроцитів. 1 мл суспензії мембран еритроцитів вносять у пробірку і заливають 10 мл хлороформометанольної суміші, струшують протягом 10 хв на струшувачі пробірок. Дають відстоятись та розподілитися шарам і довгою голкою відбирають нижню (хлороформову) фракцію у колбу або широку пробірку з круглим дном. Екстракт упарюють до мінімального об'єму, додають до нього 1 мл гексану. Екстракт використовують для визначення загальних ліпідів і холестеролу.

4.18.3. Визначення загальних ліпідів у мембранах еритроцитів

У пробірці досуха упарюють 0,1 мл екстракту ліпідів, додають 1,5 мл концентрованої сульфатної кислоти (за Савалем). Гідролізують 15 хв на киплячій водяній бані та охолоджують за кімнатної температури. 0,1 мл гідролізату вносять у хімічні пробірки, додають 1,5 мл ванілінового реактиву, перемішують і залишають на 50 хвилин. Екстинцію вимірюють проти контролю (замість гідролізату беруть 0,1 мл концентрованої сульфатної кислоти після гідролізації) у кюветах з товщиною робочого шару 1 см, довжина хвилі 540 нм. Як стандарт використовують 0,02 мл стандартного розчину з тест-набору й далі готують, як і пробу.

Розрахунок вмісту загальних ліпідів проводять за формулою:

$$X(\text{г/г білка мембран еритроцитів}) = \frac{E \text{ проби} \cdot 0,16 \cdot 1000}{E \text{ стандарту} \cdot \text{кількість білка у пробі } (\gamma)}$$

4.18.4. Визначення холестеролу у мембранах еритроцитів

Упарюють 0,1 мл екстракту ліпідів мембран еритроцитів, додають 1,5 мл реактиву 1, перемішують і ставлять у льодяну баню на 5 хвилин. Потім вносять 0,3 мл реактиву 2, швидко перемішують і знову ставлять у льодяну баню на 10 хв. Аналогічно обробляють 0,1 мл стандарту (5,17 ммоль/л холестеролу) та контроль – 0,1 мл H₂O. Визначають оптичну густину проби і стандарту в кюветах з товщиною робочого шару 1 см за довжини хвилі 560 нм.

Розрахунок вмісту холестеролу проводять за формулою:

$$X(\text{ммоль/г білка мембран еритроцитів}) = \frac{E \text{ проби} \cdot 100 \cdot 1000}{E \text{ стандарту} \cdot \text{кількість білка у пробі } (\gamma) \cdot 380}$$

Діагностичне значення. Мембрана будь-якої клітини, у тому числі й еритроцита, складається з білково-ліпідного бішару, тому визначення вмісту цих компонентів є необхідним для дослідження стану еритроциту. Фосфоліпіди забезпечують негативний заряд мембран, їх проникність, можливість транспортування та процеси взаємодії різних компонентів і молекул у самій мембрані. Холестерол є важливою складовою часткою мембран еритроцитів, від якого залежить стійкість еритроцитів та насиченість їх гемоглобіном. Для підтримання структурно-функціональної цілісності еритроцитів у організмі постійно відбувається обмін

холестеролу між еритроцитами і ліпопротеїнами плазми крові. Норми вмісту ліпідних компонентів у мембранах еритроцитів клінічно здорових телят наведено у табл. 4.12.

Таблиця 4.12

Уміст ліпідних компонентів мембран еритроцитів крові клінічно здорових телят у венозній і артеріальній крові

Кров	Загальні ліпіди, г/г білка мембран еритроцитів	Холестерол	Фосфоліпіди	$\frac{\text{Холестерол}}{\text{Фосфоліпіди}}$
		ммоль/г білка суспензії мембран еритроцитів		
Венозна	1,8–2,5	0,35–0,65	0,75–1,10	0,50–0,60
Артеріальна	2,8–3,3	0,60–0,90	1,15–1,45	0,50–0,60

У телят, хворих на бронхопневмонію, вміст загальних ліпідів у мембранах зменшується, а холестеролу і фосфоліпідів зростає, відповідно, в 1,6–3,6 та 1,5–1,7 рази. Ці зміни характерні для ущільнення мембран еритроцитів та зменшення їхньої проникності [76].

Література: [16; 56; 76; 97; 98].

4.19. Визначення фосфору і 2,3-дифосфогліцерату в еритроцитах (за Дусе у модифікації Апуховської Л.І.)

Принцип полягає у неферментативному визначенні вмісту 2,3-дифосфогліцерату в суспензії еритроцитів (або цільній крові), що базується на визначенні різниці між загальним та неорганічним фосфором, яка й становить частку 2,3-дифосфогліцерату.

Обладнання: фотометр, струшувач пробірок, водяні бані – тепла (37° С) і льодяна та піщана баня.

Реактиви: 1) ізотонічний (0,85%) розчин натрію хлориду; 2) бідистильована вода (H₂O); 3) 12% розчин трихлороцтової кислоти (ТХО); 4) деревне вугілля марки *norit* А 3–4-разово обробляється кип'ятінням в 0,1 н розчині хлоридної (соляної) кислоти упродовж 20 хв з наступним промиванням водою до нейтральної реакції. Потім вугілля висушують за 93° С упродовж доби. Вугілля обробляється до одержання негативної реакції на фосфор; 5) 4,6% розчин аскорбінової кислоти в 0,36 н H₂SO₄; 6) 0,9% розчин амонію молібдату в 0,36 н H₂SO₄; 7) 0,36 н розчин сульфатної кислоти (H₂SO₄); 8) 5% розчин нітрату магнію шестиводного – Mg(NO₃)₂·6H₂O в етанолі (готують перед роботою).

Хід визначення. Отримання аліквоту.

Кров для досліджень відбирають у центрифужні пробірки, куди попередньо додають гепарин з розрахунку 10 МО на 10 мл крові. Плазму відділяють центрифугуванням (1500 об/хв, 20 хв). Суспензію еритроцитів тричі відмивають охолодженням до 4° С 0,85% розчином натрію хлориду з наступним центрифугуванням за тих же умов (чітке дотримання цих умов дозволяє отримати однакову щільність суспензії еритроцитів і їх кількість в одиниці відібраного для дослідження об'єму залишається стабільною в усіх пробах). Центрифугат обережно відбирають, а відмиті клітини використовують для дослідження.

До 0,5 мл суспензії еритроцитів додають 1 мл холодної бідистильованої води. Гемоліз проводять у холодильнику протягом 30 хв. Для осадження білка до гемолізату додають 3 мл 12% розчину трихлороцтової кислоти, інтенсивно струшують і через 10 хв центрифугують за 1500 об/хв протягом 10 хв. Надосадову рідину зливають у чисті пробірки, додають по 200 мг активованого вугілля, струшують протягом 5 хв і фільтрують крізь знезолений фільтрувальний папір, попередньо змочений 0,36н H₂SO₄. Фільтрат (*аліквот*) використовують для дослідження неорганічного та загального фосфору.

4.19.1. Визначення неорганічного фосфору

До 0,5 мл аліквоту додають послідовно 2 мл 0,36 н H₂SO₄, 0,25 мл розчину аскорбінової кислоти та 0,25 мл амонію молібдату, перемішують і ставлять на 10 хв у водяну баню за 37°

С. Охолоджують на льодяній бані 10 хв і вимірюють оптичну щільність у кюветах з товщиною робочого шару 1 см, за довжини хвилі 660 нм. Контроль – 2 мл H₂O + 3 мл ТХО + 200 мг активованого вугілля, фільтрують; далі готують, як і пробу. Показник екстинції переводять в мкг/100 мл за калібрувальним графіком (табл. 4.13).

Показник калібрувального графіка перемножують на 1,8 і отримують концентрацію неорганічного фосфору.

Таблиця 4.13

Калібрувальний графік для визначення вмісту фосфору

Е	γ	Е	γ	Е	γ	Е	γ	Е	γ
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
0,015	0,60	0,085	2,50	0,155	4,40	0,225	6,30	0,295	8,05
0,020	0,75	0,090	2,65	0,160	4,50	0,230	6,45	0,300	8,30
0,025	0,90	0,095	2,75	0,165	4,65	0,235	6,60	0,305	8,40

Закінчення табл. 4.13

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
0,030	1,00	0,100	2,90	0,170	4,75	0,240	6,75	0,310	8,55
0,035	1,20	0,105	3,05	0,175	4,90	0,245	6,775	0,315	8,65
0,040	1,25	0,110	3,15	0,180	5,05	0,250	6,80	0,320	8,80
0,045	1,45	0,115	3,30	0,185	5,20	0,255	6,85	0,325	8,95
0,050	1,55	0,120	3,45	0,190	5,35	0,260	7,00	0,330	9,05
0,055	1,75	0,125	3,60	0,195	5,45	0,265	7,15	0,335	9,15
0,060	1,80	0,130	3,75	0,200	5,575	0,270	7,30	0,340	9,30
0,065	1,95	0,135	3,85	0,205	5,675	0,275	7,45	0,345	9,45
0,070	2,05	0,140	4,00	0,210	5,85	0,280	7,60	0,350	9,60
0,075	2,20	0,145	4,10	0,215	6,00	0,285	7,75	0,355	9,75
0,080	2,35	0,150	4,25	0,220	6,15	0,290	7,90	0,360	9,90

П р и м і т к а. γ – мкг/100 мл суспензії мембран еритроцитів.

4.19.2. Визначення загального фосфору

До 0,2 мл аліквоту додають 0,5 мл нітрату магнію і озолують в гарячій піщаній бані протягом 1 год (до отримання білого осаду). Осад розчиняють у 2,5 мл 0,36 н H_2SO_4 , додають 0,25 мл розчину аскорбінової кислоти та 0,25 мл амонію молібдату, перемішують і ставлять на 10 хв у водяну баню за $37^\circ C$ для розвитку забарвлення. Вимірювання оптичної щільності та контроль аналогічні як і для визначення неорганічного фосфору. Показник екстинції переводять у мкг/100 мл за калібрувальним графіком (табл. 4.13). Показник же калібрувального графіка перемножують на 4,5, отримуючи концентрацію загального фосфору (мкмоль/мл суспензії еритроцитів).

Різниця між загальним та неорганічним фосфором буде вказувати на концентрацію 2,3-дифосфогліцерату.

Діагностичне значення. 2,3-дифосфогліцерат (2,3-ДФГ) зменшує спорідненість гемоглобіну до кисню і сприяє швидкому переходу останнього у клітини і тканини організму. Збільшення кількості 2,3-ДФГ є компенсаторним явищем за кисневого голодування організму. Більш інтенсивним переходом кисню від гемоглобіну еритроцитів до тканин організм намагається подолати стан гіпоксії. Тому, чим триваліше кисневе

голодування, тим вища активність 2,3-дифосфогліцератного шунта. У телят до місячного віку, хворих на анемію, вміст 2,3-ДФГ збільшується на 19,8–38,4% [67].

У клінічно здорових телят 1–3-місячного віку вміст фосфору та 2,3-ДФГ у венозній і артеріальній крові відрізняється (табл. 4.14).

Таблиця 4.14

Уміст загального і неорганічного фосфору та 2,3-ДФГ в еритроцитах венозної і артеріальної крові клінічно здорових телят, мкмоль/мл

Кров	Фосфор загальний	Фосфор неорганічний	2,3-ДФГ	$\frac{2,3-ДФГ \cdot 100\%}{P \text{ загальний}}$
Венозна	3,0–3,6	1,2–1,3	1,8–2,2	57–75
Артеріальна	3,8–4,6	0,9–1,1	2,9–3,5	70–82

У телят, хворих на катаральну бронхопневмонію, вміст 2,3-ДФГ збільшується у венозній крові в 1,8, артеріальній – 1,3 рази і становить, у середньому, $3,7 \pm 0,10$ і $4,3 \pm 0,11$ мкмоль/мл суспензії еритроцитів [76].

У молодняку 3–6-місячного віку вміст загального фосфору в еритроцитах становить 5–8,5; 6–12-місячного – 5–8,8 мг/100 мл ($1,62$ – $2,75$ і $1,62$ – $2,85$ мкмоль/мл), тобто менший порівняно з телятами 1–3-місячного віку. Вміст 2,3-ДФГ у цих же групах становив $0,81$ – $1,84$ і $0,97$ – $1,97$ мкмоль/мл (в середньому $1,2 \pm 0,06$ і $1,32 \pm 0,05$). У молодняку, хворого на D-гіповітаміноз, навіть за субклінічного перебігу вміст фосфору і 2,3-ДФГ зменшується, а поява типових клінічних ознак (легкий перебіг хвороби) супроводжується ще більшим зниженням цих показників: загального фосфору – в 1,5; 2,3-ДФГ – 1,6 рази. Зменшення вмісту 2,3-ДФГ зумовлено змінами стерінового складу мембран еритроцитів, порушенням їх проникності для глюкози і неорганічного фосфору, необхідних для його синтезу [1, 52, 69].

Вміст 2,3-ДФГ в еритроцитах коней різних порід значно відрізняється: в українській верховій він становить 2,8–7,5; російської рисистої – 0,2–2,2; російської ваговозної – 0,4–2,0 мкмоль/мл суспензії еритроцитів [72].

Література: [1; 13; 52; 53; 66; 67; 69; 75; 76; 9]9.

РОЗДІЛ 5

ДОСЛІДЖЕННЯ КИСЛОТНО-ОСНОВНОГО БАЛАНСУ КРОВІ

Кислотно-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 ($\text{H}_2\text{CO}_3 : \text{NaHCO}_3$).

5.1. Визначення лужного резерву крові дифузійним методом у здвоєних колбах (за Кондрахіним І.П.)

Принцип методу. В одній половині колби плазма крові обробляється сульфатною (сірчаною) кислотою, внаслідок чого виділяється вуглекислий газ, який знаходиться у бікарбонатах. Вуглекислий газ, що виділяється, поглинається розчином натрію гідроксиду, який міститься у другій половині колби. Надлишок NaOH, що не прореагував з вуглекислим газом, і частину натрію карбонату (Na_2CO_3), який утворився у процесі поглинання CO_2 , відтитрують розчином сульфатної кислоти. За часткою зв'язаного початкового NaOH визначають кількість виділеного з плазми крові CO_2 , яка еквівалентна вмісту гідрокарбонатів (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 сульфатної кислоти (готують із фіксаналу); 2) 0,02 н (0,01 моль/л) (точно) розчин сульфатної кислоти (готують із 0,1 н розчину сульфатної кислоти); 3) 0,1 н розчин натрію гідроксиду (гідроокису), чда; 4) 0,02 н (0,02 моль/л) розчин натрію гідроксиду (готують із 0,1 н (0,1 моль/л) розчину NaOH). Титр цього розчину перевіряють перед дослідженням і доводять до потрібної величини; 5) 5% розчин сульфатної кислоти, хч, чда; 6) 1% спиртовий розчин фенолфталеїну, чда.

Похибка методу $\pm 3\%$.

Хід визначення. У центрифужні пробірки вносять 0,5–1 мл вазелінового масла, 1–2 краплі 1% 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 за температури +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 з кожної пари здвоєних колб, по чергово 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 по чергово 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 по чергово вносять із піпетки (не видуваючи) по 1 мл 5% розчину сульфатної 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 по чергово відкривають колбу, де знаходиться розчин натрію гідроксиду, вносять 1–2 краплі розчину фенолфталеїну і титрують із мікробюретки на 2 мл 0,02 н розчином сульфатної кислоти до повного знебарвлення розчину. Титрування дослідних і контрольних проб проводять з однаковою швидкістю.

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

$$X \text{ об\% } CO_2 = \frac{(V_k - V_n) \times 0,448}{V_{пл}} \times 100; \text{ або } (V_k - V_n) \times 89,6,$$

де V_k – кількість 0,02 н розчину сульфатної кислоти (мл), яка використана на титрування контролю; V_n – кількість 0,02 н розчину сульфатної кислоти (мл), яка використана на титрування дослідного зразка; $V_{пл}$ – кількість плазми крові у мл (0,5 мл); 0,448 – коефіцієнт перерахунку 0,02 н розчину NaOH на CO_2 в умовах цієї реакції; 100 – коефіцієнт для перерахунку результатів аналізу на 100 мл плазми крові.

Клінічне значення. Норми лужного резерву в плазмі крові тварин наведено у табл. 5.1.

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. Якщо концентрація іонів

водню знижується, а величина рН і лужний резерв крові підвищуються, 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 здебільшого вони є змішаними: метаболічний і респіраторний ацидоз; метаболічний і респіраторний алкалоз.

Таблиця 5.1

Норми лужного резерву в плазмі крові тварин

Вид тварин	Лужний резерв, об % CO ₂
Велика рогата худоба	46–66
Вівці	48–60
Свині	45–55
Коні	50–65
Кури	48–55

За ступенем компенсації розрізняють *компенсовані* (величина рН крові не змінюється) та *некомпенсовані* (величина рН крові змінюється) форми. У практиці ветеринарної медицини найчастіше реєструють *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 легкокорозчинних 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 кетонів тіл і розвитком метаболічного ацидозу (*кетонацидоз*).

Компенсований ацидоз розвивається й тоді, коли тваринам довго не надають активний моціон, внаслідок чого в організмі нагромаджуються недоокиснені продукти обміну речовин, органічні кислоти, кетонів 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 за цих хвороб різний. Так, у разі діареї молодняку важливе значення має виведення з організму великої кількості бікарбонатів, дегідратація, порушення кровообігу і зумовлена цим гіпоксія, голодування. Внаслідок порушення постачання тканин киснем у разі захворювання легень і серця посилюється окиснення глюкози анаеробним шляхом, і в організмі накопичується молочна кислота, вміст якої визначає величину ацидозу (*лактоацидоз*).

У разі захворювань 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).

Окрім метаболічного ацидозу, можуть розвиватися респіраторний ацидоз, метаболічний і респіраторний алкалоз.

Респіраторний ацидоз розвивається за надлишку в організмі CO_2 і підвищення pCO_2 (гіперкапнія) внаслідок зниження легеневої вентиляції, що спостерігається в разі бронхіту і пневмоній, альвеолярної емфіземи, ателектази і набряку легень, злоякісних пухлин, ексудативного плевриту, серцево-судинної недостатності, підвищення внутрішньочеревного тиску (тимпанія рубця, гостре розширення шлунка, метеоризм кишечника). Гіперкапнія зумовлює розвиток гіпоксії, що спричиняє накопичення кислих метаболітів, тобто до респіраторного ацидозу приєднується метаболічний і розвивається *змішаний ацидоз*.

Метаболічний алкалоз розвивається за накопичення в організмі основ, надмірного виведення нирками H^+ . У жуйних він виникає після згодовування надлишкової кількості кормів, багатих на легкоферментований протеїн, зміщенні сичуга, у тварин з однокамерним шлунком – під час блювання внаслідок втрати хлоридної (соляної) кислоти.

Респіраторний алкалоз розвивається за надмірного виведення з організму CO_2 (гіпокапнія), що виникає внаслідок гіпервентиляції легень, яка спостерігається за безпосереднього впливу на дихальний центр різних токсичних продуктів.

Література: [12. С. 105–119; 38. С. 413–417; 60. С. 66–69].

РОЗДІЛ 6

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ ОБМІНУ БІЛКІВ

Для оцінювання стану білкового обміну визначають уміст загального білка та його фракцій у сироватці крові, сечовини, креатиніну і сечової кислоти. Досить показовими є колоїдно-осадові проби.

6.1. Визначення загального білка в сироватці крові рефрактометричним методом

Принцип методу. В основі методу – визначення коефіцієнта заломлення світла досліджуваною речовиною. У сироватці крові величина рефракції у першу чергу залежить від кількості білка.

Реактив: суміш етилового спирту з ефіром 1:1.

Обладнання: рефрактометри РФ-4546. УРК, Rb та ін.

Хід визначення. На початку 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 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 цифрами шкали рефрактометра за таблицею визначають кількість загального білка (табл. 6.1).

Таблиця 6.1

Визначення кількості білка в сироватці крові (г/л) за коефіцієнтом заломлення світла за 20° С на рефрактометрі

Показник рефрактометра	Кількість білка	Показник рефрактометра	Кількість білка	Показник рефрактометра	Кількість білка	Показник рефрактометра	Кількість білка
1	2	3	4	5	6	7	8
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	1,3510	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

Закінчення табл. 6.1

1	2	3	4	5	6	7	8
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	1,3451	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

Література: [4, С. 8–9 та 97; 51; 60, С. 89-91; 63, С. 3–4; 88].

6.2. Визначення загального білка в сироватці крові за біуретовою реакцією

Принцип методу. Білки реагують у лужному середовищі з міді сульфатом, утворюючи сполуки, забарвлені у фіолетовий колір.

Обладнання: фотоелектроколориметр, мірні колби, піпетки.

Реактиви: 1) 0,9% розчин натрію хлориду (ч.д.а.; х.ч.); 2) 0,2 н розчин натрію гідроксиду (ч.д.а.; х.ч.), вільного від вуглекислого газу (готується на прокип'яченій дистильованій воді); 3) 0,5% розчин калію йодиду (ч.д.а.; х.ч.) у 0,2 н розчині натрію гідроксиду. Реактив стабільний упродовж двох тижнів за зберігання в посуді з темного скла; 4) натрій-калій виннокислий 4-водний (сегнетова сіль; ч.д.а.); 5) міді сульфат 5-водний (ч.д.а. або х.ч.); 6) біуретовий реактив основний. 4,5 г

сегнетової солі ($\text{KNaC}_6\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$) розчиняють у мірній колбі на 100 мл у 40 мл 0,2 н розчину натрію гідроксиду, після розведення додають 1,5 г міді сульфату і 0,5 г калію йодиду. Перемішують до повного розчинення і доводять до 100 мл 0,2 н розчином натрію гідроксиду. Зберігають у посуді з темного скла у холодильнику. Розчин стійкий; 7) робочий розчин біуретового реактиву. 20 мл основного біуретового реактиву змішують з 80 мл розчину калію йодиду. Зберігають у темній посудині в холодильнику не більше 2 тижнів; 8) калібрувальний розчин альбуміну. У пробірку вносять 1 г кристалічного сироваткового альбуміну (із сироватки людини або бичка), розчиняють в 9 мл 0,9% розчину натрію хлориду (10% розчин). 1 мл розчину містить 0,1 г білка.

Хід визначення. До 0,1 мл сироватки крові додають 5 мл робочого розчину біуретового реактиву, змішують, уникаючи утворення піни. Через 30 хв (і не пізніше, ніж через 1 год) вимірюють оптичну густину на фотоелектроколориметрі в кюветі з товщиною робочого шару 1 см за довжини хвилі 540–560 нм (зелений світлофільтр) проти контролю (5 мл робочого розчину біуретового реактиву і 0,1 мл 0,9% розчину натрію хлориду).

Розрахунок виконують за калібрувальним графіком. Для цього з основного 10% розчину альбуміну готують робочі калібрувальні розчини (табл. 6.2).

Таблиця 6.2

Приготування робочих калібрувальних розчинів білка

№ пробірки	Основний розчин альбуміну, мл	0,9% розчин натрію хлориду	Концентрація білка, г/л
1	0,4	0,6	40
2	0,6	0,4	60
3	0,7	0,3	70
4	0,8	0,2	80
5	1,0	–	100

З кожної пробірки беруть по 0,1 мл розчину білка, додають 5 мл робочого біуретового реактиву. Через 30 хв вимірюють екстинцію проти контролю. Будують калібрувальний графік, який періодично перевіряють.

- П р и м і т к и:**
1. Якщо вміст білка в сироватці крові більший за 100 г/л, то сироватку розводять 0,9% розчином натрію хлориду 1:1 і одержаний в реакції результат перемножують на 2.
 2. Всі реактиви готують на бідистильованій або прокип'яченій дистильованій воді.
 3. Використовують реактиви ч.д.а. або х.ч.

НВФ «Сімко Лтд» випускає набір реактивів для визначення вмісту загального білка біуретовим методом.

Реактиви: реагент 1 – 100 мл; реагент 2 – 100 мл; стандартний розчин білка 90 мг/мл.

Робочий реагент готується залежно від кількості проб. Наприклад, на 15–16 проб беруть 10 мл реагенту 1, додають приблизно 50 мл дистильованої води, 10 мл реагенту 2 і доводять дистильованою водою до 100 мл, добре перемішують.

Хід визначення. До 0,1 мл сироватки крові додають 5 мл робочого реагенту, витримують 30 хв за кімнатної температури. Колориметрію виконують за довжини хвилі 540 нм у кюветі з товщиною робочого шару 1 см проти контролю (0,1 мл дистильованої води і 5 мл робочого реагенту). Паралельно аналогічним чином виконують дослідження з стандартним розчином білка (90 мг/мл).

Розрахунки проводять за формулою:

$$\text{Концентрація білка (мг/мл)} = (E_{\text{досл.}} : E_{\text{ст.}}) \times 90,$$

де $E_{\text{досл.}}$ і $E_{\text{ст.}}$ – екстинція дослідної і стандартної проб.

Діагностичне значення. Норми вмісту загального білка в сироватці крові наведено в табл. 6.3.

Таблиця 6.3

Уміст загального білка і білкових фракцій у сироватці крові тварин

Вид тварин	Загальний білок, г/л	Білкові фракції, у відсотках			
		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	60–80	45–58	10–16	20–25	10–14
Кури	43–60	31–35	17–19	11–13	30–35

Зниження вмісту загального білка в сироватці крові – *гіпопротеїнемія* – спостерігається за недостатнього надходження білків в організм, зниження секреторної функції шлунка, кишечника, підшлункової залози, порушення синтезу білка в печінці за її хвороб (гепатит, гепатоз, цироз), у разі втрати білків із сечею внаслідок захворювань нирок (нефроз, гломерулонефрит), кровотеч, утворення ексудатів, трансудатів, злоякісних пухлин та ін.

Підвищення вмісту загального білка – *гіперпротеїнемія*. Вона може бути *відносною* – у разі згущення крові внаслідок втрати рідини під час зневоднення та *абсолютною* – за надмірного згодовування кормів, багатих

на протеїн; гепатиту, гепатодистрофії, хронічних інфекцій, а також внаслідок появи патологічних білків – парапротеїнів.

Література: [4, С. 8–10; 21, С. 165–167; 22, С. 188–190; 37, С. 186–187; 60, С. 91–94; 63, С. 3–7].

6.3. Визначення білкових фракцій у сироватці 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 під час ураження органів, де синтезуються білки.

Найчастіше 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, хвороб печінки (гепатит, гепатоз, абсцеси, цироз і пухлини), а також різних хвороб, коли настає вторинне ураження печінки (пневмонії, кетоз, перикардит, міокардоз, лейкоз, туберкульоз, сальмонельоз, колібактеріоз та ін.). Гіпоальбумінемія є типовою ознакою нефротичного синдрому і гломерулонефриту.

Збільшення кількості альбумінів буває рідко, переважно за патологічних станів, що супроводжуються зневодненням. Зміни кількості альбумінів порушують їх співвідношення з глобулінами (змінюється альбуміно-глобуліновий коефіцієнт, який у здорових сільськогосподарських тварин коливається у межах від 0,8 до 1, у собак – від 0,71 до 1,28).

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

Збільшення кількості *бета-глобулінів* спостерігається у разі хронічних інфекцій, хвороб нирок (нефроз, нефрит), цирозу печінки. До складу фракції бета-глобулінів входить фібриноген, підвищення вмісту якого буває за катаральної бронхопневмонії і крупозної пневмонії, лейкозу, септичного ендокардиту, а зниження – за хвороб 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, за хронічних кровотеч, ентеритів, нефрозів і захворювань, які супроводжуються ураженням імунної системи (мієлома, лімфолейкоз, хвороба Гамборо).

Гіпергаммаглобулінемія спостерігається під час усіх імунологічних реакцій, які супроводжуються посиленням синтезом глобулінів (вакцинації), і зумовлена підвищенням вмісту імуноглобулінів майже всіх класів та неспецифічних антитіл, за багатьох бактеріальних інфекцій (стрепто-, стафіло- і пневмококових), хронічного гепатиту, цирозу печінки, деяких паразитарних хвороб.

Для визначення білкових фракцій у сироватці крові використовують методи згортання білків розчинами солей різної концентрації, електрофоретичні, імуноелектрофоретичні, фільтрації через гелі. Електрофорез білків виконують на хроматографічному папері, ацетат-целюлозній плівці, крохмальному або агаровому гелі. Для виконання цих методів необхідні дефіцитні реактиви і спеціальне обладнання.

Література: [12, С. 69–75; 38, С. 417–420].

6.3.1. 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 гідроксид (NaOH), хч, чда;

2) калій фосфорнокислий однозаміщений (KН₂PO₄), хч, чда.

Приготування розчинів. 1. Основний фосфатний розчин: у 400 мл дистильованої води (мірна колба на 500 мл) розчиняють 33,5 г натрію гідроксиду (NaOH). Після охолодження до кімнатної температури в колбу вносять 226,8 г калію фосфорнокислого однозаміщеного (KН₂PO₄), 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, у 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. 6.4). 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.

Вміст пробірок ретельно, але обережно перемішують, не допускаючи утворення піни або бульбашок повітря. Через 15 хв визначають оптичну густину (E) вмісту пробірок на фотоелектроколориметрі за довжини 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).

Таблиця 6.4

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

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 $\pm 4\%$.

Література: [4, С. 10–12; 21, С. 176–177; 22, С. 197–198; 37, С. 186–187; 60, С. 91–94; 63, С. 7–9].

6.3.2. Визначення альбуміну в сироватці крові

Принцип методу. Альбумін утворює у слабнокислому середовищі з індикатором бромкрезоловим зеленим сполуку, інтенсивність забарвлення якої пропорційна вмісту альбуміну в сироватці крові.

Реактиви: набір реактивів ТОВ НВП «Філісіт-Діагностика»:

1) реагент на альбумін (бромкрезоловий зелений, детергент і ацетатний буфер);

2) ліофілізований альбумін для приготування 2 мл калібрувального розчину (50 ± 2 г/л) або 2 мл готового розчину альбуміну (50 ± 2 г/л).

Обладнання. Фотоелектроколориметр; колба мірна на 1 л; пробірки місткістю 20 мл; піпетки місткістю 0,1 і 5 мл.

Приготування робочих розчинів

1. *Робочий розчин індикатора.* Вміст флакона з реагентом на альбумін переносять у мірну колбу об'ємом 1 л і доводять до мітки дистильованою водою. Реактив стабільний упродовж 1 року за температури зберігання від 0 до $+8^\circ \text{C}$.

2. *Калібрувальний розчин альбуміну (50 ± 2 г/л).* У флакон, що містить ліофілізований альбумін, обережно добавляють 1,9 мл 0.9% розчину натрію хлориду. Флакон закривають і легкими обертальними рухами руки перемішують його вміст до повного розчинення альбуміну, не допускаючи утворення піни. Флакони не збовтувати. Зберігати за температури від $+2$ до $+8^\circ \text{C}$.

Хід визначення. До 0,04 мл дослідної сироватки або калібрувального розчину добавляють 4 мл робочого реактиву. Змішують, витримують 5 хв за кімнатної температури (від $+18$ до $+25^\circ \text{C}$). Вимірюють оптичну густину (Е) дослідної та калібрувальної проб проти контролю за довжини хвилі 630 нм у кюветах з шириною робочого шару 1 см. Контрольну пробу готують наступним чином: до 0,04 мл ізотонічного розчину натрію хлориду добавляють 4 мл робочого розчину.

Розрахунок вмісту альбуміну проводять за формулою:

$$A = \frac{E_{\text{досл}}}{E_{\text{калібр}}} \times 50,$$

де A – вміст альбуміну в сироватці крові, г/л; $E_{\text{досл}}$ і $E_{\text{калібр}}$ – оптична щільність дослідної і калібрувальної проб; 50 – концентрація альбуміну в калібрувальному розчині, г/л.

- П р и м і т к и:** 1. Під час роботи з мутними і жовтяничними сироватками вимірювання контролюють сліпим сироватковим дослідом. Для цього в такі сироватки замість робочого розчину індикатора додають дистильовану воду, а одержану екстинцію віднімають від $E_{\text{досл}}$.
2. Дотримуватися однакової температури усіх розчинів.

Література: [21, С. 177–178; 22, С. 198–199; 60, С. 94–95].

6.4. Визначення загальної кількості імуноглобулінів

Білки, що мають молекулярну будову, яка типова для антитіл, незалежно від їх біохімічної та фізико-хімічної структур, називають *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 у перші дні життя забезпечується за рахунок імуноглобулінів, що надходять до організму з молозивом (пасивний, колостральний імунітет), тому у сироватці крові до його випоювання їх мало (до 2 г/л). У сироватці крові дводенних телят має бути не менше 18 г/л імуноглобулінів (оптимальна величина – 20–28 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, яка 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 1–2 годин 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.

6.4.1. Визначення загальної кількості імуноглобулінів у сироватці крові за реакцією з натрію сульфідом

Принцип методу. У процесі взаємодії сироватки крові, яка містить імуноглобуліни, з розчином натрію сульфідату (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 на 5 мм.

Реактиви: натрію сульфід безводний (Na_2SO_3), ч.

Хід визначення. У дві пробірки вносять по 3,8 мл 18% розчину натрію сульфідату і додають по 0,1 мл дослідної сироватки крові. Через 10–15 хв вміст пробірок фотометрують на КФК-2 або КФК-3 за довжини хвилі 400 ± 5 нм у кюветі з робочою шириною 5 мм. Контролем є 18% розчин натрію сульфідату.

Із отриманих показників оптичної густини двох пробірок визначають середній і результат записують згідно з калібрувальною таблицею (табл. 6.5). Якщо оптична густина розчину вища за 1,3–1,5, то сироватку крові потрібно 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. 6.5) [4, С. 13-14].

Діагностичне значення. У сироватці крові новонароджених телят на 36–48 годину життя має бути 18–28, ягнят – 12,3–26,8 мг/мл імуноглобулінів (Федоров Ю.Н., 1985). Менша кількість характеризує імунодефіцитний стан, причиною якого є: а) пізнє випоювання молозива; б) недостатня кількість випоєного молозива; в) низький вміст імуноглобулінів у молозиві (менше 60 г/л; г) порушена структура слизової

оболонки кишечника внаслідок дефіциту протеїну в раціоні матері, що зменшує абсорбцію імуноглобулінів.

Таблиця 6.5

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
0,10	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	1,00	22,3
0,135	3,37	0,30	6,80	1,05	23,4
0,14	3,60	0,35	8,00	1,10	24,6
0,145	3,70	0,40	9,00	1,15	25,8
0,15	3,80	0,45	10,00	1,20	26,8
0,155	3,93	0,50	11,4	1,25	28,0
0,16	4,06	0,55	12,4	1,30	29,0
0,165	4,17	0,60	13,6	1,35	30,1
0,17	4,28	0,65	14,6	1,40	31,2
0,175	4,39	0,70	15,8	1,45	32,3
0,180	4,50	0,75	16,8	1,50	33,4

Література: [4, С. 12–14; 60, С. 95–96].

6.4.2. Визначення вмісту імуноглобулінів у сироватці крові за реакцією з цинку сульфатом (цинк-сульфатний тест – ЦСТ)

Принцип методу. Під час додавання цинку сульфату до розчину, в якому містяться імуноглобуліни, розчин мутніє. Ступінь помутніння пропорційний вмісту імуноглобулінів.

Обладнання: фотоелектроколориметр; пробірки хімічні на 5 і 10 мл; піпетки на 1, 5 і 10 мл; мірні колби на 100 мл.

Реактиви: 1) 20,8 мг/100 мл розчин цинку сульфату (х. ч.). Готують у день дослідження на прокип'яченій дистильованій воді; 2) барію сульфат – стандарт мутності: 3 мл 1,15% розчину барію сульфату (х. ч.) вносять у мірну колбу на 100 мл і доводять до мітки 0,2% розчином сульфатної (сірчаної) кислоти. Одержаний розчин відповідає 20 одиницям ЦСТ за ступенем мутності. Для приготування стандарту 40 од. мутності в мірну колбу на 100 мл вносять 6 мл 1,15% розчину барію сульфату, а для стандарту з 10 одиницями мутності – 1,5 мл. Потім доповнюють 0,2% розчином сульфатної кислоти у мірній колбі на 100 мл. За одержаними стандартними розчинами мутності (10, 20 і 40 одиниць) будують калібрувальний графік.

Хід визначення. У дослідну пробірку вносять 6 мл 20,8 мг 5% розчину цинку сульфату, у контрольну – 6 мл дистильованої води. В обидві пробірки додають по 0,1 мл сироватки крові і витримують 1 год за кімнатної температури, упродовж цього часу вміст пробірок тричі перемішують. Фотометрують у кюветі з товщиною робочого шару 1 см за довжини хвилі 670 нм (червоний світлофільтр) проти контролю. За одержаними результатами екстинції за калібрувальним графіком знаходять значення одиниць ЦСТ. Під час перерахунку вмісту імуноглобулінів з одиниць мутності у мг/мл користуються таблицею 6.6.

Таблиця 6.6

Перерахунок одиниць мутності ЦСТ у мг/мл

ЦСТ, од	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
10	8,53	9,60	10,67	11,74	12,81	13,88	14,95	16,02	17,09	19,23
20	20,30	21,37	22,44	23,51	24,56	25,65	26,72	27,79	28,86	29,93
30	31,00	32,07	33,14	34,21	35,28	26,35	37,42	38,49	39,56	40,63
40	41,70	42,77	43,83	44,91	45,98	47,05	48,12	49,19	50,26	51,32

П р и м і т к и: 1. Сироватка крові не має містити слідів гемолізу.
2. Метод переважно використовується для визначення вмісту імуноглобулінів у сироватці крові.

Література: [60, С. 96–97; 63, С. 10–11].

6.5. Колоїдно-осадові проби

Для оцінювання функції печінки та інших патологічних станів організму широко використовують 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 альбумінами та глобулінами сироватки крові.

Сулемова проба (за Грінстедом)

Принцип методу. Сулема у 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) 0,85% розчин натрію хлориду, хч; 2) 0,1% розчин сулеми, ч. (отримують із кристалічної сулеми). (100 мг ртуті двохлоридної розчиняють водою у мірній колбі на 100 мл). Цей розчин використовують для дослідження сироватки крові великої рогатої худоби. У разі дослідження сироватки крові курей і коней розчиняють 600 мг сулеми у колбі на 100 мл (0,6% розчин) (Кондрахин І.П., 2004) [41].

Хід визначення. У пробірку вносять 0,5 мл свіжої негемолізованої сироватки крові і 1 мл 0,85% розчину натрію хлориду. За допомогою мікробюретки або піпетки краплями додають 0,1% розчин сулеми до появи первинного помутніння, а в подальшому – краплями (з проміжком 20–30 с) до стійкого помутніння. Результат реакції оцінюють за кількістю витраченого розчину (у мл). Проба є дуже чутливою.

Діагностичне значення. В нормі у клінічно здорових корів і нетелей на титрування сироватки крові витрачається не менше 1,6 мл 0,1% розчину сулеми (1,6–2,6 мл); у коней і собак – 1,6–2,6 мл 0,6% розчину. Зниження показника (менше 1,6 мл) спостерігається за гепатодистрофією, гепатиту та цирозу 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).
Примітка. 0,6% концентрація ртуті двохлоридної для дослідження сироватки крові коней і курей підібрана дослідним шляхом професором І.П. Кондрахином [41].

Література: [4, С. 15; 41, С. 53–55; 60, С. 114].

Цинк-сульфатна осадово-колоїдна печінкова проба (за Кондрахином І.П.)

Принцип методу. Цинку сульфат спричиняє преципітацію білків сироватки крові та її помутніння. Швидкість цього процесу залежить від вмісту в ній альбумінів і глобулінів, а також патологічних білків-парапротеїнів: чим менше альбумінів і більше глобулінів або парапротеїнів, тим швидше відбувається коагуляція білків та помутніння сироватки крові.

Реактиви: 1) цинку сульфат 7-водний ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, ч.д.а. або х.ч.): а) під час дослідження сироватки крові дорослої великої рогатої худоби готують 55 мг% (1,91 ммоль/л) розчин цинку сульфату – 55 мг речовини розчиняють водою в мірній колбі на 100 мл; б) у ході дослідження сироватки крові свиней готують 100 мг% розчин цинку сульфату; в) у ході дослідження сироватки крові курей-несучок – 110 мг в 100 мл; г) під час

дослідження сироватки крові коней готують 125 мг% розчин: 125 мг $ZnSO_4$ розчиняють водою в мірній колбі на 100 мл.

Обладнання: стаканчики на 50 мл, мікробюретки на 2 або 5 мл; піпетки; мірні колби.

Хід визначення. У стаканчик вносять 1 мл 0,9% розчину натрію хлориду і 0,5 мл сироватки крові, змішують і повільно титрують краплями 55 мг%, або 100 мг%, або 125 мг% розчином цинку сульфату до тих пір, поки через вертикальний шар рідини не можна буде прочитати газетний шрифт.

Діагностичне значення. У клінічно здорових тварин на титрування сироватки крові витрачається 1,6–2,6 мл розчину цинку сульфату. Показник менше 1,6 мл свідчить про порушення білоксинтезувальної функції печінки.

Література: [60, С. 115].

Цинк-сульфатний бронхолегеневий тест (за Кондрахіним І.П.)

Принцип методу. Метод ґрунтується на виявленні диспротеїнемії (гіперглобулінемії і гіпоальбумінемії), яка розвивається вторинно під час захворювання молодняку на бронхопневмонію (пневмонію). Це досягається додаванням до сироватки крові розчину цинку сульфату, який спричиняє преципітацію білків. За більш тяжкого перебігу пневмонії більше виражена диспротеїнемія, тому за меншої кількості розчину цинку сульфату відбувається преципітація і помутніння сироватки крові.

Реактиви: цинку сульфат 7-водний ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, ч.д.а. або х.ч.), 750 мг розчиняють у мірній колбі на 1 л (2,613 ммоль/л). Розчин стабільний упродовж 2 міс.; натрію хлорид ($NaCl$, ч.д.а. або х.ч.), 0,9% (154 ммоль/л) розчин, 9 г натрію хлориду розчиняють у мірній колбі на 1 л.

Обладнання: скляні стаканчики на 50 мл, мікробюретка на 2 або 5 мл; піпетки; мірні колби.

П р и м і т к а. Зразки крові для аналізу не повинні містити слідів гемолізу.

Аналіз проводять упродовж двох діб після взяття зразків крові.

Хід визначення. У стаканчик почергово вносять 1 мл 0,9% розчину натрію хлориду, 0,5 мл сироватки крові, змішують. Із мікробюретки повільно краплями з інтервалом 1–3 с у стаканчик додають 75 мг% розчин цинку сульфату до помутніння вмісту, коли через вертикальний шар рідини не можна прочитати газетний текст.

Клінічне значення. У клінічно здорових телят віком 1–3 міс. на титрування сироватки крові витрачається 1,7–2,7 мл розчину цинку

сульфату, за легкого і середнього ступеня бронхопневмонії – 1,5–1,3 мл, за тяжкого перебігу хвороби – 1,2 мл і менше. За показника бронхолегеневого тесту 0,9–0,8 мл і менше прогноз несприятливий. Збільшення показника свідчить про позитивний лікувальний ефект.

Література: [60, С. 115–117].

***Удосконалений цинк-сульфатний бронхо-
легеневий тест (автор – професор Кондрахін І.П.)
у модифікації В.І. Левченка та А.В. Розумнюка***

Принцип методу. Метод ґрунтується на виявленні диспротеїнемії (зменшення альбуміно-глобулінового коефіцієнта), яка спостерігається за бронхопневмонії (пневмонії).

Підготовка проб крові до аналізу. У телят кров беруть з яремної вени у сухі хімічні пробірки, дотримуючись правил асептики та антисептики. Для запобігання гемолізу кров у пробірки набирають по стінці та доставляють у лабораторію в день взяття. Одразу після взяття пробірки з кров'ю необхідно поставити у теплу воду (37–38° С) на 1–2 год. Якщо ретракція не настала, тонкою скляною паличкою відокремлюють згусток від стінки пробірки і кров ставлять у термостат за температури 37–38° С на 1–2 год. Потім сироватку зливають у центрифужні пробірки і центрифугують 15 хв за 3000 об./хв. Для дослідження придатна лише сироватка без гемолізу. Аналіз слід проводити не пізніше трьох днів після взяття крові.

Реактиви: 0,85% розчин натрію хлориду (хч); 75 мг цинку сульфату 7-водного (хч) розчиняють у 100 мл дистильованої води (0,075% розчин). Зберігають у склянці з притертою пробкою до 30 діб.

Обладнання: хімічні пробірки, піпетки, КФК–3.

Хід визначення. У пробірку спочатку вливають 2,0 мл 0,85% розчину натрію хлориду, а потім 1,0 мл сироватки крові і перемішують. Додають 2,0 мл 0,075% розчину цинку сульфату. Перемішують і через 15 хв фотометрують за довжини хвилі 600 нм у кюветах з товщиною робочого шару 10,0 мм. Контролем є 0,85% розчин натрію хлориду. Результати оцінюють за екстинцією. Проте для полегшення сприйняття результатів отримані показники переведено в аналогічне значення витраченого розчину цинку сульфату в мілілітрах (за Кондрахіним І.П.) згідно з даними табл. 6.7 і 6.8).

Таблиця 6.7

Залежність екстинції проби від кількості витраченого розчину цинку сульфату

ZnSO ₄ ·7H ₂ O, мл	Екстинція	ZnSO ₄ ·7H ₂ O, мл	Екстинція	ZnSO ₄ ·7H ₂ O, мл	Екстинція
2,40	1,460	1,75	1,860	1,10	2,500
2,35	1,480	1,70	1,890	1,05	2,540
2,30	1,520	1,65	1,980	1,00	2,575
2,25	1,550	1,60	2,235	0,95	2,600
2,20	1,590	1,55	2,255	0,90	2,630
2,15	1,615	1,50	2,270	0,85	2,655
2,10	1,655	1,45	2,295	0,80	2,685
2,05	1,670	1,40	2,325	0,75	2,710
2,00	1,720	1,35	2,350	0,70	2,735
1,95	1,745	1,30	2,375	0,65	2,765
1,90	1,777	1,25	2,400	0,60	2,800
1,85	1,800	1,20	2,435	–	–
1,80	1,830	1,15	2,470	–	–

Таблиця 6.8

Прогнозування перебігу бронхопневмонії у телят

Клінічний стан	Показники приладу, екстинція (КФК–3)	Кількість розчину цинку сульфату, мл
Клінічно здорові	2,235 і менше	1,6–1,8 і більше
Легкий та середній перебіг хвороби	2,270–2,375	1,5–1,3
Тяжкий перебіг хвороби	2,435 і більше	1,2 і менше
Прогноз несприятливий	2,630 і більше	0,9–0,8 і менше

Клінічне значення. Запалення легень супроводжується диспротеїнемією, яка проявляється зменшенням альбуміно-глобулінового коефіцієнта сироватки крові. Чим тяжчий перебіг запального процесу в легенях, тим більше виражені диспротеїнемія і помутніння проби (осадження грубодисперсних білків-глобулінів).

Зниження екстинції біохімічного тесту свідчить про позитивний лікувальний ефект (тварина видужує), підвищення – про неефективність лікування, ускладнення патологічного процесу. Якщо патологічний процес у

легенях суттєво не змінюється, показник тесту залишається на тому самому рівні (рис. 6.1).

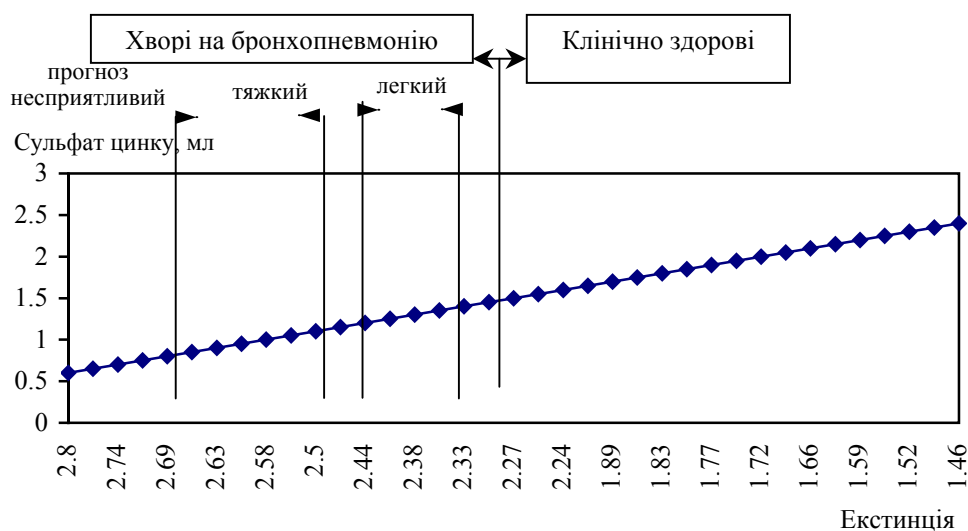


Рис. 6.1. Зміна оптичної густини проби залежно від перебігу захворювання

Література: [58, С. 113–117; 60, С. 115–117].

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

Осадова проба з розчином міді сульфату є показовою не тільки якісно, але й кількісно (за кількістю витраченого розчину).

Обладнання: мікробюретки, пробірки.

Реактиви: 1% 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% 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 помутніння, яке не зникає у ході перемішування. Для стійкого помутніння сироватки крові великої рогатої худоби потрібно 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 в результаті додавання 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 (+++).

Література: [4, С. 15–16; 74, С. 139–140].

Формолова проба

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

Обладнання: пробірки, піпетки, гумові пробки.

Реактиви: 40% 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 за кімнатної температури 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 (++++).

Література: [4, С. 16].

Проба Вельмана (у модифікації Тейфля)

Принцип методу. Під час додавання 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: розчин кальцію хлориду – 5 г/л. Готують 20-разовим розбавленням 10‰ розчину в ампулах (100 г/л).

Хід визначення. У пробірці змішують 0,1 мл сироватки крові з 4,9 мл води, перемішують і додають 0,1 мл 0,5% розчину кальцію хлориду. Вміст пробірки струшують і нагрівають до кипіння. Пробірку охолоджують і розглядають проти світла. За відсутності пластівців у пробірку додають ще 0,1 мл 0,5% 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% розчину кальцію хлориду. У нормі коагуляція білків сироватки крові настає у разі додавання 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 α_1 - та α_2 -глобулінів і спостерігається у разі захворювань, що супроводжуються розвитком

гострих запальних процесів (нефрити, пневмонія, туберкульоз легень, перитоніт, гострі інфекційні захворювання, злоякісні пухлини тощо).

П р и м і т к а. Сироватка крові має бути негемолізованою і зберігатися не більше 24 год від взяття крові.

Література: [4, С. 16–17; 21, С. 182–183; 22, С. 208; 37, С. 194].

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) цинку сульфат 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° С) 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, охолодженим до +10° С. Вміст колби ретельно перемішують.

Похибка методу: ± 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. 6.9.

Калібрування. Шляхом розведення контрольних розчинів I і II готують шкалу розведених стандартів відповідних (5–20) одиниць за Shank-Noagland (од. S-H) (табл. 6.10).

Таблиця 6.9

Схема проведення цинк-сульфатної проби

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

Після внесення реактивів пробірки витримують 30 хв за кімнатної температури (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.

Таблиця 6.10

Схема побудови калібрувального графіка

№ розчину	Контрольний розчин I	Контрольний розчин II	Одиниці помутніння S-N
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 порівняно з дистильованою водою. Довжина хвилі 620–660 нм.

П р и м і т к а. Якщо помутніння перевищує 20 од. S-N, аналіз повторюють з пробою, розведеною ізотонічним розчином натрію хлориду 1:1 (результат необхідно помножити на 2). Реактив № 3 містить сульфатну (сірчану) кислоту. Реактив № 4 містить отруйний барію хлорид.

Література: [4, С. 17–19].

Тимолова проба

Принцип методу. Бета- і гамма-глобуліни та ліпопротеїди сироватки крові осаджуються тимоловим реактивом за 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 (сульфатна 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 за постійного перемішування на магнітній мішалці поступово додають піпеткою 15 мл реактиву 1. Кінчик піпетки обов'язково має бути опущений у воду. Розчин доливають дистильованою водою до мітки і перемішують 10 хв. Тимоловий реактив зберігають за кімнатної температури. 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° С, 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° С. Вміст колби ретельно перемішують.

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 в табл. 6.11. Похибка методу $\pm 8\%$.

Таблиця 6.11

Схема проведення тимолової проби

Речовина	Дослідна проба (А)	Контрольний розчин I	Контрольний розчин II
Сироватка крові	0,05	–	0,05
Тимоловий реактив	3,00	3,00	–
0,85% розчин NaCl	–	0,05	3,00

Після внесення реактивів пробірки витримати 30 хв за кімнатної температури. Знову перемішати і виміряти оптичну густину дослідної проби (А) відносно контрольного розчину I. Якщо сироватка крові мутна, то вимірюють відносно контрольного розчину II.

Калібрування. Шляхом розведення контрольних розчинів I і II готують шкалу розведених стандартів відповідних одиниць (5–20) за Shank-Noagland (од. S-H) (табл. 6.12).

Схема побудови калібрувального графіка

№ розчину	Контрольний розчин I	Контрольний розчин II	Одиниці помутніння S-N
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 відносно 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-N). Збільшення помутніння понад 3,0 од. S-N свідчить про ураження паренхіми печінки ("синдром запалення"), яке здебільшого виявляють у коней і собак (рідше у полігастричних тварин) за токсичних та інфекційних гепатитів, гепатодистрофії, цирозу печінки.

Пробу можна використовувати для диференціальної діагностики механічної і паренхіматозної жовтяниць. Так, за механічної жовтяниці значення од. S-N не перевищують верхньої межі норми, а проба стає позитивною внаслідок ускладнення патологічного процесу паренхіматозним гепатитом.

Тимолова проба є неспецифічною для печінки, її показники зростають за всіх захворювань, що супроводжуються диспротеїнемією.

П р и м і т к а. Якщо помутніння перевищує 20 од. S-N, аналіз повторюють, попередньо розвівши пробу ізотонічним розчином NaCl (1:1). Результат необхідно помножити на 2.

Література: [4, С. 19–20; 21, С. 180–181; 22, С. 206–207; 37, С. 193–194].

6.6. Визначення залишкового азоту колориметричним методом

У живому організмі одночасно з процесом біосинтезу білка (асиміляція) відбувається протилежний процес – розщеплення білків (дисиміляція), який значно посилюється внаслідок розвитку патологічних явищ. Кінцевими продуктами 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 і 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).

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

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

Реактиви: 1) 20% розчин трихлороцтової кислоти (ТХОК), ч; 2) концентрована сульфатна кислота, чда, хч; 3) 50% розчин гідрогену (водню) пероксиду; 4) 50% розчин натрію гідроксиду, чда; 5) реактив Неслера, чда; 6) амонію сульфат, хч.

Хід визначення. У центрифужну пробірку вносять 0,6 мл 20% розчину ТХОК, 2,2 мл дистильованої води та 0,2 мл сироватки крові. Суміш ретельно перемішують скляною паличкою, центрифугують 5–10 хв за 3000 об./хв. Відбирають у високі лабораторні пробірки 1 мл прозорого безбілкового фільтрату, додають 3 краплі концентрованої сульфатної (сірчаної) кислоти і 3 краплі пергідролі. Одночасно готують контрольний розчин (у високу пробірку вносять 3 краплі концентрованої сульфатної кислоти і 3 краплі пергідролі). Після цього всі пробірки поміщають у нагріту пісочну ванну 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 гідроксиду і 0,5 мл реактиву Неслера. Вміст дослідних пробірок забарвлюється в жовтий колір. Контроль має бліде забарвлення. Через 5 хв проби колориметрують за довжини хвилі 470 нм відносно контролю в кюветі з шириною оптичного шару 10 мм.

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

Розрахунок кількості залишкового азоту в пробі проводять за формулою:

$$X, \text{ мг} = \frac{A \times 3 \times 5 \times 100}{1000},$$

де X – мг залишкового азоту в 100 мл сироватки крові, A – знайдена за калібрувальним графіком кількість азоту в досліджуваній пробі (1 мл фільтрату).

Для переведення в ммоль/л необхідно одержаний результат поділити на коефіцієнт 1,4.

Побудова калібрувального графіка. 235,7 мг перекристалізованого амонію сульфату розчиняють у мірній колбі на 100 мл в дистильованій прокип'яченій воді. В 1 мл стандарту міститься 500 мг азоту. З цього розчину готують низки розведень амонію сульфату від 10 до 100 мкг азоту в 10 мл (табл. 6.13). До кожного розведення додають 4 краплі 50%-ного розчину натрію гідроксиду і 0,5 мл реактиву Неслера.

Таблиця 6.13

Схема побудови калібрувального графіка

Розчин	Контроль	Пробірки				
		1	2	3	4	5
Стандартний розчин $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 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% розчин NaOH, краплі	4	4	4	4	4	4
Реактив Неслера, мл	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5

Література: [4, С. 21–22].

6.7. Визначення сечовини в сироватці крові (за реакцією з діацетилмонооксимом)

Принцип методу. Діацетилмонооксим у кислому середовищі гідролізується до діацетилю, який, реагуючи з сечовиною, утворює комплекс червоно-рожевого забарвлення, що має максимальне поглинання за довжини хвилі 520 нм.

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

Реактиви: 1) кислий реагент – 0,06% розчин H_3PO_4 ; 10% розчин H_2SO_4 ; 0,003% розчин FeCl_3 ; 2) кольоровий реагент – 0,17% розчин діацетилмонооксиму (ДАМО) і 0,04% 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. 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 за довжини хвилі 490–540 нм (максимальне поглинання за 520 нм) відносно контролю. Аналогічно обробляють 0,02 мл стандарту сечовини і контроль – 0,02 мл дистильованої води. Розрахунок проводять за формулою:

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

де $E_{\text{дп}}$ – екстинція дослідної проби; $E_{\text{ст}}$ – 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:

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

За вмісту сечовини більше 25 ммоль/л пробу слід розбавити дистильованою водою і аналіз провести повторно, результат помножити на розведення.

Стабільність досліджуваних проб. Сечовина в дослідних пробах зберігається до 8 год за кімнатної температури, до 72 год – за 2–8° С, до 6 міс. – у замороженому стані.

П р и м і т к а. 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. Обробляють, як написано вище (див. хід визначення). Як альтернативний варіант перед проведенням дослідів можна змішати 1 об'єм кольорового реагенту з двома об'ємами кислого і використовувати цю суміш для проведення аналізу (0,02 мл проби + 3 мл суміші або 0,01 мл проби + 1,5 мл суміші тощо).

Література: [4, С. 23–24; 21, С. 142–144; 22, С. 216–218; 37, С. 194–196; 60, С. 100–102; 63, С. 11–13].

6.8. Визначення сечовини у сироватці крові та сечі (за методом 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 на 0,2; 1 і 5 мл, пробірки.

Реактиви: 1) 10% розчин трихлороцтової кислоти (ТХОК), ч; 2) 2,5% розчин діацетилмонооксиму, чда (готують змішуванням 0,25 г реактиву і 9,75 мл дистильованої води); 3) 0,25% розчин тіосемікарбазиду, чда (0,25 г реактиву розчиняють у дистильованій воді і доводять водою до мітки 100 мл); 4) основний розчин феруму хлориду готують розчиненням 5 г феруму хлориду (хч, чда) в 100 мл дистильованої води, після чого додають 1 мл концентрованої сульфатної кислоти, хч; 5) робочий розчин феруму хлориду: 1 мл основного розчину феруму хлориду доводять до 100 мл дистильованою водою, додають 8 мл концентрованої сульфатної і 1 мл 85% розчину ортофосфатної кислоти (хч, чда). Зберігають у темному місці до 2-х тижнів; 6) кольоровий реактив (до 30 мл робочого розчину феруму хлориду додають 20 мл дистильованої води, 1 мл 2,5% 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 за 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 крана. Не пізніше як через 15 хв вимірюють екстинцію проби на КФК за довжини хвилі 530–560 нм відносно 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 вищеописаною методикою. Результат перемножують на ступінь розведення.

Джерело: [60] Методы ветеринарной клинической лабораторной диагностики /И.П.Кондрахин, А.В.Архипов, В.И.Левченко с соавт. – М. : КолосС, 2004. – С. 100–101.

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* (за нефриту і піелонефриту) і *позанирковою*, яка спостерігається внаслідок зменшення клубочкової фільтрації у разі хвороб серця та зневоднення.

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 (ммоль/л) становить 3,0–6,5; корів – 3,5–6,0; свиней – 3,3–6,0; собак – 3,0–7,5; овець – 3,0–6,0; кіз – 4,0–7,0; лошаг – 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. Переважно зустрічається *підвищення* вмісту сечовини, що свідчить про ураження нирок. За гострої ниркової 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. За хронічного перебігу гломерулонефриту та азотемічної 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 у разі аліментарного виснаження, тяжкого перебігу патології печінки. Оскільки вміст ЗА може залишатися в межах норми, то відсоткове відношення азоту сечовини до ЗА стає менше 45%, якщо перерахунок робити в мг/100 мл, або 10% – за розрахунку в ммоль/л. Якщо на фоні підвищення вмісту ЗА кількість сечовини починає зменшуватися, то спостерігають комбіновану патологію нирок і печінки (*гепаторенальний синдром*).

Література: [4, С. 24–26].

6.9. Визначення сечової кислоти в сироватці крові

Принцип методу. Сечова кислота у лужному середовищі відновлює фосфорно-вольфрамовий реактив у сполуку блакитного кольору, яка вимірюється фотометрично за довжини 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) натрію карбонат, хч; 2) натрій вольфрамово-кислий, ч; 3) реактив Фоліна (розчин); 4) калібрувальний розчин сечової кислоти (357 мкмоль/л); 5) 0,35 моль/л розчин сульфатної (сірчаної) кислоти (ч.д.а.; х.ч.) Для приготування розчину до 200 мл дистильованої води додають 10 мл концентрованої сульфатної 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 сульфатної кислоти і перемішують. Потім вносять 0,1 мл розчину натрію вольфрамату, перемішують і центрифугують протягом 20 хв за 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 за довжини 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:

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

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

П р и м і т к и: 1. За вмісту сечової кислоти більше 1000 мкмоль/л пробу розвести у 3 рази ізотонічним розчином натрію хлориду і провести аналіз повторно. Отриманий результат помножити на 3.

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

Джерело: подібна методика описана в джерелі 60: Методы ветеринарной клинической лабораторной диагностики /И.П.Кондрахин, А.В.Архипов, В.И.Левченко с соавт. – М. : КолосС, 2004. – С. 106–107.

Діагностичне значення. Сечова кислота – один із кінцевих продуктів обміну нуклеопротейнів, під час руйнування яких утворюються нуклеїнові

кислоти, які у свою чергу гідролізуються до *нуклеотидів*. Подальший розпад нуклеотидів здійснюють нуклеотидази, утворюючи пуринові (аденін і гуанін) та піримідинові основи. У процесі дезамінування аденіну і гуаніну утворюється гіпоксантин, а потім – ксантин, який окиснюється у печінці ксантиноксидазою з утворенням сечової кислоти. У крові вона міститься у вигляді натрієвої солі, зв'язаної з білком. Цей комплекс дуже чутливий до зміни рН сечі. За рН 5,0 розчинність сечової кислоти становить 60 мг/л, а за 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 у разі згодовування їм тваринних білків – 8–11 г. Виділяється сечова кислота у формі солей – уратів калію та натрію; під час змішування 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*) спостерігають за надмірного згодовування кормів тваринного походження; лейкозу, В₁₂-дефіцитної анемії, туберкульозу, цукрового діабету, ацидозних станів, хвороб нирок, пневмоній.

Найбільш поширеним захворюванням, яке виникає в результаті порушення пуринового обміну, є *сечокислий діатез*, за якого 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 сечокислого діатезу: *вісцеральну* – урати відкладаються на серозних покриттях і внутрішніх органах; *суглобову (подагра)*; *змішану* – вісцерально-суглобову та *локальну*, коли урати відкладаються в нирках і сечоводах. Вісцеральна форма сечокислого діатезу реєструється як з-поміж 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 і можуть бути центрами кристалізації інших солей і спричиняти утворення змішаних камінців.

Література: [4, С. 26–28; 21, С. 205–207; 60, С. 106–107].

6.10. Визначення креатиніну (за колірною реакцією Яффе)

Принцип методу. Креатинін у лужному середовищі реагує з пікриною кислотою з утворенням сполуки помаранчево-червоного кольору, що має максимум поглинання за довжини 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 луку (реагент 1) з одним об'ємом насиченого розчину пікринової кислоти (реагент 2) готують робочий реактив (зберігає стабільність не менше 4 год за кімнатної температури). До 0,1 мл сироватки крові додають 2 мл робочого реактиву. Перемішують, інкубують протягом 15 хв у водяній бані за температури 37° С. Аналогічно обробляють 0,1 мл стандарту креатиніну (реагент 3) та 0,1 мл дистильованої води (контроль).

Відносно контролю відразу визначають оптичну густину стандарту креатиніну та досліджуваних проб за довжини 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:

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

П р и м і т к и. 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 за 510 нм. Під

час використання приладів типу ФЕК-56М, КФК-2, КФК-2МП тощо 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 за 0–8° С або до 3-х місяців у замороженому стані. Добову сечу стабілізують додаванням 15 г борної кислоти.

Діагностичне значення. 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.

Уміст креатиніну в сироватці крові людей становить 50–115 мкмоль/л, у високопродуктивних корів – 70–150; 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 фільтрується клубочковим апаратом нефрона і не реабсорбується в каналцях. Тому визначення його важливе для вивчення фільтраційної функції клубочків нирок. *Підвищення* вмісту креатиніну спостерігають за ураження клубочків нирок (гломерулонефрит), гострої і хронічної ниркової недостатності. Об'єм клубочкової фільтрації у нирках людини за нормального вмісту креатиніну в сироватці крові становить 85–135 мл/хв, 200 мкмоль/л – 37, 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, що вказує на кількість плазми або сироватки крові, яка за одиницю часу повністю очищається від введеної речовини. Вміст креатиніну в сироватці зростає у разі значного погіршення функції нирок.

Література: [4, С. 28–30].

6.11. Визначення креатиніну в сироватці крові (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% розчин NaOH, чда; 4) 0,1 н (0,1 моль/л) розчин хлоридної (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% розчину NaOH і доводять дистильованою водою до об'єму 5 мл (+ 2,9 мл).

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

Розрахунок проводять за формулою:

$$X = \frac{E_{np}}{E_{ст}} \times 1 = \text{мг} / 100 \text{ мл},$$

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

Для перерахунку креатиніну у мкмоль/л необхідно одержаний результат помножити на коефіцієнт 88.

Література: [4, С. 30–31; 21, С. 198–200; 22, С. 223–226; 37, С. 197; 60, С. 107–109].

6.12. Визначення молекул середньої маси (СМ)

Принцип методу. Вимірюють екстинцію після осадження великомолекулярних білків і ліпідів трихлороцтовою кислотою. Визначають дві фракції СМ: фракцію, що містить ароматичні амінокислоти (за довжини хвилі 280 нм), та фракцію, що їх не містить (довжина хвилі 254 нм).

Обладнання: спектрофотометр, піпетки.

Реактиви: 15% розчин ТХО кислоти.

Хід визначення. 1. До 1 мл свіжовідібраної сироватки додають 0,5 мл розчину ТХО кислоти, перемішують скляною паличкою і центрифугують за 3000 об./хв упродовж 30 хв.

2. До 0,5 мл центрифугату додають 4,5 мл дистильованої води, перемішують і вимірюють оптичну густину на спектрофотометрі за $\lambda=254$ нм (за ниркової патології) або за 280 нм (за збереженої функції нирок) у кюветі з шириною робочого шару 10 мм проти контрольної проби (0,25 мл розчину ТХО + 4,75 мл води).

Рівень середніх молекул (СМ) визначають в умовних одиницях (у.од.), які кількісно відповідають показникам екстинції.

Діагностичне значення. У клінічно здорових котів рівень середніх молекул (СМ) становить 0,242–0,302 ум.од., за хронічної ниркової недостатності – 0,360–0,423, за тяжкої ниркової азотемії – 0,728–1,352 ум.од. (Морозенко Д.В., 2008).

Терміном «середні молекули» характеризують гетерогенну групу речовин різної хімічної природи з молекулярною масою від 300 до 5000 ум.од.: прості і складні пептиди, гліко- та нуклеопротейди, ліпіди, олігосахариди, імуноактивні пептиди (інтерлейкіни, лімфолейкіни). За ендогенної інтоксикації рівень СМ зростає, особливо за гострої та хронічної ниркової недостатності, гепатиту, цирозу печінки, печінкової коми, злоякісних пухлин. Показник СМ може бути використаний як прогностичний тест критерію ефективності лікувальних заходів.

Література: [21, С. 185–186; 22, С. 211–212; 37, С. 201–202].

РОЗДІЛ 7

МЕТОДИ ВИЗНАЧЕННЯ АКТИВНОСТІ ФЕРМЕНТІВ

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, АсАТ) та аланінова трансферази (аланінамінотрансфераза, АлАТ) переносять аміногрупи від аспарагінової кислоти (АсАТ) та аланіну (АлАТ) на альфа-кетоглутарову кислоту. У разі пошкодження тканин їх активність у сироватці (плазмі) крові зростає. Вони є досить чутливими за різних патологій в організмі, зокрема хвороб печінки.

7.1. Визначення активності аланінамінотрансферази (АлАТ) і аспартатамінотрансферази (АсАТ) (за методом Райтмана-Френкеля)

Принцип методу. Внаслідок переамінування, що відбувається під дією АлАТ і АсАТ, утворюються шавлевооцтова і піровиноградна кислоти, які в результаті додавання 2,4-динітрофенілгідразину утворюють у лужному середовищі забарвлені гідразони піровиноградної кислоти, що мають максимум поглинання за довжини хвилі 500–560 нм. Інтенсивність забарвлення пропорційна кількості утвореної піровиноградної кислоти.

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 АлАТ (або АсАТ), чда: буфер – 0,1 моль/л рН 7,4±0,2; 2-оксоглутарат – 2 ммоль/л; DL-аланін (для АлАТ) або DL-аспартат (для АсАТ) – 0,2 моль/л – 105 мл; 2) 2,4-динітрофенілгідразин, чда (1 ммоль/л в 1 моль/л НСl) – 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 КОН, чда.

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

Хід визначення. У пробірку вносять 0,25 мл субстратного розчину АлАТ (АсАТ), нагрівають за температури 37° С протягом 3–5 хв, додають 0,05 мл сироватки крові й інкубують (за 37° С) точно 60 хв. Вносять 0,25 мл розчину 2,4-динітрофенілгідразину і витримують протягом 20 хв за кімнатної температури. Додають 2,5 мл 0,4 М розчину натрію чи калію гідроксиду, ретельно перемішують і витримують 10 хв за кімнатної температури. Визначають оптичну густину за довжини хвилі 500–560 нм у кюветі з товщиною робочого шару 10 мм відносно 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 низки розведень (табл. 7.1).

Таблиця 7.1

Розведення натрію пірувату

№ пробірки	Стандартний розчин натрію пірувату, мл	Ізотонічний розчин NaCl, мл	Субстратний розчин АлАТ/АсАТ	Активність ферменту (АлАТ, АсАТ)	
				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.

У кожену пробірку вносять по 0,5 мл розчину 2,4-динітрофеніл-гідразину, струшують і витримують 20 хв за кімнатної температури. Додають по 5 мл 0,4 М NaOH (KOH), ретельно перемішують і залишають на 10 хв за кімнатної температури. Визначають оптичну густину за довжини хвилі 500–560 нм у кюветі з товщиною робочого шару 10 мм відносно контролю (пробірка № 5). На осі ординат відкладають знайдену величину оптичної густини, на осі абсцис – уміст піровиноградної кислоти калібрувальної проби, виражений у мккат/л або мкмоль/(год × мл), ммоль/(год × л).

За калібрувальною кривою знаходять значення активності амінотрансфераз (АлАТ або АсАТ) у сироватці крові.

Діагностичне значення. Аспарагінова (аспартатамінотрансфераза) та аланінова (аланінамінотрансфераза) трансферази локалізуються у гіалоплазмі клітин (АсАТ, 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). Максимальна активність трансфераз у сироватці крові здорових тварин наступна: АсАТ у високопродуктивних

корів 2,0 ммоль/(год·л), глибокожеребних кобил – 4,21, лактуючих – 4,43, дорослих собак – 1,20 ммоль/(год·л); АлАТ, відповідно, 1,0; 0,43; 0,43 і 1,30 ммоль/(год·л). Дослідження активності АсАТ та АлАТ у сироватці крові використовують для діагностики хвороб печінки (гепатиту, гепатозу та ін.). Для великої та дрібної рогатої худоби показовими є дослідження активності АсАТ у сироватці крові, а для коней, свиней, собак та котів – АлАТ і АсАТ. Це пояснюється ступенем активності названих ензимів у гепатоцитах тварин різних видів. Трансферази є досить чутливими та інформативними показниками ураження печінки. Найвища активність трансфераз у крові спостерігається під час розвитку некрозу печінки і гострого паренхіматозного гепатиту, дещо нижча – за хронічного гепатиту та гепатодистрофії. Зростання активності АсАТ і АлАТ у сироватці крові починається за 3–8 днів до появи клінічних ознак захворювання і досягає максимуму в період гострого перебігу патологічного процесу. Під час розвитку жирової дистрофії печінки у корів зростання активності АсАТ виникає вже у разі ультрамікроскопічних змін органа, коли активність інших ферментів ще мало змінюється. Гіперферментемія залежить від кількості відкладеного жиру в паренхімі. Активність АсАТ у крові корів, хворих на жирову гепатодистрофію, збільшується у 2–5, за гострого перебігу гепатиту – у 3–10 разів.

Література: [4, С. 45–47; 12, С. 215–229; 21, С. 241–244; 22, С. 260–263; 31, С. 382–395; 60, С. 221–223].

7.2. Визначення активності гамма-глутамілтранспептидази (ГГТП) у сироватці крові

Принцип методу. Гамма-глутамілтранспептидаза каталізує реакцію перенесення L-γ-глутамінового залишку із хромогенного субстрату на гліцилгліцин. При цьому звільняється *n*-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-γ-глутаміл-*n*-нітроаніліну, ч; 2) буферна суміш: гліцилгліцин, 1,26 г, ТРІС – 1,21 г; 3) стандартний розчин *n*-нітроаніліну, охч (5 ммоль/л); 4) 10% розчин оцтової кислоти, охч.

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

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

2. Субстратно-буферний розчин. Із флакона 1 відбирають 40 мг субстрату і розчиняють у 18 мл дистильованої води на киплячій водяній бані, додають 17 мл буферного розчину. Розчин стабільний за 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% розчину оцтової кислоти і перемішують. Контрольну пробу готують аналогічно, але сироватку (плазму) крові додають після інкубації. Вимірюють екстинцію дослідної проби проти контрольної за 400–420 нм у кюветі з товщиною робочого шару 10 мм.

Активність гамма-глутамілтранспептидази визначають за калібрувальним графіком, для побудови якого зі стандартного розчину *n*-нітроаніліну (вміст ампули) готують розведення (табл. 7.2).

Таблиця 7.2

Розведення *n*-нітроаніліну

№ пробірки	Стандартний розчин <i>n</i> -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% 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 активності 5000 нмоль/с×л.

П р и м і т к и: 1. За активності проби вище 5000 нмоль/с×л її розводять ізотонічним розчином NaCl. Результат множать на коефіцієнт розведення.

2. Активність гамма-глутамілтранспептидази не змінюється протягом 7 днів за зберігання сироватки крові за +4° С і протягом 3 міс. за –20° С.
3. У разі використання кювети з робочим об'ємом більше 10 мм кількість робочого розчину необхідно пропорційно збільшити.

Діагностичне значення. Гамма-глутамілтрансфераза (ГГТ, гамма-глутамілтранспептидаза – ГГТП) каталізує перенесення глута-мілового залишку та гамма-глутамілпептиду на акцепторний пептид чи на альфа-амінокислоту. Фермент має найвищу активність у нирках, печінці, особливо в клітинах, які формують ниркові канальці та жовчні протоки, а також у підшлунковій залозі. Максимальна активність ГГТП у сироватці крові здорових високопродуктивних корів становить 450 нкат/л, кобил жеребних – 1000, лактуючих – 900; лоша – 250 нкат/л; собак – 450 нкат/л (0,45 мккат/л). Зростання активності ГГТ у сироватці крові свідчить про патологічні процеси в гепатобіліарній системі, а підвищення її активності у сечі – про ураження нирок. За панкреатиту активність ферменту в крові зростає незначно. Гіперферментемія є раннім і надійним тестом інтрагепатичного стазу жовчі (холестазу), пошкодження канікулярних мембран гепатоцитів біля біліарного полюса та епітеліальних клітин, що вистилають просвіт жовчних протоків. За холестазу та пошкодження внутрішньопечінкових жовчних протоків спостерігається яскраво виражена гіперферментемія (50,0–110,0 Од/л), а внаслідок значних патологічних процесів у біліарній системі (холангіт, перихолангіт, холестаз, фасціольоз, дикроцеліоз) активність ферменту досягає понад 500,0 од/л.

Література: [4, С. 47–49; 21, С. 238–241; 22, С. 256–259; 60, С. 237–240].

7.3. Визначення α -амілази (за методом Каравея)

Принцип методу. Метод ґрунтується на визначенні залишку нерозщепленого α -амілазою крохмалю. Концентрацію крохмалю визначають за кольоровою реакцією з йодом. Активність α -амілази пропорційна зменшенню інтенсивності забарвлення за 640 нм.

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

Реактиви: 1) концентрований субстратно-буферний розчин, чда (0,5% розчин крохмалю, розчиненого в 0,25 М Тріс-НСІ буфері, рН 7,1); 2)

концентрований розчин йоду, ч – 0,1 М (стійкий у темному місці);
3) концентрований стоп-розчин, 4 н НСІ, ч.

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 0,1 М розчину + 4,9 мл дистильованої води і перемішують).

Приготування робочого стоп-розчину. Одержують шляхом розведення концентрованого стоп-розчину в 40 разів (10 мл концентрованої хлоридної 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 за 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. Під час розрахунку активності амілази враховують коефіцієнт розведення.

Хід визначення. Визначення α -амілази проводять згідно зі схемою (табл. 7.3).

Таблиця 7.3

Схема визначення α -амілази

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

Вимірюють поглинання дослідної і контрольної проб за 640 нм відносно дистильованої води (можна використовувати довжину хвиль 630–690 нм або червоний світлофільтр; кювета з шириною оптичного шару 10 мм).

Активність α -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.

П р и м і т к а. 1 мг/(с \times л) = 3,6 мг/(год \times мл); 1 мг/(год \times мл) = 0,278 мг/(с \times л).

Діагностичне значення. Активність альфа-амілази у сироватці крові великої рогатої худоби становить 800–1200; коней – 15–40; собак – 500–1750 од/л. Альфа-амілаза (α -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 й скелетних м'язах. Низька молекулярна маса амілази (\approx 48000) сприяє фільтрації ферменту через ниркові клубочки і виділенню із сечею. Ензим складається з 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 під час пошкодження слинних та підшлункової залоз. Значна та швидка *гіперамілаземія* і *гіперамілазурія* розвиваються за гострого перебігу паротиту та панкреатиту. Меншою мірою зростання активності альфа-амілази реєструється у разі виразок шлунка, хімостазу, дистрофії печінки, гепатиту, жовчнокам'яної хвороби. За патології нирок активність ферменту може зростати у крові, а в сечі – знижуватися. *Гіперамілаземію* спричинюють деякі лікарські препарати (кортикостероїди, саліцилати, тетрациклін, фуросемід, гістамін).

Література: [4, С. 49–51; 21, С. 275–278; 22, С. 292–294; 31, С. 418–425; 37, С. 204–205; 60, С. 228–230].

7.4. 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 ортофосфатної кислоти з утворенням неорганічного фосфору. Крім кісткової тканини лужна фосфатаза міститься в печінці, кишечнику, нирках і плаценті. Сироваткова лужна фосфатаза має кістково-печінково-кишкове походження. У молодняку

великої рогатої худоби переважає кістковий ізофермент, а кишковий буває лише за патології. У кістках фермент синтезується остеобластами.

Принцип методу. У процесі 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. 7.4).

Таблиця 7.4

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 н розчин натрію гідроксиду (чда), мл	0,7	1,4	2,8
Вода до	25	50	100

Хід визначення. 1. На кожную пробу сироватки беруть 2 центрифужні пробірки (П₁ і П₂). У кожную з них наливають 2 мл робочого розчину бета-гліцерофосфату і нагрівають у водяній бані за температури 37° С 5 хв.

2. У пробірки П₁, у яких визначають активність лужної фосфатази, вносять по 0,2 мл сироватки крові і швидко ставлять їх на 1 год у водяну баню або термостат за температури 37° С.

3. Через 1 год пробірки П₁ виймають з термостата і відразу в кожную додають 2,2 мл 10% розчину трихлороцтової (ТХО) кислоти. Після перемішування скляною паличкою вміст пробірок через кілька хвилин центрифугують за 1500 об./хв упродовж 20 хв.

4. У проміжок часу, коли пробірки П₁ інкубуються в термостаті (п.2), в інші пробірки – П₂ додають по 0,2 мл сироватки крові і відразу – 2,2 мл 10% розчину ТХО кислоти, перемішують і центрифугують.

5. До 1,5 мл центрифугату додають 1 мл молібденового реактиву і 1 мл 1% розчину аскорбінової кислоти. Точно через 10 хв проби колориметрують на КФК-3 (КФК-2) за довжини хвилі 660 нм у кюветі з товщиною оптичного шару 5 мм.

6. Отримане за 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.

7. На кожену серію досліджень беруть 2 пробірки для контролю (К і К₁) та 2 пробірки для стандарту (С і С₁) і виконують з ними ті ж маніпуляції (п. 1 і п. 2), проте замість сироватки крові (п. 2) у пробірки К і К₁ додають по 0,2 мл дистильованої води, а в пробірки С і С₁ – по 0,2 мл робочого стандартного розчину фосфору. Після інкубування в кожену з них, як і в дослідні проби, додають по 2,2 мл 10% розчину ТХО кислоти (див. п. 3).

Приготування стандартного розчину фосфору. Готують основний розчин: 0,439 г однозаміщеного калію фосфату (КН₂РО₄), висушеного до постійної маси над концентрованою сульфатною кислотою, розчиняють у 100 мл води. В 1 мл міститься 1 мг фосфору. З нього готують *робочий стандартний розчин*: 5 мл основного розчину доводять дистильованою водою у мірній колбі на 100 мл до мітки.

Розрахунки проводять за формулами:

$$X_1 = \frac{A_1}{B} \times 5;$$

$$X_2 = \frac{A_2}{B} \times 5;$$

$$АЛФ = X_1 - X_2,$$

де A_1 – оптична густина дослідних пробірок P_1 ; A_2 – оптична густина пробірок P_2 , у яких визначався вміст неорганічного фосфору; B – оптична густина робочого стандартного розчину (пробірки С і С₁); 5 – коефіцієнт для стандартного розчину фосфору (5 мг/100 мл); X_1 – кількість мг неорганічного фосфору, що міститься у 100 мл сироватки крові після одногодинної інкубації її з гліцерофосфатним субстратом; X_2 – кількість мг неорганічного фосфору, що міститься у 100 мл сироватки крові без інкубації з гліцерофосфатним субстратом (див. п. 4). Різниця у вмісті неорганічного фосфору після і до інкубації ($X_1 - X_2$) є показником активності лужної фосфатази і умовно позначається одиницями Боданські.

Література: [4, С. 51–53; 31, С. 409–418; 53; 60, С. 226–228; 63, С. 29–31].

7.5. Визначення активності лужної фосфатази (Вагнер В.К., Путилін 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 за температури + 5 °С протягом 5 діб);

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. 1. 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 . Прогрівують 3 хв у водяній бані за 37° С.

2. 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.

3. Через 10 хв вимірюють оптичну густину дослідної проби і стандартів на фотоелектроколориметрі (КФК-2, КФК-3) за довжини хвилі 410 нм у кюветі з товщиною робочого шару 10 мм проти контролю. Завершують вимірювання не пізніше 30 хв.

Розрахунок проводять за формулою:

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

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

Література: [4, С. 55–56].

7.5.1. 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 й стандарту пробірки прогривають у водяній бані 3 хв за 37° С, після чого інкубують у водяній бані за 56–57° С точно 15 хв. Зупиняють реакцію охолодженням пробірок протягом 5 хв у льодяній бані. Потім прогривають 5 хв за 37° С, а далі роботу виконують так само, як під час визначення загальної ЛФ, починаючи з п. 2: додають по 0,2 мл розчину субстрату, інкубують за 37° С точно 15 хв після чого додають по 2 мл розчину інгібітора в кожену пробірку.

Вимірювання та розрахунок проводять так, як описано у підрозділі 7.5. Активність ізоферменту кісткової тканини вираховують за різницею значень активності загальної ЛФ та термостабільної ЛФ.

Література: [4, С. 56. 11].

7.5.2. 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, прогривають 3 хв у водяній бані за 37° С. Подальше дослідження проводять за методикою визначення загальної лужної фосфатази (починаючи з п. 2).

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. За D-гіповітамінозу активність кишкового ізоферменту лужної фосфатази 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. Лужна фосфатаза (ЛФ) активує відщеплення фосфатів з фосфороорганічних сполук. Фермент розміщується в клітинах у зв'язаному з плазматичними мембранами стані. ЛФ складається з 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. Підвищення активності ЛФ у сироватці крові найчастіше реєструється за 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 у процесі розвитку патологічного процесу та стазу жовчі в позапечінкових жовчних протоках. Тоді активність ензиму в сироватці крові зростає у десятки разів. У разі пошкодження внутрішньопечінкових жовчних шляхів та інтрагепатитного холестазу активність ЛФ у крові підвищується лише у 2–3 рази.

У разі патології кісткової тканини, коли виявляється підвищена активність остеобластів і остеокластів, під час розвитку рахіту, остеодистрофії, гіперпаратиреоїдизму 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.

Література: [4, С. 56–58; 11].

7.6. Визначення активності лактатдегідрогенази в сироватці крові (за методом Севела, Товарека)

Принцип методу. L-лактат під дією ферменту сироватки крові в присутності НАД (нікотинаденіндинуклеотид) у лужному середовищі окиснюється у піруват. У міру його утворення роблять висновок про активність ферменту. Одночасно з визначенням загальної каталітичної активності лактатдегідрогенази (ЛДГ) можна визначити і частку ферменту, стійкого до дії сечовини, який характерний, головним чином, для ізоферменту серцевої фракції (перша фракція – ЛДГ₁).

Обладнання. 1) мірні колби на 100 і 500 мл; 2) піпетки місткістю 0,1; 1,0; і 5,0 мл; 3) пробірки на 10 мл; 4) водяний термостат або автоматична водяна баня, яка може підтримувати температуру $+37\pm 0,1^\circ\text{C}$ (допускається використання сухоповітряного термостата з примусовою циркуляцією повітря); 5) фотоелектроколориметр (КФК-2, КФК-3) або спектрофотометр, довжина хвилі 500–560 нм. Кювета з товщиною оптичного шару 10 мм.

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

Реактиви. 1) НАД (нікотин-аденін-динуклеотид) – 45 мг; 2) натрію лактат – 1,9 мл; 3) буферний розчин № 1 – натрію пірофосфат 0,03 моль/л, рН 8,8 – 40 мл; 4) буферний розчин № 2 – натрію пірофосфат 0,03 моль/л, рН 8,8, сечовина – 20 мл; 5) розчин 2,4-динітрофенілгідразину 2 г/л у хлоридній (соляній) кислоті $5\pm 0,25$ моль/л – $5\pm 0,1$ мл – 50 мл; 6) калібрувальний розчин натрію пірувату 110 мкг/мл, що відповідає 88 мкг/мл піровиноградної кислоти – ($5\pm 0,5$ мл) – 5 мл; 7) 0,4 н (16 г/л) розчин NaOH, чда.

Приготування робочих розчинів

1. *Розчин нікотин-аденін-динуклеотиду.* Наважку НАД розчиняють у 15 мл дистильованої води. Після приготування зберігають в холодильнику за температури від $+2$ до $+4^\circ\text{C}$. Розчин стійкий протягом 1 міс. з дня приготування.

2. *Розчин натрію лактату* – 0,45 моль/л. Натрію лактат кількісно переносять у мірну пробірку і розводять дистильованою водою до 15 мл, старанно перемішуючи. Реактив стабільний упродовж 30 діб від дня приготування.

3. *Робочий калібрувальний розчин натрію пірувату* готують з основного калібрувального розчину шляхом розведення його у 10 разів дистильованою водою. 1 мл робочого розчину містить 8,8 мкг піровиноградної кислоти. Розчин стабільний протягом 24 годин.

Хід визначення. Визначення активності лактатдегідрогенази проводиться згідно зі схемою, поданою у табл. 7.5.

Таблиця 7.5

Схема визначення активності ЛДГ

Відміряти в пробірку (кювету), мл	Макроаналіз		Мікроаналіз	
	дослідна проба	контрольна проба	дослідна проба	контрольна проба
1	2	3	4	5
Сироватка крові (розведена 1:2)	0,05	–	0,01	–
Розчин НАД	0,15	0,15	0,03	0,03
Прогрівають 5 хв за 37° С у термостаті				
Буферний розчин № 1	0,4	0,4	0,08	0,08
Розчин натрію лактату	0,1	0,1	0,02	0,02
Інкубують проби 15 хв за 37° С у термостаті				
Розчин 2,4 - динітрофенілгідразину	0,25	0,25	0,25	0,25
Сироватка крові (розведена 1:2)	–	0,05	–	0,05
Витримують 20 хв за кімнатної температури				
Розчин натрію гідроксиду 0,4 н	2,5	2,5	0,5	0,5
Змішати та витримати за кімнатної температури (18–25° С). Виміряти оптичну густину дослідної проби відносно контрольної. Активність ферменту в сироватці крові знаходять за калібрувальним графіком				

Визначення активності сечовиностабільної фракції ЛДГ (ЛДГ₁) проводять згідно зі схемою, поданою у табл. 7.6.

Таблиця 7.6

Схема визначення активності ЛДГ₁

Відміряти у пробірку, мл	Макроаналіз		Мікроаналіз	
	дослідна проба	контрольна проба	дослідна проба	контрольна проба
Сироватка крові (розведена 1:2)	0,05	–	0,01	–
Буферний розчин № 2	0,4	0,4	0,08	0,08
Розчин НАД	0,15	0,15	0,03	0,03
Перемішують і інкубують 1 год за 25° С, закривши корками				
Розчин натрію лактату	0,1	0,1	0,02	0,02
Інкубують проби 15 хв за 37° С у водяному термостаті				
Розчин 2, 4 - динітрофенілгідразину	0,25	0,25	0,05	0,05
Сироватка крові (розведена 1:2)	–	0,05	–	0,01
Витримують 20 хв за кімнатної температури				
Розчин натрію гідроксиду 0,4 н	2,5	2,5	0,5	0,5
Змішати і витримати 10 хв за кімнатної температури (18–25° С). Виміряти оптичну густину дослідної проби відносно контрольної. Активність ферменту в сироватці крові знаходять за калібрувальним графіком				

Побудова калібрувального графіка. Калібрувальний графік будується за схемою, поданою у табл. 7.7.

Таблиця 7.7

Схема побудови калібрувального графіка для визначення ЛДГ

Відміряти у пробірку, мл	Калібрувальні точки					Конт- рольна проба
Дистильована вода	0,5	0,4	0,2	–	–	0,6
Робочий розчин натрію пірвату	0,1	0,2	0,4	0,6	0,8	–
Буферний розчин № 1	0,8	0,8	0,8	0,8	0,6	0,5
Розчин 2, 4-динітрофенілгідразину	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Витримати 20 хв за кімнатної температури						
Розчин натрію гідроксиду, 0,4 н, мл	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
Змішати і витримати 10 хв за кімнатної температури (18–25° С). Виміряти оптичну густану дослідної проби відносно контрольної. Під час побудови калібрувального графіка на осі абсцис – величина активності ЛДГ						
Вміст пірвиноградної кислоти в калібрувальній пробі, мкмоль	0,01	0,02	0,04	0,06	0,08	0,0
мкг	0,88	1,76	3,52	5,28	7,04	0,0
Активність ЛДГ, нмоль/с×л	334	668	1336	2004	2672	0,0
мкмоль/год×л	1,2	2,4	4,8	7,2	9,6	0,0
мккат/л	0,33	0,66	1,33	2,0	2,66	0,0
ОД/л	20	40	80	120	160	0,0

Частку ізоферменту (ЛДГ₁) у відсотках розраховують за формулою:

$$\frac{\text{активність ЛДГ}_1}{\text{активність ЛДГ}} \times 100.$$

- П р и м і т к и:** 1. Для визначення ЛДГ сироватка крові повинна бути вільною від гемолізу.
2. Для приготування реактивів застосовується дистильована вода, вільна від карбонатів.
3. Щавлево-оцтову плазму використовувати не рекомендується, оскільки її солі інгібують фермент.
4. Сироватку слід розводити ізотонічним розчином натрію хлориду.

Діагностичне значення. Лактатдегідрогеназа належить до ферментів, які містяться в усіх тканинах у значній кількості. За ураження міокарда, печінки, нирок та інших органів і тканин активність лактатдегідрогенази в сироватці крові підвищується. У серцевому м'язі та нирках – найбільша активність ізоферментів ЛДГ₁ та ЛДГ₂. У хворих на гострий інфаркт міокарда у сироватці крові підвищується активність ЛДГ₁. Ізоферментний спектр сироватки крові за інфаркту міокарда нагадує ізоферментний спектр серцевого м'яза.

Активність ізоферменту ЛДГ₁ характерна для міокарда, як для тканини з анаеробним типом обміну. У разі гострого перебігу міокардиту ізофермент елімінує в сироватку крові, де його активність зростає, порушується

співвідношення між ЛДГ₁ і ЛДГ. Інфаркт міокарда може спричинювати підвищення активності ЛДГ₁ за нормальної активності ЛДГ.

Фізіологічні ліміти ЛДГ у сироватці крові високопродуктивних корів наступні: 275,0–402,0; ЛДГ₁ – 120,0–206,0 Од/л. Частка кардіоспецифічного ізоферменту (ЛДГ₁) у структурі загальної лактатдегідрогенази становить у нормі 40,0–56,0% [Шарандак П.В., 2007].

Література: [21, С. 231–235; 22, С. 248–252; 31, С. 433–446; 37, С. 208–209; 60, С. 223–226].

7.7. Визначення активності загальної креатинкінази (КК-НАС)

Принцип методу. Кінетичний метод базується на властивості креатинкінази (КК) руйнувати креатинфосфат з перетворенням АДФ на АТФ, за участі якої проходить ферментативне фосфорилювання глюкози. Окиснення продукту під дією глюкозо-6-фосфатдегідрогенази (Г-6-ФДГ) супроводжується перетворенням НАДФ⁺ (НАД⁺) у НАДФ Н⁺.

Обладнання: 1) фотометр біохімічний напіваналізатор або напівавтоматичний біохімічний аналізатор – довжина хвилі 340 нм, ширина кювети 10 мм; 2) автоматичні піпетки на 20–200 та 100–1000 мкл та змінні наконечники до них; 3) термостат, термометр; 4) секундомір.

Реактиви. 1) реактив 1 (Р1): імідазол рН – 6,7 – 125 ммоль/л; N-ацетил L-цистеїн – 25 ммоль/л; D-глюкоза – 25 ммоль/л; магнію ацетат – 21,5 ммоль/л; ЕДТА – 2,02 ммоль/л; НАДФ-К – 2,52 ммоль/л; гексокіназа – 6,87 КОд/л; азид натрію – 13,84 ммоль/л; 2) реактив 2 (Р2): креатинфосфат – 250 ммоль/л; Г-6-ФДГ – 8,88 КОд/л; АДФ-К – 15,2 ммоль/л; АМФ-Na – 256 ммоль/л; діаденозинпептафосфат – 0,0103 ммоль/л; азид натрію – 13,84 ммоль/л.

Використовують набори фірми “Біофарма” (м. Київ).

Хід визначення. Для проведення процедури беруть робочий реактив, змішуючи чотири об’єми Р1 та один об’єм Р2. У дослідні кювети вносять по 1 мл робочого реактиву, в контрольну кювету – 1 мл дистильованої води. Далі додають (змінними наконечниками) в кювети з дослідними зразками по 40 мкл негемолізованої сироватки або гепаринізованої плазми. Після внесення вміст кювет швидко і ретельно перемішують та витримують 2 хв за температури 37 або 30° С. Вимірюють зміну оптичної густини за хвилину ($\Delta OG/xv$) протягом наступних 3 хв. Облік ведуть відносно контрольної кювети.

Розрахунок ведуть за формулою:

$$\text{Активність (Од/л)} = \Delta OG/xv \times 4127.$$

- Примітки: 1. Не застосовувати каламутний реактив;
2. Уникати забруднення, використовуючи чистий лабораторний матеріал (піпетки, пластмасові пробірки для аналізу та ін.).

Література: [21, С. 252–255; 22, С. 270–272; 31, С. 452–460].

7.8. Визначення активності серцевого ізоферменту креатинкінази (КК-МВ)

Принцип методу. Процедура включає вимірювання КК-активності в присутності антитіл до КК-ММ мономера. Ці антитіла повністю інгібують активність КК-ММ та наполовину – активність КК-МВ, у той час коли відсутній вплив на В-субодиничну активність КК-ММ та КК-ВВ. Потім використовується КК-метод для того, щоб якісно визначити КК-В активність. КК-МВ активність отримують множенням КК-В активності на два.

Обладнання. Те ж, що і в попередній методиці.

Реактиви. Ті ж, що і в попередній методиці, за винятком реагенту 1 (Р1), до складу якого додано антитіла до КК-М – 41,66 мл/л.

Використовують набори фірми “Біофарма” (м. Київ).

Хід визначення. Для проведення аналізу готують робочий реактив, змішуючи чотири об’єми Р1 та один об’єм Р2.

У дослідні кювети вносять по 1 мл робочого реактиву, а в контрольну – 1 мл дистильованої води автоматичним дозатором з чистим наконечником. Далі додають змінними наконечниками у кювети з дослідними зразками по 40 мкл дослідної негемолізованої сироватки або гепаринізованої (ЕДТА) плазми. Вміст кювет швидко і ретельно перемішують, залишають на 3 хв. Вимірюють зміну оптичної густини за хвилину ($\Delta OG/xv$) протягом 3 хв. Облік ведуть відносно дистильованої води.

Розрахунок проводять за формулою:

$$\text{Активність (ОД/л)} = \Delta OG/xv \times 8254.$$

Визначають також відношення КК-МВ/КК-НАС:

$$\text{КК – МВ відношення} = \frac{(\text{КК} - \text{МВ} \times 100)}{\text{Загальна КК}}.$$

Діагностичне значення. Відповідно до сучасних уявлень про енергетичне забезпечення функцій міофібрил та саркоплазматичного ретикулуму серцевого м’яза значне місце займає креатинкіназний механізм, який значною мірою відповідальний як за швидкість та характер внутрішньоклітинного перенесення енергії, так і за її утилізацію субклітинними структурами. Важливу роль у цьому складному

багатоступеневому процесі відіграє фермент креатинкіназа, що спричиняє обернену реакцію перенесення фосфатної групи з АТФ на креатин.

Активність креатинкінази залежить від асоціації ізоензимів. М'язова КК міститься у високій концентрації лише в скелетній та серцевій мускулатурі у вигляді відповідних ізоферментів. Розрізняють 2 основні ізоферменти, що мають значення в діагностиці захворювань: серцевий (КК-МВ) та м'язовий (КК-ММ). Наявність цих ізоензимів детермінується геном, що містить 3300 нуклеотидів м'язової КК, активність яких у м'язових елементах більш ніж у 10 разів вища, ніж у нем'язових.

Значне підвищення активності креатинкінази в сироватці крові спостерігається за ураження скелетної мускулатури. Оскільки у разі гострої коронарної недостатності скелетна мускулатура в патологічний процес не включається, підвищення креатинкіназної активності в сироватці крові у цих випадках безпомилково свідчить про ураження міокарда.

П р и м і т к а. Фізіологічні ліміти креатинфосфокінази та її ізоферменту в сироватці крові високопродуктивних корів наступні: КК-НАС від 27,0 до 60,0 Од/л; КК-МВ – 6,0–14,0 Од/л. Частка кардіоспецифічного ізоферменту (КК-МВ) у структурі загальної креатинфосфокінази КК-НАС становить у нормі 14,0–32,0% [Шарандак П.В., 2007].

7.9. Визначення активності холінестерази

Принцип методу. Під впливом холінестерази проходить гідроліз ацетилхоліну з утворенням оцтової кислоти і холіну. Оцтова кислота змінює рН розчину, що виявляється індикатором за зміною кольору буфера.

Обладнання: фотоелектроколориметр, водяна баня, ультратермостат, мірні колби.

Реактиви: 1) 0,9 моль/л розчин ацетилхолінхлориду. 1,67 г ацетилхолінхлориду розчиняють у 10 мл дистильованої води. Зручно використовувати фармакопейний препарат в ампулах: вміст ампули (0,2 г) розчиняють у 1,2 мл дистильованої води. Розчин зберігають у холодильнику 6–7 діб; 2) 0,0075 М вероналовий буфер, рН 8,4. 1,545 г натрієвої солі вероналу (мединалу) розчиняють у 500 мл дистильованої води, додають 9,0 мл 0,1 н розчину хлоридної (соляної) кислоти і 150 мл 0,01% розчину індикатора – фенолового червоного. Вимірюють рН. Доливають дистильованою водою до 1 л. Буфер зберігають у холодильнику в посуді з темного скла. Придатний упродовж 1 міс.; 3) індикатор – феноловий червоний, перехід кольору з жовтого до червоного в діапазоні рН від 6,8 до 8,4. 0,1 г індикатора розтирають у

фарфоровій ступці з 5,7 мл 0,05 н розчину натрію гідроксиду, переносять у мірний циліндр і доводять дистильованою водою до 25 мл. З одержаного 0,4% розчину перед використанням готують 0,01% розчин розведенням дистильованою водою у 40 разів; 4) 0,1 н розчин хлоридної кислоти; 5) 0,7% розчин прозерину: 0,7 г прозерину розчиняють у 100 мл дистильованої води. Зберігають у посудині з темного скла; 6) 0,1 н стандартний розчин оцтової кислоти: 0,57 мл льодяної оцтової кислоти (х.ч.) розбавляють дистильованою водою до 100 мл у мірній колбі. За можливості, готують із фіксаналу.

Хід визначення. 1. У пробірку вносять 5 мл вероналового буфера, 0,2 мл дистильованої води і 0,1 мл сироватки крові. Суміш нагрівають 5 хв за температури 37° С.

2. Добавляють 0,2 мл розчину ацетилхолінхлориду та інкубують упродовж 30 хв за тієї ж температури.

3. Після інкубації добавляють 0,2 мл розчину прозерину. Перемішують.

У контрольну пробу сироватку крові добавляють лише після прозерину.

4. Проби охолоджують і колориметрують за довжини хвилі 500–560 нм (зелений світлофільтр) у кюветах з шириною оптичного шару 5 мм проти води. Колір проб стабільний упродовж 1 год. З екстинції контрольної проби вираховують екстинцію дослідної проби.

Розрахунки ведуть за калібрувальним графіком. Активність холінестерази виражають у мкмоль оцтової кислоти, яка утворилася під час інкубації 1 л сироватки упродовж 1 хв за 37° С (од/л) або протягом 1 с (мккат/л).

Побудова калібрувального графіка. З 0,1 н розчину оцтової кислоти готують розведення згідно з табл. 7.8.

Таблиця 7.8

Розведення оцтової кислоти для побудови калібрувального графіка

№ пробірки	0,1 н р-н оцтової кислоти	Дистильована вода	Вміст оцтової кислоти у калібрувальній пробі, мкмоль	Активність холінестерази	
				од/л	мккат/л, або мкмоль/с·л
1	2	8	4	1333	22,2
2	4	6	8	2666	44,5
3	6	4	12	4000	66,7
4	8	2	16	5333	89,0
5	9	1	18	6000	100,0

З кожного розведеного розчину беруть по 0,2 мл, змішують з 5,0 мл вероналового буфера і 0,1 мл сироватки крові, прогривають 5 хв за температури 37° С, додають 0,2 мл розчину прозерину і 0,2 мл ацетилхолінхлориду. Суміш інкубують 30 хв за 37° С і швидко охолоджують. Екстинцію визначають за тих же умов, що і в дослідних пробах. *Контрольну*

пробу ставлять так, як і калібрувальну, але замість розчину оцтової кислоти додають дистильовану воду. Із екстинції контрольної проби вираховують екстинцію калібрувальної проби. Одержану величину екстинції відкладають на осі ординат, кількість мкмоль оцтової кислоти – на осі абсцис. Лінійна залежність калібрувального графіка зберігається в межах від 0 до 110 мкмоль/(с·л).

Діагностичне значення. Холінестераза синтезується у печінці, тому активність цього ферменту залежить від її функціонального стану. У тканинах зустрічаються дві відмінні між собою холінестерази: а) ацетилхолінестераза ("істинна") – у нервовій тканині та еритроцитах – локалізується переважно в мембранах клітин; б) холінестераза ("неспецифічна", або псевдохолінестераза), яка поширена у багатьох тканинах і плазмі крові, локалізується переважно в цитоплазмі. Ацетилхолінестераза каталізує реакцію гідролізу ацетилхоліну – медіатора, який підвищує проникність постсинаптичних мембран для Na^+ і K^+ , що призводить до різкого збудження, тобто вона має безпосереднє відношення до проведення нервового імпульсу. Холінестераза гідролізує значно більшу кількість субстратів. У здорових тварин активність холінестерази становить приблизно 150–300 мкмоль/(год·мл), або 150–300 ммоль/(год·л) (42–84 мкмоль/(с·л)). Зменшення активності спостерігають у разі гепатиту, цирозу печінки, отруєння ФОС (фосфороорганічними сполуками).

Література: [21, С. 259–262; 22, С. 277–279; 31, С. 466–472; 474–476; 60, С. 234–236].

РОЗДІЛ 8

МЕТОДИ 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 й 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 тощо). 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), ортотолуїдиновим, 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-х годин після взяття крові, або швидко осаджують білки трихлороцтовою кислотою.

8.1. Визначення глюкози за колірною реакцією з ортотолуїдином

Принцип методу. Глюкоза під час нагрівання з ортотолуїдином у розчині оцтової кислоти утворює сполуку, інтенсивність забарвлення якої є пропорційною концентрації глюкози.

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

Реактиви: 1) 3%-ний розчин трихлороцтової кислоти (ТХОК), чда; 2) ортотолуїдиновий реактив, чда: у 94 мл льодяної оцтової кислоти розчиняють 0,15 г тіосечовини і додають 6 мл ортотолуїдину. Реактив стійкий за умови зберігання в холодильнику; 3) стандартний 500 мг% розчин глюкози, приготовлений у 0,2% розчині бензойної кислоти.

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

Хід визначення. У пробірку вносять 1,8 мл 3% розчину ТХОК і додають 0,2 мл свіжої або стабілізованої натрію фторидом крові. Центрифугують 15 хв за 1500 об./хв. До 0,5 мл центрифугату додають 4,5 мл ортотолуїдинового 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 густина вимірюють на фотоелектроколориметрі (ФЕК-56М, КФК-2, КФК-3) за довжини хвилі 590–650 нм (оранжевий або червоний світлофільтр) у кюветі з товщиною робочого шару 10 мм. Контроль: 0,5 мл ТХОК + 4,5 мл ортотолуїдинового 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 5 разів. Розрахунок проводять за формулою:

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

де C – концентрація глюкози у пробі, мг/100 мл крові; C_{cm} – концентрація глюкози у стандарті; E_d – оптична густина дослідної проби; E_{cm} – оптична густина стандарту.

П р и м і т к а. Для перерахунку вмісту глюкози з мг/100 мл у ммоль/л необхідно одержаний результат перемножити на 0,0555 або поділити на 18; 2) інші варіанти виконання реакції описані в джерелах:

Література: [4, С. 40–41; 21, С. 311–313; 32, С. 26–29; 60, С. 117–119; 63, С. 14–16].

8.2. Визначення глюкози у плазмі крові глюкозо-оксидазним методом

Принцип методу. Глюкоза у присутності глюкозооксидази окиснюється киснем повітря до глюконової кислоти та пероксиду гідрогену (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 на 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 щавлевокислого 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 за 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. 8.1. Якщо вміст глюкози у плазмі крові понад 27,7 ммоль/л, її потрібно розвести ізотонічним розчином у 5 разів і повторити визначення.

Таблиця 8.1

Схема визначення глюкози у плазмі крові

Речовина	Калібрувальна проба	Дослідна проба	Контрольна проба
Калібрувальний розчин	0,02	–	–
Плазма крові	–	0,2	–
0,85% розчин NaCl	0,2	–	0,2
Робочий розчин	2,0	2,0	2,0

Усе змішати, витримати 20 хв за кімнатної температури (18–25° С) або 12 хв у термостаті (37° С). Виміряти поглинання дослідної проби (А), калібрувального розчину (В) відносно 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. 8.2).

Таблиця 8.2

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	60–90	3,3–5,0
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 у разі недостатнього вмісту у кормах легкоперетравних вуглеводів (цукру і крохмалю), виснаження легкоомобілізованих запасів цукру за транспортного стресу, підвищеної витрати цукру на терморегуляцію, особливо в поросят у перші дні життя (гіпоглікемія поросят), у фазі інтенсивної лактації, за важкого фізичного навантаження. Окрім того, гіпоглікемію виявляють за аліментарної дистрофії, коли вміст глюкози менше 1 ммоль/л, кетозу (вміст глюкози зменшується одночасно зі зростанням кетонемії), за дефіциту панкреатичної амілази внаслідок панкреатиту і за хронічного ентериту, коли порушуються процеси розпаду вуглеводів та їх всмоктування. Гіпоглікемію часто реєструють за патології печінки, зокрема жирової гепатодистрофії у корів. Вона розвивається внаслідок передозування інсуліну, особливо на фоні низького рівня глюкози в крові (гіпоглікемічна кома), у разі захворювань підшлункової залози, які супроводжуються дефіцитом глюкагону та підвищеним продукуванням інсуліну (наприклад, за інсуліноми – пухлини, що розвивається з β -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) – під час стресів, підвищеної 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 глюконеогенез, тобто посилює утворення глюкози з неуглеводних джерел.

Діабетична гіперглікемія розвивається за недостатньої 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 глюконеогенезу. 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.

Окрім цукрового діабету, гіперглікемія може бути зумовлена гіперфункцією ендокринних залоз, які продукують гормони – антаго-ністи інсуліну. За пухлин кори надниркових залоз (синдром Іщенка-Кушинга) гіперглікемія помірна, за пухлин передньої частки гіпофіза внаслідок стимуляції глюкокортикоїдної функції надниркових залоз гіперглікемія може бути вираженою. Надлишкова секреція катехоламінів, що виникає у разі пухлини мозкового шару надниркових залоз, супроводжується гіперглікемією через посилення глюконеогенезу та розпад глікогену.

Література: [4, С. 41–43; 12, С. 32–34; 21, С. 313–315; 22, С. 326–328].

8.3. Визначення піровиноградної кислоти в крові (модифікований метод Умбрайта)

Принцип. Піровиноградна кислота (ПВК) під час реакції з 2,4-динітрофенілгідразином утворює гідразон, що у лужному середовищі дає коричневе забарвлення, інтенсивність якого пропорційна вмісту ПВК.

Обладнання: фотоколориметр (спектрофотометр), пробірки, піпетки, центрифуга.

Реактиви. 1) 10% розчин трихлороцтової кислоти (ТХО); 2) розчин 2,4-динітрофенілгідразину (ДНФГ). 50 мг реактиву розчиняють у 10 мл концентрованої хлоридної кислоти під час нагрівання у киплячій водяній бані упродовж 1–2 хв. Після охолодження об'єм доводять дистильованою водою до 50 мл. Зберігають у холодильнику в посуді з притертою пробкою; 3) 10% розчин натрію гідроксиду; 4) стандартний розчин піровинограднокислого натрію (натрію пірувату): 200 мг натрію пірувату переносять у мірну колбу на 100 мл, розчиняють у невеликій кількості дистильованої води, а потім доводять об'єм дистилатом до позначки. У 1 мл розчину міститься 2 мг натрію пірувату, що відповідає 1,6 мг піровиноградної кислоти.

Хід визначення

Компоненти	Дослідна проба, мл	Контрольна проба, мл
Кров	0,3	–
Дистильована вода	0,7	1,0
Перемішують скляною паличкою до повного гемолізу еритроцитів		
ТХУ	1,0	1,0
Перемішують скляною паличкою, витримують 2–3 хв і центрифугують за 1500 об./хв упродовж 15 хв		
ЦЕНТРИФУГАТ	1,8	1,8
ДНФГ	0,4	0,4
Перемішують, витримують 20 хв у темному місці		
Розчин NaOH	1,0	1.0
Перемішують, витримують 5 хв і колориметрують у кюветі з товщиною робочого шару 5 мм за синього світлофільтра (440±10 нм) відносно контрольної проби		

Розрахунок проводять за калібрувальним графіком (табл. 8.3).

Дані щодо побудови калібрувального графіка для визначення ПВК

№ пробірок	Стандартний р-н натрію пірувату, мл	Дистильована вода, мл	Концентрація ПВК		
			мг	ммоль/л	мкмоль/л
1	0,25	1,55	0,4	0,0456	45,6
2	0,50	1,30	0,8	0,0912	91,2
3	0,75	1,05	1,2	0,1368	136,8
4	1,00	0,80	1,6	0,1824	182,4

До 1,8 мл приготовленого згідно з таблицею 8.3 стандартного розчину ПВК додають 0,4 мл ДНФГ, центрифугують, витримують 20 хв у темному місці, додають 1,0 мл розчину NaOH, перемішують, витримують 5 хв і колориметрують так само, як і дослідні проби.

Діагностичне значення. Піровиноградна кислота (ПВК) – проміжний продукт вуглеводного і білкового обмінів, тісно пов'язана з обміном тіаміну, який у формі тіаміндіфосфату є коферментом декарбоксилаз, що беруть участь в окиснювальному декарбоксилюванні ПВК. За нестачі тіаміну концентрація ПВК збільшується. У нормі вміст ПВК у крові становить: ВРХ і овець 0,8–1,7 мг/100мл (68–148 мкмоль/л).

Зростання вмісту ПВК встановлено за В₁-гіповітамінозу, гіпоглікемії поросят, порушення окисно-відновних процесів в умовах дефіциту кисню (значні фізичні навантаження, анемії, серцево-судинна і легенева недостатність), у разі хвороб печінки, кетозу, інсулінозалежного діабету, отруєнь солями ртуті, арсену.

Примітки: 1. 1 мг/100 мл ПВК = 113,6 мкмоль/л;

2. Інший метод визначення ПВК – див. у джерелі 4, С. 122–124.

Література: 21. С. 325–326; 22. С. 333–334; 32. С. 101–102.

8.4. Визначення вмісту молочної кислоти в крові (за методом Балаховського І.С. і Наточина Ю.В., 1973)

Принцип. З молочної кислоти у присутності сульфатної (сірчаної) і ортофосфатної (фосфорної) кислот та солей купруму (міді) утворюється оцтовий альдегід, який, реагуючи з параоксидифенілом (С₆Н₅С₆Н₄ОН), утворює фіолетово забарвлені продукти.

Прилади: фотоелектроколориметр, центрифуга, пробірки, піпетки.

Реактиви: 1) концентрована сульфатна кислота, що витримує пробу Саваля; 2) суміш із 3,0 мл міді сульфату ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, ч.д.а.; х.ч.) і 9 мл ортофосфатної (H_3PO_4) кислоти. Повинен утворитися гомогенний розчин, на що потрібен деякий час; 3) 1,5% розчин параоксидифенілу. Розчиняють 15 мг реактиву в 1 мл диметилформаміду; 4) 5% розчин трихлороцтової (ТХО) кислоти; 5) стандартний розчин молочної кислоти – 180 мг/100 мл. У скляному бюксі зважують 180 мг свіжої молочної кислоти (слабовиражений кремений відтінок) і переносять у мірну колбу на 100 мл, об'єм доводять дистильованою водою до мітки. В 1 мл розчину міститься 1,8 мг молочної кислоти. З цього розчину відбирають 1 мл, переносять у наступну мірну колбу на 100 мл і доводять об'єм до мітки дистильованою водою. 1 мл робочого розчину містить 0,018 мг молочної кислоти (200 нмоль). Його використовують для побудови калібрувального графіка.

У пробірки для взяття крові вносять суміш натрію фториду і трилону. Кров після взяття негайно охолоджують.

Хід визначення. 1. 0,02 мл крові вносять в 1 мл 5% трихлороцтової кислоти. Через 3–5 хв центрифугують 15 хв за 3000 об./хв.

2. До 0,2 мл центрифугату додають 0,1 мл суміші міді сульфату і ортофосфатної кислоти (реактив 2) та 2,5 мл концентрованої сульфатної кислоти. Енергійно струшують і рівно через 3 хв ставлять у киплячу водяну баню рівно на 3 хв, потім охолоджують 3 хв у льодяній воді.

3. Додають 1 краплю розчину параоксидифенілу (крапля повинна попасти у центр пробірки), струшують і залишають стояти 10 хв за кімнатної температури.

4. Нагрівають 1,5 хв у киплячій водяній бані, охолоджують у воді і фотометрують за довжини хвилі 565 нм у кюветах з шириною оптичного шару 5 мм.

Одночасно ставлять контрольну пробу, в якій замість 0,2 мл безбілкового фільтрату (п. 2) використовують 5% розчин трихлороцтової кислоти та калібрувальні проби, у них беруть розчини ТХО, що містять у 0,2 мл 2–20 нмоль молочної кислоти або молочно-кислого літію (табл. 8.4).

Таблиця 8.4

Дані щодо побудови калібрувального графіка для визначення молочної кислоти

№ пробірки	Стандартний розчин молочної кислоти, мл	Дистильована вода, мл	Концентрація молочної кислоти		
			мг	нмоль	ммоль/л
1	0,01	0,19	0,00018	2,0	0,5
2	0,02	0,18	0,00036	4,0	1,0
3	0,05	0,15	0,0009	10,0	2,5
4	0,10	0,10	0,0018	20,0	5,0

Обробляють їх так само, як і дослідні (див. пп. 2–4). Забарвлення калібрувальної проби, в якій міститься 2 ммоль молочної кислоти, відповідає пробі, що містить 0,5 ммоль/л; відповідно, забарвлення проби, яка містить 20 ммоль, відповідає концентрації 5 ммоль/л.

Діагностичне значення. Молочна кислота утворюється у разі анаеробного окиснення глюкози – гліколізу, перетворенні пірувату в лактат. У нормі в сироватці крові великої рогатої худоби міститься 0,95–1,43 ммоль/л (8,5–13 мг/100 мл) молочної кислоти, овець і свиней – 0,95–1,21; коней – 0,56–1,44; собак – 1,43–3,17 ммоль/л. За надлишку легкоферментованих вуглеводів утворена в рубці велика кількість молочної кислоти надходить у кров, виникає *лактатемія*. Виражену лактатемію спостерігають у разі ацидозу рубця внаслідок посиленого утворення лактози з крохмалю і цукру, поїдання великої кількості цукрового і напівцукрового буряку, кукурудзи у стадії молочно-воскової стиглості, зернових злаків, які містять багато крохмалю; міоглобінурії коней – в результаті посиленого розпаду глікогену м'язів за фізичного навантаження; судомах (епілепсії і тетанії); у разі хвороб серця, легень, анемії, асфіксії новонароджених тварин, які супроводжуються гіпоксією і перетворенням глюкози анаеробним шляхом (лактоацидоз). Лактатемію виявляють також за нестачі вітаміну В₁ (тіаміну), який прискорює розпад лактату, у разі уражень печінки, підшлункової залози та посилення гліюконеогенезу.

П р и м і т к а. Взятю для дослідження кров необхідно охолоджувати.

Література: [21, С. 326–328; 22, С. 335–336; 60, С. 124–125].

8.5. Визначення вмісту глікопротеїнів і протеогліканів сполучної тканини

До складу основної міжклітинної речовини сполучної тканини, крім колагену, входять неколагенові білки–глікопротеїни (ГП) та протеоглікани. **Глікопротеїни** – це група складних білків, які побудовані з простого білка і простетичної групи, що представлена вуглеводом – гексозою або її похідним. Вуглеводною частиною глікопротеїнів можуть бути гексозаміни, галактоза, глюкоза, фукоза, сіалові кислоти та ін. ГП мають електрофоретичну рухомість альфа-1- та альфа-2-глобулінів і відомі як білки “гострої фази”. Майже усі білки плазми, крім альбумінів, являють собою глікопротеїни. Це численна група білків з різноманітними функціями. Найбільш відомі представники речовин цієї групи – різні ферменти (холінестераза, церулоплазмін), гормони (гонадотропін,

еритропоетин), групоспецифічні субстанції крові (протромбін, фібриноген), гамма-глобуліни, інтерферон, урмукопротеїни, плевомукоїди, гаптоглобін, трансферин, колагени та інші.

У плазмі крові ГП виконують захисну функцію завдяки вмісту в них сіалових кислот (сіалоглікопротеїнів), які, займаючи в молекулі ГП крайнє положення, здатні інактивувати різноманітні віруси. Сіалові кислоти у разі пошкодження оболонок клітин швидко з'являються в сироватці крові і їх концентрація корелює зі ступенем тяжкості патологічного процесу. Вона зростає за деструктивних та запальних процесів в органах, які містять сполучнотканинні утворення, елементи строми або складаються, переважно, із сполучної тканини, наприклад кістково-суглобовий апарат. Під час пошкодження таких тканин рівень у крові сіалових кислот та глікопротеїнів змінюється здебільшого в одному напрямі. У разі патологій інших органів така синхронізація може бути відсутньою.

Протеоглікани – вуглеводно-білкові сполуки, які містять невелику білкову частину (5–10%) та глікозаміноглікани (ГАГ) – 90–95%.

ГАГ (або кислі мукополісахариди) – це гетерополісахариди, які побудовані з великої кількості однакових дисахаридних одиниць, до складу яких входять два різні ізомери: гексозаміни та уронові кислоти. До ГАГ належать гіалуронова кислота, хондроїтин (несульфатовані ГАГ), хондроїтинсульфати (4 та 6), кератансульфат, дерматансульфат, гепарансульфат та гепарин (сульфатовані ГАГ). Вони виробляються і секретуються фібробластами та їх різновидами в органах і тканинах (печінка, сполучна, хрящова та інші види тканин) під впливом катехоламінів – нейрогуморальних агентів симпатико-адреналової системи.

Хондроїтин-4- та *хондроїтин-6-сульфати* побудовані з дисахаридних мономерів, до яких належать N-ацетилгалактозамін і глюкуронова кислота; до залишку N-ацетилгалактозаміну у положенні 4 або 6 приєднується залишок сульфатної кислоти. У корів та биків вміст хондроїтин-4-сульфату превалює у хрящі, кістковій тканині, стромі печінки, аорті, а хондроїтин-6-сульфату – у шкірі, зв'язках, сухожилках, хрящах, клапанах серця, міжхребцевих дисках. У нирках, легенях і матці хондроїтинсульфати виявлені у значній кількості, але співвідношення вмісту вказаних фракцій у різних тканинах практично не вивчені. Вважають, що хондроїтинсульфати регулюють іонну рівновагу, проникність тканин, беруть участь у їх осифікації, зв'язують екстрацелюлярну воду, регулюють процеси дифузії, модифікують структуру колагенових фібрил та виконують інші важливі функції.

Кератансульфати не містять глюкуронової кислоти. Кератансульфат I виділений з рогівки ока, а кератансульфат II – глікозаміноглікан хряща і кісток. *Дерматансульфат* кількісно переважає серед ГАГ дерми, знаходиться також в артеріях, роговій оболонці, склері, стабілізує волокна

колагену і має антикоагуляційну дію [5]. *Гепарин* є компонентом тучних клітин. Він локалізується у печінці, легенях, стінках артерій, шкірі. Гепарин – сильний інгібітор згортання крові. *Гепарансульфат* знаходиться переважно на поверхні ендотеліальних клітин і тромбоцитів.

Головним ГАГ кісткової тканини є хондроїтин-4-сульфат, у ній також присутні гіалуронова кислота, кератансульфат і невелика кількість хондроїтин-6-сульфату. У хрящовому матриксі протеоглікани становлять 10–20% молекулярної маси. У гіаліновому хрящі переважає хондроїтин-4-сульфат, а у фіброзному – хондроїтин-6-сульфат.

8.5.1. Визначення вмісту глікопротеїнів у сироватці крові (за методом Штейнберга-Доценка)

Принцип методу. Розчин фруктози (під час кип'ятіння глюкоза перетворюється на фруктозу) у присутності амонію молібдату та концентрованої сульфатної кислоти дає синє забарвлення, інтенсивність якого залежить від кількості глікопротеїнів.

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

Реактиви: 1) 20% розчин трихлороцтової (ТХО) кислоти (для осадження білків); 2) робоча суміш: до 87 мл дистильованої води додають 3 мл концентрованої H_2SO_4 , обережно перемішують і сюди ж доливають 15 мл 10% розчину молібденовокислого амонію.

Хід визначення. У пробірку вносять по 0,2 мл сироватки крові, 0,4 мл H_2O , 1 мл 20% ТХО кислоти. Суміш ретельно перемішують, закривають центрифужною пробіркою, кип'ятять на водяній бані точно 20 хв, після чого охолоджують і центрифугують. 1 мл центрифугату перемішують з 3,5 мл робочої суміші і кип'ятять на водяній бані 20 хв. Після охолодження проби колориметрують на фотоелектроколориметрі у кюветі з товщиною шару 10 мм (за червоного світлофільтра).

Контролем є проба, оброблена так само, як і дослідна, але замість сироватки в ній беруть 0,2 мл дистильованої води. Показниками вмісту глікопротеїнів є значення екстинкції в умовних одиницях.

Діагностичне значення. У тварин більшості видів вміст глікопротеїнів коливається в межах 0,25–0,45 од, зокрема у корів з продуктивністю 6–7 тис. кг молока на рік – 0,40–0,55 од, конематок – 0,40–0,49; собак – 0,32–0,48 (Кібкало Д.В., 2008) [34]; котів – 0,29–0,47 од (0,34±0,02) (Ющенко Г.О., 2005) [95].

Концентрація глікопротеїнів зростає найперше як реакція-відповідь на патологічний, переважно запальний або деструктивний процес, під час різних захворювань внутрішніх органів, у тому числі у разі холециститу,

плевриту, пневмонії, туберкульозу легень, гломерулонефриту, подагри, пухлин, а також гострого та хронічного лейкозів, артрозів і артритів та інших деструктивних і дезорганізаційних процесів у сполучнотканинних структурах.

У корів, хворих на гепатодистрофію, вміст глікопротеїнів майже не змінюється ($0,42-0,51$ од; $0,47\pm 0,013$), за цирозу печінки зростає до $0,55-0,68$ од ($0,60\pm 0,22$) [33], у корів, хворих на остеодистрофію, збільшується до $0,69\pm 0,02$ од [8], у бичків, хворих на рахіт, – до $0,80\pm 0,03$ г/л (у здорових – $0,59\pm 0,04$) [89], у котів з сечокам'яною хворобою – $0,51-0,71$ од ($0,62\pm 0,03$) порівняно з $0,34\pm 0,02$ – у здорових [95].

Література: [8; 33; 34; 37, С. 217–218; 89; 92; 95].

8.5.2. Визначення сіалових кислот у сироватці крові (за методом Гесса)

Принцип методу. В результаті гідролізу безбілкового фільтрату сироватки крові зі складу сіалоглікопротеїнів виділяються сіалові кислоти, які з розчином сульфатної кислоти в льодяній оцтовій кислоті у киплячій водяній бані дають кольорову реакцію.

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

Реактиви: 1) розчин трихлороцтової кислоти – 10 г/100 мл; 2) розчин сульфатної (сірчаної) кислоти в крижаній оцтовій кислоті, приготований додаванням невеликими порціями до 95 частин крижаної оцтової кислоти 5 частин концентрованої сульфатної кислоти; 3) основний водний розчин стандартної проби, який готують із кристалічної N-ацетилнейрамінової кислоти – 50 мг/100 мл.

Хід визначення. 1. У центрифужну пробірку наливають 1,0 мл сироватки крові і, обережно її струшуючи, додають 10 мл розчину трихлороцтової кислоти. Пробірку ставлять точно на 1 хв в киплячу водяну баню, потім охолоджують (поміщають пробірку на 5 хв у холодну водопровідну воду), центрифугують 5 хв за 1000–2000 об./хв.

2. До 0,4 мл відібраної надосадової рідини додають 5,0 мл оцтово-сульфатної суміші, прикривають центрифужними пробірками і повторно прогривають у киплячій водяній бані протягом 30 хв. При цьому безбарвний розчин поступово забарвлюється в червоно-фіолетовий.

3. Після охолодження в крижаній воді (5 хв) або під краном у струмені холодної водопровідної води вимірюють оптичну густину дослідної проби і стандарту на фотоелектроколориметрі із зеленим світлофільтром (500–560 нм) у кюветі з товщиною робочого шару 10 мм

відносно контролю. Як контрольну пробу використовують розчин сульфатної (сірчаної) кислоти в крижаній оцтовій кислоті (реактив 2). Результат знімають за шкалою оптичної густини. За відсутності стандартного розчину результат виражають в умовних одиницях, для чого одержану величину екстинції множать на 1000 (іноді відповідь дають безпосередньо в значеннях оптичної густини). Проте слід вважати за правильне вираз результатів у значеннях концентрації N-ацетилнейрамінової кислоти. У останньому випадку розрахунок ведуть за калібрувальним графіком.

Для отримання даних до побудови калібрувального графіка з основного стандартного розчину N-ацетилнейрамінової кислоти готують робочі розчини (табл. 8.5).

Таблиця 8.5

**Схема приготування робочих розчинів
для побудови калібрувального графіка**

№ про- бірки	Робочі стандартні розчини		Концентрація N-ацетилнейрамінової кислоти у пробі	
	основний стандартний розчин N-ацетилнейрамінової кислоти, мл	дистильована вода, мл	мг/100 мл	ммоль/л
1	0,10	0,30	25,0	0,80
2	0,15	0,25	37,5	1,21
3	0,20	0,20	50,0	1,61
4	0,25	0,15	62,5	2,02
5	0,30	0,10	75,0	2,42
6	0,40	-	100,0	3,23

До розчинів додають по 5,0 мл оцтово-сульфатної суміші і обробляють їх так само, як дослідні проби (пп. 2, 3).

Діагностичне значення. Вміст сіалових кислот у сироватці крові кішок становить 1,77–2,13 ммоль/л. Кількість їх зростає за інфекційних хвороб, пухлин, лейкозів, дистрофічних і запальних процесів у нирках (нефрит, нефросклероз, нефротичний синдром) і печінці (гепатит, гепатодистрофія), за уражень сполучної тканини (колагенози). За даними Д.В.Морозенка (2008) [65] вміст сіалових кислот зростає у кішок за хронічної ниркової недостатності.

Література: [21, С. 323–324; 22, С. 331–333; 60, С. 127–128; 65].

8.5.3. Визначення вмісту хондроїтинсульфатів у сироватці крові (метод Nemeth-Csoka)

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) 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) 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 (за зеленого світлофільтра) відносно контролю. Контрольну пробу обробляють так само, як і дослідну, але замість сироватки додають 0,1 мл дистильованої води.

Розрахунок проводять за формулою:

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

де E – екстинція дослідної проби; b – концентрація хондроїтинсульфатів за стандартом.

Література: [4, С. 44; 37, С. 218; 82].

8.5.4. Визначення вмісту фракцій глікозаміногліканів (ГАГ) у сироватці крові (за Штерн М.П. зі співавторами)

Принцип методу: полягає в осадженні ГАГ резорцином і поетапному вимиванню фракцій солями NaCl різної концентрації.

Обладнання: фотоелектроколориметр (КФК-2, КФК-3); хімічні пробірки; піпетки на 0,05; 0,1; 0,5; 1 і 5 мл.

Реактиви: 1) 0,5% розчин резорцину; 2) 1 М розчин натрію хлориду; 3) дистильована вода.

Хід визначення. В одну пробірку (дослід) вносять 2,35 мл дистильованої води, 0,05 мл сироватки крові і 1 мл 0,5% розчину резорцину; у другу – 3,35 мл дистильованої води і 0,05 мл сироватки крові. Потім обидві проби ретельно перемішують. Через 30 хв вимірюється інтенсивність помутніння обох проб на КФК за довжини хвилі 400 нм у кюветі з шириною оптичного шару 5 мм проти дистильованої води. Розраховують різницю показників оптичної щільності між значеннями дослідної і контрольної пробірок, яка відображає загальний уміст глікозаміногліканів. Цей показник можна оцінити у вигляді значення оптичної щільності, помноженого на 100, або за допомогою стандартної проби з використанням одного з різновидів ГАГ, наприклад, гепарину.

Для визначення *першої фракції* до дослідної та контрольної проб додають по 0,05 мл 1 М розчину натрію хлориду. Проби ретельно перемішують. Через 10 хв вимірюють показники оптичної щільності проб і, визначаючи різницю між дослідом та контролем, отримують таким чином першу різницю. Зменшують вихідний результат (загальний уміст глікозаміногліканів) на першу різницю і отримують показник, який відображає вміст першої фракції (*хондроїтин-6-сульфату*).

Для визначення *другої фракції* (*хондроїтин-4-сульфату*) до дослідної та контрольної проб додають по 0,1 мл 1 М розчину натрію хлориду і ретельно перемішують. Через 10 хв вимірюють показники оптичної щільності проб. Визначають різницю між дослідом та контролем (*друга різниця*). З першої різниці віднімають другу і отримують значення *другої фракції*.

Вміст *третьої фракції* відповідає *другій різниці*.

Значення фракцій визначають в одиницях екстинції ФЕК.

Діагностичне значення. Зміни окремих сироваткових фракцій глікозаміногліканів досліджують за різних патологій, зокрема остеодистрофії, гепатодистрофії, цирозу печінки. Частка кожної з окремих фракцій ГАГ у разі виникнення патології змінюється у складі суми фракцій по-різному.

У першій фракції глікозаміногліканів переважає хондроїтин-6-фосфат, друга фракція здебільшого складається із хондроїтин-4-сульфату, а в третій – переважає гепарансульфат.

У тварин більшості видів рівень загальних хондроїтинсульфатів (ХСТ) знаходиться в межах 0,03–0,15 г/л [8; 33], у котів – 0,13–0,17 г/л (0,15±0,01) [95], у молодняку великої рогатої худоби – 0,19±0,02 од [89]. Рівень їх у сироватці крові зростає за багатьох гострих запальних процесів, хронічного гепатиту, цирозу печінки, особливо біліарного, амілоїдозу нирок, рахіту, остеодистрофії, остеоартрозу, у сечі – за уролітіазу. Підвищення концентрації ХСТ у крові за хвороб печінки зумовлено втратою або зниженням функції розщеплення їх гепатоцитами.

У котів, хворих на сечокам'яну хворобу, вміст ХСТ збільшується до 0,25–0,79 г/л (0,54±0,05) [95].

У корів, хворих на гепатодистрофію, вміст ХСТ не змінюється (0,03–0,06 г/л), за цирозу – зростає до 0,11–0,14 г/л [33], остеодистрофії – 0,21–0,25 г/л [8]. Змінюється співвідношення окремих фракцій ГАГ у разі патології печінки у корів. За гепатодистрофії незначно зростає вміст першої і третьої фракцій ГАГ – хондроїтин-6- і гепарансульфатів, за цирозу печінки збільшується вміст усіх фракцій: першої – до 7,0–9,3 од (норма – 3,6–6,8), другої (хондроїтин-4-сульфату) – до 3,5–3,9 од (норма – 1,9–2,5), третьої (гепарансульфату) – до 2,1–2,5 од (норма – 1,4–1,7). Зростання гепарансульфату за цирозу дає змогу уточнити діагноз, оскільки ця фракція ГАГ, на відміну від хондроїтин-4- і хондроїтин-6-сульфатів, не виявляється у тканинах скелета і за остеодистрофії вміст її майже не змінюється (1,3–1,9 од). Сума всіх фракцій ГАГ у корів, хворих на гепатодистрофію, становить 9,48±0,52 од, цироз печінки – 14,07±0,08 [33], остеодистрофію – 18,3±0,29 од (в нормі – 7,98±0,43) [8]. За остеодистрофії корів особливо інтенсивно збільшується вміст другої фракції ГАГ (6,1–8,1 од), менше – першої – 8,2–10,0 од (за норми, відповідно, 1,9–2,5 та 3,6–6,8 од) [8]. У молодняку, хворого на рахіт, збільшується вміст усіх фракцій ГАГ з 10,8±0,3 до 27,3±1,5 од, зокрема другої, в якій переважає хондроїтин-4-сульфат, – з 2,4±0,1 до 8,0±0,5 од [89]. У сироватці крові здорових котів сума фракцій ГАГ становить 9,55–19,30 од (14,8±1,04), за сечокам'яної хвороби – 11,02–29,13 од (16,95±1,47). Збільшення ГАГ відбувається внаслідок зростання переважно першої фракції. Показовими є зміни ГАГ у сечі в разі сечокам'яної хвороби: у сечі клінічно здорових котів сума фракцій ГАГ становить 112,1–132,4 од (123,8±1,6), у разі сечокам'яної хвороби – 9,1–35,0 од [95].

Література: [8; 33; 37; 84; 89; 92; 95].

РОЗДІЛ 9

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ ОБМІНУ ЛІПІДІВ

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: внаслідок повного розпаду 1 г жиру виділяється 9,3 ккал енергії, що удвічі більше порівняно з вуглеводами і білками. Енергозабезпечення організму за рахунок жирів відбувається переважно через дефіцит вуглеводів або в разі 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 (у результаті окиснення 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 нейтральні жири, головним чином триацилгліцероли. Якщо до їх складу входить однорідна жирна кислота, то вони називаються простими, за різних жирних кислот – змішаними. Складні ліпіди у своїй молекулі містять три або більшу кількість різних за структурою простих речовин: спирт, карбонові кислоти, азотисті основи, залишки вуглеводів, похідні ортофосфатної кислоти. До них належать: фосfolіпіди (лецитини, кефаліни, кардіолін, плазмалогени), гліколіпіди (цереброзиди й гангліозиди), стероли і стериди (холестерол, жовчні кислоти, провітаміни D) та ліпопротеїни.

Жирні кислоти, що входять до складу природних триацилгліцеролів, як правило, мають нерозгалужений ланцюг атомів з однією карбоксильною групою. Жирні кислоти є насичені й ненасичені. У карбогідрогеновому (CH_2) радикалі насичених жирних кислот всі атоми карбону насичені гідрогеном (воднем), у ненасичених окремі атоми карбону не зайняті гідрогеном і тому між сусідніми атомами карбону утворюються подвійні зв'язки. Ненасичені жирні кислоти, що мають більше одного подвійного зв'язку, не синтезуються в організмі, тому вони називаються *незамінними* (лінолева, ліноленова).

Дослідження обміну ліпідів проводять за наступними показниками: визначають загальні ліпіди, триацилгліцериди (триацилгліцероли), неетерифіковані жирні кислоти (НЕЖК), загальний та ефірозв'язаний холестерол, кетонові тіла.

9.1. Визначення загальних ліпідів у сироватці крові (за реакцією із сульфофосфovanіліновим реактивом)

Принцип методу. Продукти розпаду ненасичених ліпідів після гідролізу сульфатною (сірчаною) кислотою взаємодіють із фосфорнованіліновим реактивом з утворенням забарвленого в рожевий колір комплексу, який має максимум поглинання світла за довжини хвилі 530 нм.

Обладнання: фотоелектроколориметр, водяний термостат або водяна баня, яка може підтримувати температуру $+ 100 \pm 2^\circ \text{C}$, піпетки, місткістю 2 та 0,01 мл; пробірки.

Реактиви: 1) фосфорно-ваніліновий реагент; 2) еталонний розчин ліпідів (1,8 г/л); 3) концентрована сульфатна кислота, яка витримує пробу Саваля (додатково до реактивів).

Використовують набір реактивів фірми «Simko ltd», м. Львів або ТОВ НВП «Філісіт-Діагностика», м. Дніпропетровськ.

Хід визначення. 1. До 0,01 мл сироватки крові додають 1 мл концентрованої сульфатної кислоти. Змішують і ставлять у киплячу водяну баню на 10 хв. Водяна баня має бути заповнена водою не нижче рівня реактивів у пробірці.

2. Охолоджують у холодній воді 5 хв.

3. Обережно додають 2 мл фосфорно-ванілінового реактиву, змішують і повільно охолоджують у воді упродовж 2 хв.

4. Не пізніше ніж через 10 хв визначають оптичну густину в 1 см кюветі за довжини хвилі 500–560 нм (максимум поглинання за 530 нм) відносно контролю (замість сироватки беруть 0,01 мл води).

5. Аналогічно обробляють 0,01 мл еталонного розчину ліпідів і 0,01 мл бідистильованої води (контроль). Як контроль можна використовувати лише воду без додавання реактивів.

6. Розрахунок вмісту загальних ліпідів виконують за формулою:

$$\text{Загальні ліпіди (г/л)} = E_{\text{д}} / E_{\text{ст}} \times 8,$$

де $E_{\text{д}}$ – екстинція дослідної проби; $E_{\text{ст}}$ – екстинція еталонного розчину; 8 – концентрація загальних ліпідів у еталонному розчині, г/л.

П р и м і т к и: 1. За вмісту загальних ліпідів більше 8 г/л пробу необхідно розвести дистильованою водою і аналіз провести повторно.

2. Загальні ліпіди у сироватці крові зберігаються до 48 год за температури $2-8^\circ \text{C}$.

3. Проби не заморожувати і не використовувати сироватку зі слідами гемолізу.

Діагностичне значення. Концентрація загальних ліпідів у сироватці крові великої рогатої худоби становить 2,8–6 г/л, свиней – 3,5–4,0; курей –

3,6–21,0 г/л. Фізіологічну гіперліпідемію спостерігають через 1–3 год після згодовування кормів, збагачених ліпідами, а також у самок птиці за їх фізіологічного дозрівання, у період підготовки до яйцекладки та в період інтенсивної продуктивності.

Патологічна гіперліпідемія зумовлюється ожирінням корів, годівлею концентратного типу, гострим і хронічним гепатитом, хронічним нефритом, гіпофункцією щитоподібної залози, недостатньою активністю сироваткової ліпопротеїнліпази.

Література: [32, С. 106–114; 60, С. 137–139].

9.2. Визначення триацилгліцеролів у сироватці крові (метод Флетчера)

Принцип методу. Триацилгліцероли гідролізуються гідроксидом калію в гліцерин, за окиснення якого утворюється формальдегід. Його визначають за реакцією з метилацетоном та іонами амонію.

Обладнання: фотоелектроколориметр, центрифуга, шуттель-апарат, водяний термостат (60 ± 2 °С).

Реактиви: 1) стандартний розчин триолеїну (3,39 ммоль/л) в ізопропіловому спирті; 2) ацетилацетон (0,75 г/л у 20% розчині ізопропілового спирту; 3) окиснювальний розчин (5,6 ммоль/л в ацетатному буфері); 4) калію гідроксид (1 моль/л); 5) ізопропіловий спирт (ізопропанол); 6) адсорбент.

Використовують набір реактивів фірми Lacheta, Чехія, ТОВ НВП “Філісіт-Діагностика”, м. Дніпропетровськ.

Хід виконання. Реакцію виконують у пробірках з шліфованими пробками.

Компоненти	Проба	Стандарт	Контроль
Сироватка крові	0,10	–	–
Реактив 1	–	0,10	–
Дистильована вода	–	–	0,10
Реактив 5	4,00	4,00	4,00
Мірною ложечкою у всі пробірки добавляють по 0,4 г реактиву 6 (3 ложечки), перемішують, пробірки струшують упродовж 10–15 хв і центрифугують 5 хв за 3000 об./хв. У суху пробірку відмірюють:			
Центрифугат	2,00	2,00	2,00
Реактив 4	0,50	0,50	0,50

1. Вміст перемішують, пробірки закривають корками та інкубують 5–10 хв за температури 60 ± 2 °С. Охолоджують 5 хв у холодній воді й у всі пробірки добавляють по 0,5 мл реактиву 3. Залишають на 10 хв за $10\text{--}25$ °С.

2. У всі пробірки додають по 0,5 мл реактиву 2. Перемішують та інкубують точно 30 ± 1 хв за температури $60 \pm 2,0^\circ \text{C}$.

3. Після охолодження вимірюють оптичну густину проби (A_1) і стандарту (A_2) відносно контрольного розчину за довжини хвилі 405–420 нм у кюветах з товщиною робочого шару 1 см.

Розрахунок: *Триацилгліцероли (ммоль/л) = 3,39x A₁/A₂.*

П р и м і т к и: 1. Для аналізу краще використовувати плазму крові, а не сироватку.

2. Як антикоагулянт застосовують ЕДТА натрієву або калієву сіль (1 мг на 1мл крові), не рекомендується використовувати гепарин.

3. Адсорбент (реактив б) додають до набору реактивів. У повній ложечці міститься 0,13–0,14 г адсорбенту.

4. Вміст триацилгліцеролів у плазмі не змінюється упродовж 8 тижнів за температури -20°C .

5. Посуд має бути очищений від жиру (можна попереднім споліскуванням ізопропанолом) і синтетичних мийних засобів.

6. Якщо результат понад 4 ммоль/л, сироватку розводять водою 1:1 і аналіз повторюють; є) реактиви 1 і 5 містять ізопропіловий спирт, який є займистою речовиною.

Діагностичне значення. Концентрація триацилгліцеролів у сироватці крові збільшується: а) у разі згодовування кормів, збагачених жиром або багатих на легкоферментовані вуглеводи; б) за нестачі в раціоні протеїну і ліпотропних речовин; в) за гострого гепатиту, жирової гепатодистрофії, нефротичного синдрому, діабету, гіпотиреозу, панкреатиту.

Зниження рівня триацилгліцеролів спостерігають за низького рівня годівлі та посиленої молоковіддачі. Вміст тригліцеридів у сироватці крові, ммоль/л: ВРХ – 0,22–0,60; вівці – 0,66–0,88; свині – 0,22–0,88.

Література: [21, С. 348–350; 22, С. 359–362].

9.3. Визначення β -ліпопротеїдів у сироватці крові (за методом Бурштейна і Самаї)

Принцип методу. Додавання до сироватки крові кальцію хлориду і гепарину порушує колоїдну стійкість білків, що входять до складу β -ліпопротеїдів і пре- β -ліпопротеїдів. Утворюється гепарин-ліпопро-

теїновий комплекс, який випадає в осад, що проявляється помутнінням реакційної суміші. Ступінь помутніння пропорційний вмісту β -ліпопротеїдів і пре- β -ліпопротеїдів.

Обладнання: фотоелектроколориметр або спектрофотометр.

Реактиви: 1) 0,025 М (2,8%) розчин кальцію хлориду: 0,5475 г 6-водного кальцію хлориду ($\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) або 0,3675 г двоводного ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) розчиняють у мірній колбі на 100 мл дистильованою водою і доводять об'єм водою до мітки. Можна використати 10% розчин кальцію хлориду в ампулах: 2,8 мл розчину вносять у колбу на 100 мл і доводять дистильованою водою до мітки. Розчин стабільний за умови зберігання в холодильнику; 2) розчин гепарину активністю 1000 МО в 1 мл. Препарати гепарину, які містять 5000 МО, 10000 і 20000 МО в 1 мл, розводять відповідно у 5, 10 і 20 разів дистильованою водою.

Хід визначення. До 0,2 мл сироватки додають 2 мл розчину кальцію хлориду і 0,04 мл розчину гепарину. Перемішують і в проміжку часу не більше 4 хв вимірюють оптичну густину проби за довжини хвилі 590–690 нм (червоний світлофільтр) у кюветі з товщиною робочого шару 5 мм проти дистильованої води.

Розрахунок: вміст β -ЛП (і пре- β -ЛП) виражають в умовних одиницях–одиницях екстинції, помножених на 100. Помноживши одержаний результат на коефіцієнт 116, одержують концентрацію β -ЛП у мг/100 мл сироватки.

Діагностичне значення. Ліпопротеїди (ЛП) сироватки крові – це комплекс вільних жирних кислот, триацилгліцеролів, холестеролу, фосфоліпідів з альбумінами або глобулінами. Вони забезпечують транспорт ліпідів уздовж шляху циркуляції й далі – до місць депонування або утилізації, входять до складу клітинних мембран і ферментів, знешкоджують токсини, транспортують надлишок вільного холестеролу з клітин периферичних тканин у печінку, де він перетворюється у жовчні кислоти і виділяється із жовчю в кишечник. За плавучістю ЛП поділяються на хіломікрони (хм), ліпопротеїди дуже низької густини (ЛПДНГ, пре- бета – ЛП), ліпопротеїди низької (ЛПНГ, бета – ЛП) та високої густини (ЛПВГ, альфа – ЛП).

ЛПНГ (бета – ліпопротеїди, β – ЛП) є основною фракцією ліпідів, вміст якої у сироватці крові перевищує 50% їх загальної кількості (60–70%). Це – основна транспортна форма ліпідів. Уміст їх у сироватці крові людей становить 35–55 умовних одиниць або 400–600 мг/100 мл. Підвищений вміст β -ліпопротеїдів виявляють за надлишку в раціоні легкоферментованих вуглеводів, жирів, гострого гепатиту, ожиріння, гіпотиреозу, діабету, холестазу та нефротичного синдрому; *знижений* – за тривалого дефіциту в раціоні протеїну або незамінних ліпотропних амінокислот, за хвороб печінки, гіпертиреозу.

Ліпопротеїди високої густини (ЛПВГ, α -ЛП), на відміну від інших, активно виводять холестерол із клітин шляхом етерифікації, чим полегшують надходження його в печінку і виведення у складі жовчі в кишечник.

Література: [12, С. 57–58; 21, С. 356–358; 22, С. 368–369; 60, С. 148–149].

9.4. Визначення загального холестеролу

9.4.1. Визначення загального холестеролу (за методом Златкіса-Зака)

Принцип методу. Холестерол та його ефіри у присутності сульфатної (сірчаної) та оцтової кислот і феруму хлориду утворюють забарвлений комплекс, який має максимум поглинання за довжини хвилі 510–560 нм.

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

Реактиви: 1) 0,2% розчин феруму хлориду ($\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$) в льодяній (99,9%) оцтовій кислоті (CH_3COOH), чда (реагент 1); 2) концентрована сульфатна кислота, ч (реагент 2); 3) стандарт холе-стеролу, чда (5,17 ммоль/л). 210 мг 95% холестеролу, розчиненого у 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 за кімнатної температури. Аналогічно обробляють 0,02 мл стандарту холестеролу і контроль – 0,02 мл дистильованої води. Визначають оптичну густину проби і стандарту в кюветі з шириною оптичного шару 0,5 см за довжини хвилі 510–560 нм відносно контролю.

Розрахунок умісту холестеролу проводять за формулою:

$$\text{Холестерол (ммоль/л)} = \frac{E \, \Delta n}{E \, c \, m} \times 5,17,$$

де $E \, \Delta n$ – екстинція дослідної проби; $E \, c \, m$ – 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 становитиме:

$$(0,328 \times 5,17) : 0,454 = 3,73 \text{ ммоль/л.}$$

За вмісту холестеролу понад 10 ммоль/л сироватку крові слід розбавити ізотонічним розчином NaCl 1:1, аналіз провести повторно, а результат помножити на 2. *Не можна* досліджувати *гемолізовану* сироватку і проби з високим умістом білірубіну.

Стабільність досліджуваних зразків. Холестерол у досліджуваних пробах зберігається до 24 год за кімнатної температури, до 72 – за 2–8° С, до 6 міс. – у замороженому стані.

П р и м і т к и: 1. Реагенти 1 і 2 містять концентровані розчини сульфатної і оцтової кислот.

2. У разі потрапляння на шкіру промити великою кількістю дистильованої води.

Література: [4, С. 32–33; 32, С. 127–129].

9.4.2. Визначення загального холестеролу (за методом Ілька)

Принцип методу. Холестерол у присутності суміші льодяної оцтової кислоти, оцтового ангідриду і сульфатної 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.

Реактив 1: а) льодяна оцтова кислота, ч; б) оцтовий ангідрид, хч; в) концентрована сульфатна кислота, хч, чда. Під час змішування інгредієнтів (співвідношення 1:5:1) не допускається нагрівання суміші, тому колбу, у якій готують реактив, поміщають у посуд із льодом, а сульфатну кислоту додають в останню чергу краплями, постійно перемішуючи. Суміш має бути прозорою або з жовтуватим відтінком (довго зберігається у холодильнику у посуді з темного скла з притертою пробкою);

Реактив 2 – стандартний розчин холестеролу (100 мг холестеролу в 100 мл хлороформу), хлороформ фармакопейний.

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 за температури +37° С. Рідину колориметрують на фотоколориметрі або спектрофотометрі за довжини хвилі 650–660 нм у кюветі з товщиною

оптичного шару 0,5 см відносно контролю (2 мл реактиву 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.

Розрахунки краще проводити не за калібрувальним графіком, а за паралельно обробленим стандартним розчином холестеролу (5,2 ммоль/л). 200 мг холестеролу розчиняють у мірній колбі на 100 мл у 2,5 мл хлороформу і доводять до мітки абсолютним спиртом. Розчин зберігають у холодильнику в посуді з темного скла з притертою пробкою і додатковою герметизацією парафіном. Реактив 1 добавляють до 0,1 мл стандартного розчину холестеролу. Після інкубації колориметрують разом із дослідними пробами. Розрахунок проводять за формулою:

$$\text{Холестерол, ммоль} = E_{\text{досл}}/E_{\text{ст}} \times 5,2,$$

де $E_{\text{досл}}$ – екстинція дослідної проби; $E_{\text{ст}}$ – екстинція стандарту; 5,2 ммоль/л – концентрація стандартного розчину холестеролу.

П р и м і т к а. У ході постановки реакції слід використовувати абсолютно чисті і сухі піпетки та пробірки. Співвідношення інгредієнтів розраховане так, що білки сироватки крові не випадають в осад. Помутніння може виникати тільки за наявності води у реактиві або посуді.

Діагностичне значення. З діагностичною метою в сироватці (плазмі) крові визначають загальний холестерол, ефіри холестеролу, β -ліпопротеїни (ЛПНГ), α -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 лошат: 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 – у 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 під час споживання тваринами надлишку вуглеводів і жирів, вагітності, гіперліпідемії, захворювань

печінки з порушенням процесів утворення жовчних кислот, оскільки вони синтезуються з холестеролу (гепатит, гепатодистрофія), та жовчовиділення (холестаза), за гломерулонефриту, ліпоїдного нефрозу, хронічної ниркової недостатності, пухлин підшлункової залози, кетозу, цукрового діабету, гіпотиреозу, подагри. За гіперліпідемії створюються умови для значного ендogenous синтезу холестеролу. Холестаза супроводжується зменшенням екскреції жовчі, внаслідок чого знижується виділення холестеролу. У разі гломерулонефриту та ниркової недостатності, можливо, зменшується виділення холестеролу із сечею. За кетозу та цукрового діабету гіперхолестеролемія зумовлена 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 за рівня 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 внаслідок тривалого дефіциту в раціонах жирів, вуглеводів, за гепатиту, гепатодистрофії, цирозу печінки та гіпотиреозу.

Література: [4, С. 33–35; 6, С. 302; 21, С. 351–352; 22, С. 363–365; 32, С. 123–125; 37, С. 222; 60, С. 145–146; 63, С. 20–21].

9.5. Визначення вмісту ефірозв'язаного холестеролу (за методом Балаховського)

Принцип. Метод ґрунтується на зв'язуванні вільного холестеролу дігітоніном з утворенням нерозчинної у хлороформі сполуки і розчиненням хлороформом ефірозв'язаного холестеролу. Хлороформний екстракт, що містить ефірозв'язаний холестерол, використовується для кольорової реакції з реактивом Ілька або з іншим специфічним реактивом.

Обладнання: водяна баня, центрифуга, ФЕК або спектрофотометр, центрифужні пробірки, пробірки з притертими корками на 10 мл, піпетки на 0,1; 1 і 5 мл.

Реактиви: 1) екстрагувальна суміш: хлороформ-метанол 2:1 або етанол-ефір 3:1; 2) 1% спиртовий розчин дігітоніну: 1 г дігітоніну розчиняють у 50 мл етанолу і доводять, підігріваючи, дистильованою водою до 100 мл; 3) суміш льодяної оцтової кислоти, оцтового ангідриду і

концентрованої сульфатної кислоти (1:5:1). Приготування – див. розділ 9.4.2; реактив 1 (стор. 155).

Хід визначення. 1. 0,1 мл сироватки крові вносять у центрифужну пробірку, яка містить 5 мл екстрагувальної суміші, перемішують скляною паличкою і залишають на 5–10 хв у разі використання хлороформ-метанолової суміші або на 1 год – спирто-ефірної.

2. Центрифугують упродовж 10–15хв за 2000–3000 об./хв.

3. Центрифугат обережно зливають у пробірку з притертим корком і ставлять у водяну баню для випаровування з тим, щоб залишилося 0,5–1 мл центрифугату.

4. Додають 1 мл дігітоніну і перемішують. Утворюється білий наліт – комплекс дігітоніну з вільним холестеролом. Залишають стояти на 2–3 год (або на ніч), після чого випаровують до кінця.

5. Після охолодження в пробірку додають 5 мл хлороформу, добре збовтують, фільтрують через знежирений бумажний фільтр або зливають після центрифугування.

6. Екстракт випаровують до мінімуму, додають 2 мл реактиву 3, ставлять у темне місце на 20 хв, після чого колориметрують. Хлороформ екстрагує ефір холестеролу, але не розчиняє дігітонін-холестероловий комплекс.

7. Колориметрують на фотоелектроколориметрі або спектрофотометрі за довжини хвилі 650–660 нм у кюветі з товщиною робочого шару 5 мм відносно контролю (2 мл реактиву 3 і 0,1 мл дистильованої води).

Розрахунок проводять за калібрувальною кривою для загального холестеролу (розділ 9.4.2). За різницею між загальним і ефірозв'язним холестеролом знаходять кількість вільного.

Діагностичне значення. У нормі частка ефірозв'язаного холестеролу в сироватці крові ссавців досягає 70–90, у птиці – 60–70%. Зменшення його частки є показником порушення синтетичної функції печінки.

Література: [6, С. 309–311; 60, С. 146–147].

9.6. Експрес-метод визначення кетонових тіл у сироватці (плазмі) крові

Принцип методу. Метод ґрунтується на реакції ацетону й ацетоцтової кислоти з натрію нітропрусидом. Мінімальний рівень кетонових тіл у крові, за якого реакція стає позитивною – 10 мг/100 мл або 1,72 ммоль/л.

Реактив Лестраде: натрію нітропрурид $[\text{Na}_2\text{Fe}(\text{NO})(\text{CN})_5 \cdot 2\text{H}_2\text{O}]$ – 1,5 г; амонію сульфат – 5,0; натрію карбонат безводний – 25 г. Компоненти подрібнюють у фарфоровій ступці в однорідний порошок, який зберігають у посуді з темного скла упродовж 1–2 міс.

Хід визначення. На фільтрувальний папір або предметне скло наносять близько 50 мг реактиву Лестраде і на нього – 2–3 краплі сироватки (плазми) кров. Якщо інтенсивне бузкувате (фіолетове) забарвлення виникає відразу, то це, за даними С.І.Смирнова (1985), свідчить про наявність 50–80 мг кетонових тіл у 100 мл сироватки (8,5–15 ммоль/л), через 1 хв – 30–50 мг/100 мл (5,0–8,5 ммоль/л), слабофіолетове забарвлення через 3 хв і пізніше – 10–30 мг/100 мл (1,71–5,0 ммоль/л).

Діагностичне значення. У сироватці крові здорових корів міститься 1–8 мг/100 мл (0,17–1,36 ммоль/л) кетонових тіл, у молозиві – 6–8 (1,03–1,36 ммоль/л). У разі гострого перебігу кетозу вміст кетонових тіл у крові, молоці і сечі різко зростає.

Література: [60, С. 132–133].

9.7. Визначення кетонових тіл у крові йодометричним методом

Принцип методу. З безбілкового фільтрату переганяють вільний ацетон та ацетон, що утворився з ацетооцтової і бета-оксимасляної 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 сульфатної кислоти і контролюють титруванням розчином гіпосульфиту. 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 хімічні на 75–100 мл.

Реактиви: 1) 0,3 н (0,3 моль/л) розчин натрію гідроксиду, хч; 2) 5% розчин цинку сульфату ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$); 3) біхроматна суміш: 20 г калію двохромовокислого, 200 мл концентрованої сульфатної кислоти, дистильована вода до 1 л. У мірну колбу ємністю 1 л наливають 400–600 мл дистильованої води, обережно доливають 200 мл сульфатної кислоти і, постійно перемішуючи, 20 г калію двохромовокислого (попередньо подрібнити у ступці). Після розчинення речовини та остигання суміші доливають дистильованою водою до мітки; 4) 20%-ний розчин

сульфатної кислоти; 5) 10% розчин натрію гідроксиду; 6) 0,01 н (0,005 моль/л) розчин йоду (готують перед дослідженням із 0,1 н розчину фіксаналу). Титр 0,01 н розчину йоду перед кожним дослідженням перевіряють за 0,01 н розчину натрію тіосульфату (гіпосульфит); 7) 0,01 н (0,01 моль/л) розчин натрію сульфату, 5-водний $[\text{Na}_2\text{SO}_3 \times 5\text{H}_2\text{O}]$, готують із 0,1 н (0,1 моль/л) розчину, приготовленого з фіксаналу]; 8) 1% розчин крохмалю. Готують завчасно насичений розчин натрію хлориду, наливають його у мірну колбу ємністю 100 мл на 2/3 об'єму, 1 г розчинного крохмалю розчиняють у пробірці в 2–3 мл дистильованої води під час нагрівання, 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 гідроксиду, перемішують і додають 10 мл 5% розчину цинку сульфату. Суміш старанно струшують і через 10 хв фільтрують через паперовий фільтр. Розведення крові – 1:10.

9.7.1. Визначення загальної кількості кетонових тіл

У мірну склянку вносять 20 мл дистильованої води, 2 мл 0,01 н розчину йоду, 2 мл 10% розчину натрію гідроксиду і ставлять під холодильник перегінного пристрою таким чином, щоб кінець його опустився в рідину. У 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% розчину сульфатної кислоти, додають 2–3 краплі 1% розчину крохмалю і титрують 0,01 н розчином гіпосульфату 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 гіпосульфату, витраченого на титрування вільного йоду в контрольній пробі; B – кількість мл 0,01 н розчину гіпосульфату,

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.

9.7.2. Визначення ацетону і ацетооцтової кислоти

У прийомну склянку вносять 20 мл дистильованої води, 2 мл 0,01 н розчину йоду, 2 мл 10% розчину натрію гідроксиду, ставлять її під охолоджувач перегінного пристрою. У перегінну колбу вносять 10 мл фільтрату крові, 1 мл 20% розчину сульфатної кислоти і 15 мл дистильованої води. Паралельно готують два контролю: у перегінну колбу вносять 25 мл дистильованої води і 1 мл 20% розчину сульфатної 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% розчину сульфатної кислоти, додають 2–3 краплі 1% 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 х 100), відповідає вмісту ацетону та ацетооцтової кислоти в 100 мл крові.

9.7.3. Визначення бета-оксимаєляної кислоти

У мірну склянку вносять 20 мл дистильованої води, 2 мл 0,01 н розчину йоду, 2 мл 10%-ного розчину натрію гідроксиду 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 припинялося і рідина не википала (запобігання

потемнінню калію біхромату). По закінченні терміну кипіння приймальну колбу від'єднують від охолоджувача, вимикають електроплитку. Перегінну колбу і охолоджувач промивають 4–5 мл дистильованої води. Приймальну склянку ставлять у темне місце на 15 хв.

Контрольний розчин. У перегінну колбу вносять 10 мл дистильованої води, 15 мл калію біхромату кип'яють 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. 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%. Порушення обміну ліпідів виникають за нестачі чи надлишку жирів у раціоні, нестачі цукру і крохмалю, висококонцентратного типу годівлі, недостатнього споживання сіна.

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, погіршує засвоєння жиророзчинних вітамінів, зумовлює ураження шкірного покриву, зниження запліднюваності яєць та природної резистентності організму.

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

декарбоксілювання утворюється ацетон, а за окиснення (приєднується 2H^+) – бета-оксималяна кислота.

У жуйних кетонів тіла утворюються також у стінках передшлунків. З масляної кислоти, що синтезована мікроорганізмами, у стінках передшлунків утворюється бета-оксималяна, а з неї внаслідок відновлення (-2H^+) – ацетооцтова, а з останньої внаслідок декарбоксілювання – ацетон.

У крові, сечі та молоці завжди є незначна кількість кетонів тіл, проте вони не визначаються якісними реакціями. Підвищення їх рівня у крові (*кетонемія*) супроводжується посиленням виділенням через нирки (*кетонурія*), молочну (*кетонолактія*) і потові залози та легені.

В нормі у здорових тільних сухостійних корів уміст кетонів 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 кетонів тіл вищий. Основна кількість їх у крові (82–87%) припадає на частку бета-оксималяної кислоти.

Стійка кетонемія зустрічається у тварин за гострого та підгострого перебігу кетозу. 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.

Література: [4, С. 35–39; 60. С, 128–132].

9.8. Дифузійний метод визначення кетонів тіл у крові

Принцип методу ґрунтується на попередньому перетворенні ацетооцтової та β -оксималяної кислот у ацетон, який унаслідок мікродифузії витісняється з середовища і в замкненому просторі поглинається метабісульфітом натрію, останній із саліциловим альдегідом дає кольорове забарвлення, інтенсивність якого пропорційна концентрації поглинутого ацетону.

Реактиви: 1) 3,7% розчин натрію метабісульфіту ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$). чда, хч. Готують у день дослідження. До 3,7 г метабісульфіту натрію додають 96,3 мл дистильованої води; 2) 20 н (10 моль/л) розчин сульфатної кислоти (H_2SO_4), відносної густини 1,84 г/см³ чда. У мірну колбу вливають

невелику кількість дистильованої води, обережно вносять 554 мл концентрованої сульфатної кислоти і ретельно перемішують, після чого додають дистильовану воду, доводячи об'єм до 1 л; 3) 0,5% водний розчин калію біхромату ($K_2Cr_2O_7$), чда, хч. У мірну колбу на 100 мл вносять 0,5 г калію біхромату і додають дистильовану воду (до мітки); 4) 10 н водний розчин натрію гідроксиду (NaOH), чда, хч. У мірну колбу на 100 мл вносять 40 г натрію гідроксиду і доводять до необхідного об'єму дистильованою водою (до позначки); 5) розчин саліцилового альдегіду (HOC_6H_4CHO), ч, чда в етиловому 96° спирті: 2 мл саліцилового альдегіду змішують з 8 мл спирту, готують у день дослідження; 6) 0,15 н (0,075 моль/л) розчин барію гідроксиду [$Ba(OH)_2 \cdot 8H_2O$], чда, хч: 12,83 г барію гідроксиду розчиняють у 1 л дистильованої води. Розчин фільтрують; 7) 2,5% розчин цинку сульфату ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$), чда, хч: до 2,5 г цинку сульфату додають 97,5 мл дистильованої води; 8) основний стандартний розчин ацетону (CH_3COCH_3), чда, осч: 2,54 мл ацетону наливають у колбу місткістю 1000 мл і доводять (до позначки) дистильованою водою, зберігають у холодильнику впродовж 30 діб. Для приготування 2 мг% стандартного розчину беруть 1 мл основного стандартного розчину і переносять у колбу на 100 мл, доводять (до позначки) дистильованою водою. Розчин готують у день дослідження.

П р и м і т к а. Перед аналізом перевіряють чистоту натрію гідроксиду: до 1,5 мл 3,7% натрію метабісульфіту додають 1,5 мл 10 н розчину натрію гідроксиду і 0,3 мл спиртового розчину саліцилового альдегіду, перемішують. Якщо гідроксид натрію придатний для аналізу, то отримана суміш реактивів прозора, а в разі його непридатності суміш стає каламутною.

Обладнання. Апарат для мікродифузії – здвоєні колби з тугоплавкого скла з відповідними гумовими корками (рис. 9.1), фотоелектроколориметр КФК-2 МП, сушильна шафа, водяна баня, мірні колби, пробірки, піпетки.

Підготовка крові для аналізів. Кров беруть із вени, стабілізують гепарином із розрахунку на 5 мл крові 2–3 краплі гепарину, що містить 500 ОД в 1 мл.

Проводять осадження білків: до 2 мл крові додають 4 мл дистильованої води, 6 мл 0,15 н розчину барію гідроксиду і через 10 хв краплями 6 мл 2,5% розчину цинку сульфату. Через 5 хв вміст центрифугують за 3000 об./хв упродовж 15 хвилин. Для аналізу використовують центрифугат – верхній прозорий шар без осаду.

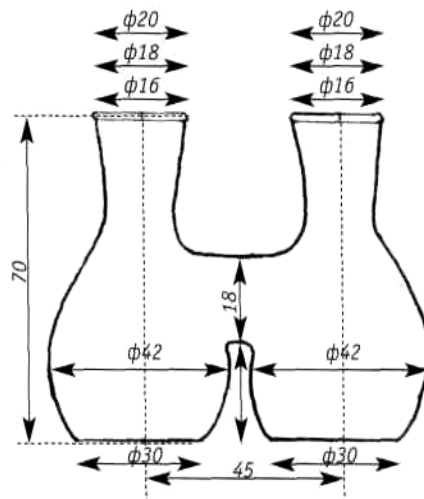


Рис. 9.1. Прилад (здвоєні колби) для визначення кетонових тіл у крові

9.8.1. Визначення ацетону й ацетооцтової кислоти у центрифугаті крові

Підбирають здвоєні колби за кількістю зразків крові й дві колби для стандарту та нумерують їх.

В одну половину здвоєної колби вносять 5 мл безбілкового центрифугату, в іншу – 2 мл 3,7% розчину натрію метабісульфіту, закривають корками. Потім відкривають ту колбу, де знаходиться центрифугат, і в нього вносять 1 мл 20 н розчину сульфатної кислоти, щільно закривають корком і обережно перемішують (коливанням). Попадання вмісту з однієї половини колби в іншу неприпустимо.

Водночас готують дві стандартні проби: замість 5 мл центрифугату вносять по 1 мл 2 мг% розчину ацетону й по 4 мл дистильованої води. Потім відкривають колбу, де знаходиться стандартний розчин ацетону, і в нього вносять 1 мл 20 н розчину сульфатної кислоти, щільно закривають корком та обережно перемішують.

Для перетворення ацетооцтової кислоти в ацетон, дифузії ацетону і поглинання його метабісульфітом натрію здвоєні колби зі зразками крові та стандартними розчинами поміщають на 2 год у сушильну шафу за температури 60–70° С. Після цього колби охолоджують.

Із половини здвоєної колби з розчином натрію метабісульфіту беруть 1,5 мл вмісту і переносять у пробірку, додають 1,5 мл 10 н розчину натрію гідроксиду та 0,3 мл спиртового розчину саліцилового альдегіду, перемішують і витримують у сушильній шафі за температури 50 °С 20 хв, далі – 30 хв за кімнатної температури. Потім пробірки фотометрують у

кюветі (з товщиною шару 0,5 см) за синього світлофільтра, довжина хвилі 440 нм (проти контролю).

Контроль: у пробірку вносять 1,5 мл 3,7%-ного розчину натрію метабісульфіту, 1,5 мл 10 н натрію гідроксиду і 0,3 мл спиртового розчину саліцилового альдегіду, перемішують і ставлять у сушильну шафу за температури 50° С на 20 хв, а потім витримують 30 хв за кімнатної температури.

Концентрацію поглинутого ацетону визначають за формулою:

$$X = E_d \times a \times \kappa / E_c \times 0,556,$$

де X – кількість ацетону й ацетооцтової кислоти, мг/100 мл крові; E_d – екстинція дослідної проби; E_c — середня величина екстинції стандартного розчину ацетону; a – концентрація стандартного розчину ацетону, мг%; κ –кількість стандартного розчину, мл; 0,556 – кількість крові, що відповідає об'єму фільтрату, мл.

Приклад розрахунку: якщо E_d дорівнює 0,14; E_c 2 мг% розчину ацетону – 0,22, то вміст ацетону й ацетооцтової кислоти становитиме:

$$X = 0,14 \times 2 \times 1/0,22 \times 0,556 = 2,29 \text{ мг/100 мл.}$$

9.8.2. Визначення загальної кількості кетонівих тіл

Підбирають здвоєні колби за кількістю проб крові та дві колби для стандарту, нумерують і підбирають до них корки. Для визначення загальної кількості кетонівих тіл необхідно перевести в ацетон ацетооцтову і β -оксимасляну кислоти. Для цього в одну половину здвоєної колби вносять 5 мл центрифугату крові й додають 1 мл 20 н розчину сульфатної кислоти, закривають корками обидві половини колби, обережно перемішують і тримають у водяній бані протягом 1 хв за температури 100° С. Після охолодження проб до кімнатної температури колбу, де знаходиться центрифугат, відкривають і вносять у неї 0,82 мл 0,5% розчину калію біхромату, знову закривають, обережно перемішують і ставлять у водяну баню за температури 100° С на 30 хв. Паралельно готують дві стандартні проби: замість центрифугату до колби вносять 1 мл 2 мг% розчину ацетону та 4 мл дистильованої води, додають 1 мл 20 н розчину сульфатної кислоти. Стандартні проби піддають ідентичній обробці.

У вільні колби з центрифугатом крові та стандартним розчином вносять по 2 мл 3,7% розчину натрію метабісульфіту, закривають корками.

Для дифузії ацетону і поглинання його метабісульфітом натрію здвоєні колби зі зразками крові та стандартними розчинами поміщають на 2 год у сушильну шафу за температури 60–70° С. Після цього колби охолоджують.

Із половини здвоєної колби з розчином натрію метабісульфіту беруть 1,5 мл і переносять у пробірку, додають 1,5 мл 10 н розчину натрію гідроксиду та 0,3 мл спиртового розчину саліцилового альдегіду, змішують і ставлять у сушильну шафу за температури 50° С на 20 хв. Після цього пробірки витримують упродовж 30 хв за кімнатної температури. Фотометрують у кюветі (з товщиною оптичного шару 0,5 см) за синього світлофільтра з довжиною хвилі 440 нм (проти контролю, приготування якого описано вище).

Розрахунок виконують за наведеною вище формулою.

Клінічне значення. Кетонові тіла (ацетон, ацетооцтова і β-оксимасляна кислоти) є проміжними продуктами обміну жирів, білків і вуглеводів. У здорових тварин вміст кетонових тіл у крові становить 1–8 мг/100 мл (0,17–1,36 ммоль/л), молоці корів – 6–8 мг/100 мл (1,03–1,36 ммоль/л), у сечі – 6–10 мг/100 мл (1,03–1,70 ммоль/л). Вміст кетонових тіл у крові й молоці знаходиться у прямому кореляційному зв'язку. Вміст ацетооцтової кислоти та ацетону у клінічно здорових тварин – близько 15, β-оксимасляної кислоти – 85% загальної кількості кетонових тіл. Підвищення рівня кетонових тіл у крові, сечі та молоці свідчить про посилений кетогенез. Стійке підвищення кетонових тіл у крові (кетонемія) спостерігається у тварин за гострого і підгострого перебігу кетозу. При цьому співвідношення β-оксимасляної та ацетооцтової кислот й ацетону змінюється у бік збільшення відносної частки ацетону та ацетооцтової кислоти. Найбільшу кількість кетонових тіл у крові, молоці й сечі виявляють у початковий період кетозу. У разі затяжного перебігу хвороби вміст кетонових тіл у біологічних субстратах зменшується і часто не виходить за межі норми, тоді як на початковій стадії хвороби перевищує її в кілька разів.

Помірну вторинну кетонемію можна виявити за тяжких запальних процесів – гнійного ендометриту, затримки посліду, травматичного ретикулоперитоніту, хірургічної інфекції. Вторинна кетонемія зникає з усуненням основного захворювання.

Література: [43, С. 35–36; 63, С. 21–23].

9.9. Методи визначення продуктів пероксидного окиснення ліпідів

Процеси біологічного окиснення в клітинах складаються в нормі з кількох послідовних реакцій від'єднання атомів водню (гідрогену) від субстрату, а кисень (кисень) приєднується до звільнених атомів водню з утворенням молекул води і деякої кількості пероксиду гідрогену, який руйнується каталазою. Поряд з цим в організмі відбуваються реакції пероксидного окиснення, які супроводжуються безпосереднім приєднанням кисню (кисню) до субстрату, внаслідок чого утворюються гідропероксиди цих сполук, кетони, альдегіди та інші сполуки. Одним із цих субстратів є ліпіди. Таким чином, пероксидне окиснення ліпідів (ПОЛ) є нормальним метаболічним процесом, який відбувається у всіх тканинах і органах. Активаторами пероксидного окиснення є активні форми кисню (окисгену) (АФК) – вільний супероксидний аніон-радикал ($O_2^{\cdot -}$), пероксид водню (H_2O_2), гідроксидний радикал (OH^{\cdot}) та оксид азоту (NO^{\cdot}).

Супероксидний аніон-радикал в організмі може діяти як окиснювач з утворенням H_2O_2 (під впливом супероксиддисмутази – СОД), який розкладається під впливом пероксидаз, зокрема каталази й глутатіонпероксидази, і як відновлювач з утворенням молекулярного кисню. У кислому середовищі супероксидний аніон-радикал ($O_2^{\cdot -}$) може утворювати гідропероксильний радикал (H_2O^{\cdot}), який є значно сильнішим окиснювачем, ніж $O_2^{\cdot -}$.

Пошкоджувальна дія оксиду азоту (NO^{\cdot}) визначається його здатністю реагувати з супероксидним аніон-радикалом із утворенням надзвичайно реактогенного пероксинітриду, який у свою чергу пошкоджує будь-які білкові молекули, у тому числі ферменти антиоксидантного захисту.

Гідроксидний радикал (OH^{\cdot}) може взаємодіяти з нуклеїновими кислотами, білками і фосфоліпідами. Він “атакує” бокові ланцюги ненасичених жирних кислот з утворенням *ліпідного радикала* (L^{\cdot}), який у присутності кисню переходить в органічні радикали кисню – пероксильні радикали (LOO^{\cdot}), а останні, забираючи водень від жирнокислотних ланцюгів фосфоліпідів, утворюють гідропероксили ліпідів ($LOOH$). Окрім них, утворюються й інші проміжні продукти ПОЛ – малоновий діальдегід і дієнові кон'югати, а також кінцеві сполуки альдегідів типу основ *Кліфата*.

Кінцеві продукти ПОЛ пошкоджують різні біомолекули і в першу чергу білки, окиснюють їх сульфогідрильні групи, інактивують різні ферменти гліколізу та циклу трикарбонових кислот, ушкоджують ДНК,

АТФ, нуклеотидфосфати. Гідропероксид ліпідів деформує мембранний ліпопротеїновий комплекс, що супроводжується підвищеною проникністю біомембран клітин і субклітинних структур, інгібуванням активних мембранозв'язаних ферментів, фрагментацією та руйнуванням мембран і в кінцевому результаті – цитолізом клітин.

У процесі вільнорадикального окиснення жирнокислотних фосфоліпідів утворюються проміжні продукти, які є джерелом біологічно активних сполук – лейкотрієнів, простагландинів, тромбоксанів. Проміжні продукти ПОЛ (дієнові кон'югати, малоновий діальдегід, ліпопероксид) необхідні для синтезу гормонів.

На противагу утворенню різних продуктів ПОЛ в організмі функціонує спеціальна система антиоксидантного захисту (АОЗ), яка складається з ферментів і неферментних сполук. До ферментної антиоксидантної системи належать супероксиддисмутаза (СОД), каталаза, пероксидаза, глутатіонпероксидаза, глутатіонредуктаза і глутатіонтрансфераза. Ферменти-антиоксиданти характеризуються високою специфічністю дії, зокрема СОД діє на супероксидний радикал, каталаза – на гідрогену пероксид; специфічністю клітинної та органної локалізації. До неферментної АОС належать: токоферол, вітаміни А, К і С, каротин, рутин – вітамін Р, глутатіон, убіхінон (коензим Q), феритин, церулоплазмін, трансферин та інші сполуки.

Доповнюючи одна одну, ферментна і неферментна АОС у нормі гальмують активацію процесів ПОЛ і тим самим попереджують ураження організму тварин продуктами ПОЛ. Система ПОЛ – АОС добре збалансована і працює за принципом зворотного зв'язку: збільшення рівня антиоксидантів призводить до гальмування вільнорадикального окиснення, а це, у свою чергу, змінює властивості ліпідів: у них з'являються легкоокисні фракції, що прискорює процес ПОЛ. При цьому витрачається багато ендогенних антиоксидантів і система повертається до вихідного рівня. Така динамічна рівновага ПОЛ – АОС у біологічних мембранах та рідинах притаманна всім рівням організації живих систем і є одним із основних показників нормального гомеостазу.

Посилення ПОЛ типове для багатьох патологічних процесів і хвороб. Для характеристики оксидантного статусу визначають загальну оксидантну активність плазми (ЗОА), гідропероксиди ліпідів і малоновий діальдегід. Антиоксидантний статус оцінюється дослідженням загальної антиоксидантної активності (ЗАА) плазми і еритроцитів, активності супероксиддисмутази й каталази еритроцитів та інші.

Література: [78, С. 2–18].

9.9.1. Визначення малонового діальдегіду в крові

Принцип методу. За високої температури в кислому середовищі малоновий діальдегід (МДА) реагує з 2-тіобарбітуровою кислотою з утворенням забарвленого триметилового комплексу, який має максимум поглинання за 532 нм.

Обладнання: спектрофотометр або фотоелектроколориметр, центрифуга лабораторна, баня водяна, вага аналітична, пробірки хімічні і центрифужні, колби мірні, піпетки.

Реактиви: 1) 10% водний розчин ТХО кислоти; 2) 0,8% розчин 2-тіобарбітурової кислоти (2-ТБК) на дистильованій воді. Готують, нагріваючи у киплячій водяній бані в день дослідження.

Хід визначення. 1. До 2,5 мл гепаринізованої крові додають 2,5 мл розчину ТХО кислоти, перемішують скляною паличкою і центрифугують за 3000 об/хв упродовж 15 хв. Залишають стояти на холоді 15 хвилин.

2. 3 мл надосадової рідини переносять у чисту центрифужну пробірку, додають 1,5 мл розчину 2-ТБК і добре перемішують. Проби ставлять у киплячу водяну баню **точно** на 15 хв. З'являється рожеве забарвлення.

3. Проби охолоджують під струменем холодної води і центрифугують упродовж 5 хв за 3000 об./хв.

4. Одночасно з дослідними готують контрольну пробу, куди замість крові вносять 2,5 мл води. Всі інші операції проводять так само, як з дослідними пробами.

5. Одержаний центрифугат обережно, не струшуючи, переносять у хімічні пробірки і вимірюють оптичну щільність дослідних проб відносно контрольної за довжини хвилі 532 нм у кюветі з шириною між робочими гранями 1 см.

6. Розрахунок вмісту МДА виконують за формулою:

$$C = (E \cdot 10^6 \cdot 3) : 1,56 \cdot 10^5,$$

де C – концентрація МДА, мкмоль/л; E – оптична щільність проби; 10^6 – коефіцієнт перерахунку в мкмоль/л; 3 – фактор розведення; $1,56 \cdot 10^5$ – коефіцієнт молярної екстинції триметилового комплексу МДА з 2-ТБК.

Клінічне значення. Концентрація МДА у ссавців знаходиться у межах від 0,20 до 1,5, а в курей – від 1,50 до 2,50 мкмоль/л крові. Збільшення його концентрації свідчить про активізацію процесів ПОЛ або зниження АОЗ.

Література: [10; 60, С. 169–170].

9.9.2. Визначення малонового діальдегіду в сироватці крові

В основі методу лежить реакція між малоновим діальдегідом (МДА) і тіобарбітуровою кислотою (ТБК), яка за високої температури і в кислому середовищі проходить з утворенням триметилового комплексу, що містить одну молекулу МДА і дві молекули ТБК.

Реактиви: 1) 20% розчин фосфорновольфрамової кислоти; 2) 0,8% розчин ТБК, 3) льодяна оцтова кислота.

Хід визначення. До 0,5 мл сироватки крові додають 5 мл 20% фосфорно-вольфрамової кислоти. Пробірки закривають корками, перемішують і залишають на холоді 15 хвилин. Центрифугують за температури 4°С протягом 15 хв за 2500 об/хв. Надосадову рідину зливають, а до осаду додають 2 мл Н₂О і 1 мл 0,8% ТБК. Перемішують, закривають корками та інкубують 1 год на водяній бані за температури 100°С. Охолоджують у холодній воді. Центрифугують 10 хв за 6000 об/хв.

Вимірюють оптичну щільність надосадової рідини на спектрофотометрі за довжини хвилі 535 і 580 нм, щоб запобігти поглинанню зафарбованих комплексів ТБК-речовинами неліпідної природи.

Вміст ТБК-активних продуктів розраховують за формулою:

$$C = 0,21 + 26,5 \cdot \Delta D,$$

де C – концентрація ТБК-активних продуктів (нмоль/л); ΔD – показник $D_{535-580}$.

Література: [44, С. 8–9].

9.9.3. Визначення малонового діальдегіду в реакції з тіобарбітуровою кислотою в сироватці крові

Принцип методу. Тіобарбітурова кислота реагує з малоновим діальдегідом, який утворюється за переокиснення ненасичених жирних кислот, з утворенням розчину рожевого забарвлення.

Обладнання: спектрофотометр (ФЕК); центрифуга; водяна баня; аналітичні ваги; хімічні і центрифужні пробірки; мірні колби; піпетки або автоматичні дозатори з діапазоном дозування 0,1–1,0 мл.

Реактиви: 1) 0,1% розчин ортофосфатної кислоти (=1,004 г/мл); 2) 0,8% розчин тіобарбітурової кислоти (зберігати в темному посуді або готувати на бідистильованій воді перед визначенням); 3) 0,28% розчин феруму сульфату (28 мг FeSO₄•7H₂O розчинити в 10 мл води); 4) бутанол (х.ч.).

Вимоги до проби. Після отримання пробу охолоджують і зберігають за 4–8° С протягом 24 год. Гемоліз призводить до невірних результатів.

Хід визначення. До 0,2 мл сироватки крові додають 3 мл 1% розчину ортофосфатної кислоти, 1 мл 0,8% тіобарбітурової кислоти і 0,1 мл розчину феруму сульфату. Потім перемішують, закривають щільно пробкою і кип'ятять у водяній бані протягом 45 хв. Пробірки охолоджують, додають 5 мл бутанолу, ретельно струшують і центрифугують 10 хв за 3000 об./хв. Оптичну щільність бутанолового екстракту вимірюють за 535 і 580 нм проти розчину бутанолу.

Розрахунок вмісту малонового діальдегіду в сироватці крові проводять за формулою:

$$C, \text{ нмоль / л} = E_{535} - E_{580} \times 1,88 \times 10^3,$$

де C – концентрація МДА, нмоль/л; E_{535} – оптична щільність проби при 535 нм; E_{580} – оптична щільність проби за 580 нм; 10^3 – коефіцієнт перерахунку нмоль/л; $1,88 \times 10^3$ – коефіцієнт перерахунку продуктів реакції з тіобарбітуровою кислотою (ТБК) на МДА.

Референтні значення, нмоль/л: велика рогата худоба – 250–1000; свині – 100–500; вівці – 100–450; кури – 750–2500.

Література: [85, С. 398–399].

9.9.4. Визначення дієнових кон'югатів (ДК) і кетодієнів (КД) поліненасичених жирних кислот у крові

Принцип методу. Процеси перекисного окиснення поліненасичених жирних кислот супроводжуються перегрупуванням подвійних зв'язків і виникненням системи спряжених дієнових структур (дієнових кон'югатів), які мають максимум поглинання за 232–234 нм, і кетодієнів з максимумом поглинання за 260–280 нм.

Реактиви: 1) екстрагувальна суміш: гептан (хч) – ізопропіловий спирт (хч) (1:1) готується перед визначенням; 2) спирт етиловий (96° ректифікований).

Обладнання: а) спектрофотометр; б) водяна баня; в) центрифуга з охолодженням; г) апарат для струшування пробірок (АВУ-ЧП або інший); д) балон з газоподібним азотом, гелієм чи аргоном (хч); е) хімічні та центрифужні пробірки; є) піпетки з поділками або автоматичні дозатори з діапазоном дозування 0,1–10 мл.

Вимоги до проби. Для дослідження необхідно отримати в закриту пробірку стабілізовану гепарином кров. Далі пробу негайно охолоджують. Зразок стабільний за 4–8° С протягом 6 год (краще досліджувати відразу після взяття).

Хід визначення. У центрифужні пробірки вносять по 1 мл гепаринізованої крові, додають 7 мл екстрагувальної суміші, закривають корковими (не гумовими!) пробками й інтенсивно струшують упродовж 2 хв. Потім проби відстоюють протягом 15 хв і центрифугують за 3000 об/хв за температури 0–4° С. Відбирають 2 мл верхнього гептанового шару і переносять у чисті хімічні пробірки, випарюють в азоті, гелії або аргоні (для уникнення контакту з киснем повітря) на водяній бані за 40–50° С. До сухого залишку проби приливають 3 мл етилового спирту; пробірку інтенсивно струшують, залишають на 10–15 хв за кімнатної температури і потім знову струшують.

Відносну щільність дослідних проб вимірюють на спектрофотометрі при 232 і 273 нм проти контрольної проби (етилового спирту) в кюветах з довжиною оптичного шляху 10 мм. У цих же пробах визначають кількість загальних ліпідів (мг) сульфаваніліновим методом (за допомогою наборів реактивів виробництва Lachema або інших).

Розрахунок вмісту дієнових кон'югатів (ДК) і кетодієнів (КД) проводять за формулою:

$$C_{\text{дк або кд}} = \frac{E_{232} \times (E_{273})}{A},$$

де $C_{\text{дк або кд}}$ – вміст дієнових кон'югатів (кетодієнових) в умовних одиницях оптичної щільності на 1 мг ліпідів (ум. од. оптич. щільн./мг ліпідів); E_{232} – оптична щільність проби для дієнових кон'югатів; E_{273} – оптична щільність проби для кетодієнів; A – уміст загальних ліпідів у пробі (мг).

Референтні значення:

ДК, ум. од. оптич. густини/мг ліпідів:	КД, ум. од. оптич. густини/мг ліпідів:
велика рогата худоба – 0,12–0,25; свині – 0,1–0,2; вівці – 0,15–0,3; кури – 0,2–0,3.	велика рогата худоба – 0,05–0,1; свині – 0,03–0,1; вівці – 0,03–0,12; кури – 0,1–0,15.

Література: [60, С. 168–169; 86. С, 63–64].

9.9.5. Визначення дієнових кон'югатів і кетодієнів за УФ-поглинанням гептанових та ізопропанолових екстрактів

Принцип методу. Метод оснований на вимірюванні інтенсивності поглинання в зоні 231–234 нм, зумовлений кон'югованими дієновими структурами (попередньо екстрагованими до плазми), який виникає внаслідок утворення гідропероксидів поліненасичених жирних кислот.

Реактиви: 1) екстрагувальна суміш: гептан (хч) – ізопропіловий спирт (хч) [1:1] готується перед визначенням; 2) розчин хлоридної кислоти, рН 2,0 (0,01н р-н, готують з фіксаналу); 3) натрій хлористий (хч).

Обладнання: а) апарат для струшування (АВУ-ЧП або інший); б) спектрофотометр; в) хімічні та центрифужні пробірки; г) піпетки з поділками або автоматичні дозатори з діапазоном дозування 0,1–10 мл.

Вимоги до проби. Для дослідження потрібна стабілізована гепарином кров, отримана в закритій пробірці. Після взяття проби негайно охолоджують і зберігають до визначення за температури 4–8°C упродовж 6 год. Плазму отримують шляхом центрифугування в закритих пробірках за 1000–1500 об./хв упродовж 15 хв (краще з охолодженням). Плазму бажано отримати відразу після взяття крові.

Хід визначення. Екстракцію проводять додаванням до 0,2 мл плазми 8 мл екстрагувальної суміші і струшуванням протягом 15 хв в апараті струшування. Для кращого розділення фаз до проби (перед струшуванням) додають 1,0 мл розчину хлоридної кислоти (рН 2,0) і пробірки ставлять у штатив для розшарування фаз. Потім відбирають верхню гептанову фазу. До нижньої (ізопропанолової фази) додатково додають 1,5 г NaCl та інтенсивно струшують. Після розділення ізопропілового спирту й води відбирають верхню спиртову фазу і спектрофотометрують проти контролю. Контрольна проба обробляється аналогічно, але замість плазми використовують воду. Оптичну щільність вимірюють на спектрофотометрі за довжини хвилі 232 і 273 нм в кюветі з довжиною оптичного шляху 10 мм.

$$C_{\text{дк}} \text{ або } C_{\text{кд}} = \frac{E_{232}(E_{273})}{A},$$

де, $C_{\text{дк}} \text{ або } C_{\text{кд}}$ – вміст дієнових (кетодієнових) кон'югатів в умовних одиницях оптичної щільності на 1 мг ліпідів (ум. од. оптич. щіл./мг ліпідів); E_{232} – оптична щільність для дієнових кон'югатів; E_{273} – оптична щільність проби для кетодієнів; A – вміст загальних ліпідів у пробі (мг).

Література: [10; 60. С. 168–169].

9.9.6. Визначення перекисного гемолізу еритроцитів

Принцип методу. Зниження рівня антиоксидантів в організмі збільшує аутоокиснення ліпідів мембран еритроцитів, що зменшує їх стійкість до гемолізу.

Реактиви: 1) буферний розчин (рН 7,4) – 136 г $\text{KН}_2\text{PО}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ і 30 г NaOH розчинити в 1 л дистильованої води; 2) 17%-ний розчин NaCl ; 3) робочий реактив (рН 7,4): змішати 50 мл розчину(1) і 50 мл розчину (2), довести об'єм реактиву до 1 л дистильованою водою. Перед використанням реактиви струшують 1–2 хв для насичення киснем.

Хід визначення. До 0,1 мл крові додають 7,5 мл робочого реактиву, пробу центрифугують 10 хв за 1500 об/хв і температури 15°C . Осад еритроцитів після видалення надосадової рідини ресуспендують в 7,5 мл робочого реактиву. По 1 мл суспензії еритроцитів розливають у 2 пробірки (E проба₁ і E проба₂), які містять по 4 мл робочого розчину, і в пробірку з 4 мл дистильованої води (контроль).

Всі проби інкубують 4 год за 37°C , після чого їх інтенсивно струшують, а потім центрифугують (10 хв при 1500 об/хв). Оптична щільність надосадової рідини вимірюється за довжини хвилі 540 нм в кюветі з товщиною оптичного шару 1 см проти дистильованої води.

Величину гемолізу розраховують за формулою:

$$\% \text{ гемолізу} = \frac{(E_{\text{проби } 1} + E_{\text{проби } 2}) \times 100}{2 \times E_{\text{к}}},$$

де $E_{\text{к}}$ і $E_{\text{проби } 1} + E_{\text{проби } 2}$ – оптична густина проб.

Перекисний гемоліз еритроцитів у нормі не перевищує 10–15%.

Література: [21, С. 369–370; 22, С. 381–382].

Примітка. У джерелі 22 у формулі допущена помилка: необхідно $E_1 + E_2$.

9.9.7. Визначення флуоресценційних основ Шіффа

Принцип методу. Діальдегіди й інші кінцеві продукти ПОЛ, взаємодіючи з N-кінцевими залишками амінокислот, білків і аміногруп фосфоліпідів, утворюють кон'юговані флуоресценційні сполуки типу основ Шіффа. Флуоресценційна здатність їх, порівняно з МДА, у 10–100 разів інтенсивніша й не залежить від ступеня окиснення системи. Метод визначення оснований на вимірюванні флуоресценції сполук типу основ Шіффа, які екстрагують ліпідними розчинниками з біологічних матеріалів.

Обладнання. Спектрофлуориметр з фільтром у каналі “збудження”, який забезпечує пропускання світла з довжиною хвилі 365–370 нм (понад 75% спектра) і фільтром у каналі «реєстрація» для пропускання світла довжиною хвилі 435–440 нм., або спектроколориметр “Спекол 10” (“Спекол 11”) з приставкою для вимірювання флуоресценції, або спектрофотометр; аналітичні ваги; холодильник; центрифуга (лабораторна); лійки лабораторні; фільтри знежирені – жовта стрічка; водяна баня або термостат, які забезпечують підтримання температури $30 \pm 2^\circ \text{C}$; пробірки хімічні і центрифужні; мірні колби; піпетки з поділками або автоматичні дозатори (1,5 і 10 мл).

Реактиви: 1) екстрагувальна суміш: хлороформ (ОСЧ або для хроматографії) – метанол 2:1; 2) 0,1 н розчин сульфатної кислоти (готують із фіксаналу); 3) стандартний розчин хінін-сульфату (1г/л): 10 мг хінін-сульфату (Fluka або Sigma) розчиняють в 10 мл 0,1 н розчину сульфатної кислоти. Розчин придатний протягом 1 міс. (зберігають у темному скляному посуді); 4) робочий розчин хінін-сульфату (1 мкг/л): 1 мл стандартного розчину хінін-сульфату доводять у мірній колбі на 1000 мл деіонізованою або бідистильованою водою.

Вимоги до проби. Сироватку і плазму крові і зберігають за температури $4\text{--}8^\circ \text{C}$ протягом 24 год, або 14 днів за температури нижче мінус 15°C .

Хід визначення. У центрифужні пробірки вносять по 1 мл сироватки крові, приливають по 4 мл екстрагувальної суміші (ЕС) і ретельно перемішують скляною паличкою. Пробірки щільно закривають корковими пробками і ставлять у водяну баню на 5 хв за температури 30°C . Виймають з бані, інтенсивно струшують упродовж 1 хв. Потім проби центрифугують 15 хв за 3000 об/хв. Обережно відсмоктують водяний шар. Білковий шар протикають скляною паличкою і нижній хлороформний екстракт ліпідів фільтрують у чисті пробірки через змочений хлороформом паперовий фільтр. Так само обробляють і робочий стандартний розчин. Вимірюють флуоресценцію екстрактів, робочого стандартного розчину хінін-сульфату і хлороформу за довжин хвилі у каналі «реєстрація» 435–440 нм.

Розрахунок вмісту флуоресценційних основ Шіффа проводять за формулою:

$$C = \frac{E_{\text{д}} - E_{\text{хл}}}{E_{\text{ст}} - E_{\text{хл}}},$$

де C – вміст основ Шіффа у відносних Од/мл сироватки; $E_{\text{д}}$ – флуоресценція дослідної проби; $E_{\text{ст}}$ – флуоресценція робочого стандартного розчину хінін-сульфату, яка прийнята за 1 відносну одиницю; $E_{\text{хл}}$ – флуоресценція хлороформу (у разі використання хлороформу ОСЧ, або для

хроматографії флуоресценцію можна не проводити, якщо світіння незначне і не перевищує 1% від світіння стандартного розчину).

П р и м і т к а. За відсутності хлороформу ОСЧ, або для хроматографії його очищають перед використанням перегонкою.

Фізіологічні значення. Концентрація в сироватці крові флуоресценційних основ Шіффа знаходиться в межах (відн.од/мл): у великої рогатої худоби – 0,1–0,2; свиней – 0,1–0,3; овець – 0,1–0,3; курей – 0,3–0,6. Активізація процесів ПОЛ супроводжується збільшенням концентрації сполук типу основ Шіффа.

Література. [10; 60, С. 171–172].

Клінічне значення визначення продуктів вільнорадикального окиснення ліпідів. Підвищення концентрації в крові дієнових кон'югатів (ДК), кетодієнів (КД) поліненасичених жирних кислот, МДА і флуоресценційних основ Шіффа вказує на посилення в організмі процесів ПОЛ, які зумовлюються як ендогенними (гострі і хронічні запальні процеси, сепсис, дефіцит вітамінів С, Е, К, каротину, фосфоліпідів, селену тощо), так і екзогенними (променеві ураження, технологічні стреси тощо) факторами. Поступове зниження концентрації ДК і КД до оптимального рівня свідчить про успішне лікування і вказує на сприятливий прогноз.

Найбільш поширеним діагностичним тестом для оцінювання інтенсивності вільнорадикального окиснення ліпідів є визначення МДА в сироватці крові. Збільшення МДА у крові вказує на підвищення концентрації ліпідних гідропероксидів і свідчить про активізацію процесів ПОЛ або зниження антиоксидантного захисту організму.

9.10. Дослідження показників антиоксидантного стану

Антиоксидантна система захищає тканини від згубної дії вільних радикалів. До її складу входять три великі групи антиоксидантів.

Первинні антиоксиданти діють шляхом запобігання утворенню нових вільних радикалів. Зокрема, супероксиддисмутаза (СОД) перетворює супероксид (O_2^-) у менш активну сполуку – пероксид гідрогену; глутатіонпероксидаза (ГП) перетворює пероксид гідрогену і ліпідні пероксиди в нешкідливі молекули до того, як вони утворюють вільні радикали; металозв'язувальні білки (феритин і церулоплазмін) обмежують доступність Fe^{2+} , який бере участь в утворенні гідроксила ($\cdot OH$).

Вторинні антиоксиданти захоплюють вільні радикали і припиняють ланцюгові реакції (вітаміни С, Е, бета-каротин, альбумін, сечова кислота, білірубін).

Третинні антиоксиданти відновлюють пошкоджені вільними радикалами молекули (ферменти, які відновлюють ДНК і метіонін-сульфоксиредуктаза).

За розвитку недостатності однієї або декількох ланок антиоксидантної системи тканини втрачають захист від дії вільних радикалів, що призводить до пошкодження тканин і органів та розвитку захворювань.

9.10.1. Визначення загальної антиоксидантної активності плазми або еритроцитів (ЗАА)

Принцип методу. ЗАА оцінюється за ступенем інгібування аскорбат-і фероіндукованого окиснення Твіну-80 до МДА.

Реактиви: 1) 1% розчин Твіну-80; 2) 1 мМ розчин феруму сульфату; 3) 10 мМ розчин аскорбінової кислоти; 4) 40% розчин трихлороцтової кислоти (ТХО); 5) 0,25% розчин тіобарбітурової кислоти (ТБК); 6) 1,34% розчин натрію оксалату; 7) 0,9% розчин натрію хлориду.

Хід визначення. У дві склянки з темного скла (для дослідної і контрольної проб) з притертими пробками об'ємом 200 мл вносять по 2 мл Твіну-80, 0,2 мл розчину феруму сульфату, 0,2 мл розчину аскорбінової кислоти, 0,1 мл гемолізату (див. методику 9.10.3 – визначення активності СОД) або 0,2 мл плазми. У контрольну пробу замість біологічного матеріалу вносять відповідну кількість дистильованої води. Інкують 48 год за 40° С, потім до 2 мл суміші приливають 1 мл ТХО, через 60 хв центрифугують за 8000 об/хв упродовж 15 хв.

До 1 мл надосадової рідини (супернатанту) додають 2 мл ТБК і кипятять 15 хв. Охолоджують. Фотометрують за $\lambda=532$ нм в кюветі з товщиною оптичного шару 10 мм проти дистильованої води.

Розрахунок проводять за формулою:

$$ЗАА (\%) = \frac{E_k - E_d}{E_k} \times 100,$$

де E_k і E_d – оптична щільність контрольної і дослідної проб.

Діагностичне значення. Загальна антиоксидантна активність крові знижується в разі захворювань печінки, хронічних обструкцій легень, внутрішньощлункових кровотеч, некротичних ентероколітів, гіповітамінозів А і Е. ЗАА плазми людей становить у нормі 7,6–10%.

Література: [21, С. 367; 22, С. 375].

9.10.2. Визначення активності супероксиддисмутази

Принцип методу. Активність супероксиддисмутази визначають за рівнем інгібування ферментом процесу відновлення нітросинього тетразолію за наявності NADH і феназинметасульфату.

Реактиви: 0,15 М фосфатний буфер, рН 7,8; EDTA; 10% розчин желатини; нітросиній тетразолій, феназинметасульфат; NAD•H; етиловий спирт 96°; хлороформ.

Хід визначення. Для визначення активності супероксиддисмутази еритроцити відмивають від плазми фізіологічним розчином натрію хлориду за повторного центрифугування за 4° С. Гемоглобін осаджують сумішшю спирту з хлороформом. Для цього до 0,1 мл еритроцитів, попередньо гемолізованих і розведених у 10 разів 5М тріс-НСl (рН 7,4), додають 0,25 мл етанолу і 0,15 мл хлороформу. Активність СОД визначають у надосадовій рідині. Супернатант додають в інкубаційну суміш (1 мкМ EDTA; 1 мг желатини; 1,407 мкМ нітросинього тетразолію; 1,8 мкМ феназинметасульфату; 0,1 мкМ NAD•H) в об'ємі 0,04–0,06 мл, що спричинює гальмування нітросинього тетразолію. Загальний об'єм інкубаційної суміші доводять до 3 мл фосфатним буфером (0,15 М, рН 7,8). Контрольні проби містять ті ж самі компоненти, крім супернатанту, замість якого додають адекватну кількість буфера. Запускають реакцію додаванням NAD•H у дослідні і контрольні проби. Інкубацію здійснюють протягом 10 хв у темряві за кімнатної температури. Оптичну густину контрольних і дослідних проб визначають на спектрофотометрі за довжини хвилі 540 нм.

Активність СОД визначають за формулою:

$$A = KE - DE / c \times (2 \text{ умов.од./мг білка}),$$

де C – кількість білка у пробі, мг; KE – екстинція в контрольній пробі; DE – екстинція в дослідній пробі.

Література: [27, С. 30–33].

9.10.3. Визначення активності супероксиддисмутази еритроцитів (СОД)

Принцип методу. Нітротетразолій відновлюють супероксидними радикалами, які утворюються під час реакції між феназинметасульфатом і відновленою формою нікотинамідаденіндинуклеотиду (NAD•H).

Утворення нітрофармазану – продукту відновлення нітротетразолію, блокується наявністю у пробі супероксиддисмутази. За кількістю нітрофармазану можна судити про активність СОД.

Реактиви: 1) 0,15 М фосфатний буфер (рН=7,8); 2) ТРІС-ЕДТА-буфер (рН=8,0); 3) інкубаційна суміш: 37 мг ЕДТА-Na₂, 330 мг тетразолію нітросинього, 55 мг феназинметасульфату змішують з 300 мл фосфатного буфера, залишають на 12 год, потім фільтрують; 4) розчин NAD•Н. 152 мг NAD•Н розчиняють в 100 мл ТРІС-ЕДТА-буфера (рН=8,0); 5) абсолютний етиловий спирт; 6) хлороформ.

Хід визначення. Для отримання еритроцитів беруть 0,4 мл крові і вносять у пробірку з умістом 0,1 мл 1,34% розчину натрію оксалату. Перемішують, центрифугують 5–10 хв за 3000 об./хв. Плазму видаляють, до осаду еритроцитів додають 0,4 мл ізотонічного розчину натрію хлориду, легко перемішують і центрифугують 5–10 хв за 3000 об./хв. Надосадову речовину видаляють, до еритроцитів додають нову порцію 0,9% розчину NaCl. Промивання еритроцитів повторюють двічі, потім видаляють надосадову рідину і готують гемолізат – до 0,1 мл відмитих еритроцитів додають 0,9 мл дистильованої води.

До 1 мл гемолізату для виключення з реакції гемоглобіну додають 0,5 мл абсолютного етилового спирту, 0,25 мл хлороформу і 300 мг КН₂Р₀₄. Інтенсивно перемішують скляною паличкою і центрифугують 30 хв за 5000 об./хв. У дослідну і контрольну проби додають по 1,5 мл інкубаційної суміші, 0,05 мл розчину НАДН і 0,1 мл супернатанту в дослідну пробу, а в контрольну – 0,1 мл дистильованої води.

Фотометрування контрольної і дослідної проб проводять через 10 хв за λ=540 нм в 1 см кюветі проти води.

Розрахунок СОД проводять за формулою:

$$СОД (\%) = \frac{E_k - E_0}{E_k} \times 100,$$

де E_k і E_0 – оптична густина контрольної і дослідної проб.

У здорових людей активність СОД еритроцитів становить 43,5–45,3%.

Клінічне значення (СОД). Супероксиддисмутаза займає центральне місце в системі ферментно-антиоксидантного захисту організму. За хімічною будовою – це металовмісний протеїн. В організмі тварин виділяють 3 ізоформи ферменту: цитозольну (складається із двох подібних субодиниць, що містять по одному іону купруму й цинку – Cu, Zn-СОД), мітохондріальну (містить іони мангану – Mn-СОД) і позаклітинну (екстрацелюлярну) – E-СОД (Cu, Zn-СОД). Фермент має широкий діапазон активності (рН 4,8–10,2). Основна біологічна функція його полягає в каталізі реакції утворення пероксиду гідрогену із двох супероксидних аніонів. Цим СОД захищає

клітини від токсичних форм кисню (супероксидного аніон-радикала – O_2^-) на початку процесу ПОЛ.

Активність СОД підвищується в 1,5–5 разів в усіх випадках, коли в клітинах збільшується концентрація супероксидних аніонів (O_2^-), що спостерігається в разі запальних та інфекційних захворювань шлунково-кишкового каналу, легеневої системи, за інфарктів міокарда, різних захворювань серця і судин, хвороб печінки (особливо за жирової гепатодистрофії), хімічних отруєнь, пухлин, лейкемії, залізодефіцитної анемії, захворювань нирок, стресу. Крім того, активність ферменту підвищується за тривалого лікування кортикостероїдними препаратами та інсуліном.

Знижується активність СОД за ішемії міокарда, печінки, нирок, внаслідок отруєння оксидом карбону, кадмієм, плюмбумом (свинцем), за асептичних процесів, хронічного гепатиту, цирозу та фіброзу печінки, токсикозів у останні місяці вагітності, під час лікування препаратами бензилпеніциліну, стрептоміцину, левоміцетину та іншими антимікробними засобами. Низька активність СОД – несприятлива ознака, яка свідчить про знижену неспецифічну резистентність організму.

Література: [21, С. 368; 22, С. 380; 78, С. 2–18].

9.10.4. Визначення активності каталази еритроцитів

Принцип методу. Пероксид гідрогену (H_2O_2) утворює з натрію молібдатом перекисні сполуки жовтого забарвлення, інтенсивність якого залежить від активності каталази в пробі.

Реактиви: 1) 0,3% розчин пероксиду гідрогену; 2) 4% розчин натрію молібдату.

Хід визначення. Для дослідження використовують гемолізат еритроцитів, який готують із співвідношення 0,1 мл відмитих еритроцитів і 4,9 мл дистильованої води.

У дослідну і контрольну пробірки додають по 2 мл розчину пероксиду гідрогену; у дослідну – 0,01 мл гемолізату; у контрольну – 0,01 мл дистильованої води. У кожену пробу додають по 1 мл розчину натрію молібдату, перемішують і відразу вимірюють екстинцію за $\lambda=410$ нм в кюветі 10 мм проти дистильованої води. Розрахунок проводять за формулою:

$$\text{Каталаза (\%)} = \frac{E_k - E_0}{E_k} \times 100,$$

де E_k і E_0 – оптична щільність контрольної і дослідної проб.

Література: [21, С. 368–369; 22, С. 381].

9.10.5. Визначення активності каталази в крові

Принцип методу. Метод оснований на здатності пероксиду гідрогену (H_2O_2) утворювати з молібдатом амонію стійкий забарвлений комплекс з максимумом поглинання за 410 нм.

Обладнання: Спектрофотометр або фотоелектроколориметр; водяна баня або термостат; аналітичні ваги; секундомір; бюретки; мірні колби; хімічні і центрифужні пробірки; піпетки з поділками або автоматичні дозатори об'ємом 0,02–10 мл.

Реактиви: 1) 0,04412 н розчин пероксиду водню (гідрогену). Готують 0,08% розчин H_2O_2 і встановлюють точну концентрацію титруванням 0,01 н розчину $KMnO_4$. На титрування 5 мл 0,04412 н розчину H_2O_2 має піти 22,06 мл 0,01 н розчину $KMnO_4$. За результатами титрування розчин H_2O_2 доводять до потрібної концентрації бідистильованою водою. Готують перед визначенням. **Не зберігають!**; 2) 4,5% розчин амонію молібдату; 3) 0,1 моль/л тріс- HCl -буфер, рН 7,4; розчиняють 6,5 г трісу (гідроксиметиламінометану), потім доводять рН до 7,4, додаючи краплями концентровану HCl . Доводять об'єм до 100 мл у мірній колбі. Придатний упродовж 6 міс. за температури 4–8°С; 4) буферно-субстратна суміш: 10 мл тріс- HCl -буфера змішують з 30 мл 0,04412 н розчину H_2O_2 .

Вимоги до проби і приготування гемолізатів. Для дослідження необхідно 0,5 мл стабілізованої гепарином крові. Гемолізати отримують протягом доби після відбору крові. До 0,5 мл гепаринізованої крові приливають 3,5 мл дистильованої води, добре перемішують і залишають на 5–10 хв за кімнатної температури – основний гемолізат, з якого надалі отримують робочий гемолізат. Основний гемолізат можна зберігати в замороженому стані до 14 днів (за температури –15°С) і упродовж 7 днів – за температури +4–8°С.

Хід визначення. До 0,2 мл основного гемолізату добавляють 3,8 мл води й інтенсивно перемішують, отримуючи робочий гемолізат. У дві хімічні пробірки наливають по 2 мл буферно-цитратної суміші і витримують на водяній бані за 37°С протягом 10 хв.

В одну з пробірок (дослідну) добавляють 0,1 мл робочого гемолізату, ретельно перемішують та інкубують точно 3 хв у водяній бані за 37°С. Реакцію зупиняють додаванням до дослідної проби спочатку 2 мл амонію молібдату, а потім – 0,1 мл робочого гемолізату.

Вимірюють оптичну щільність дослідної і контрольної проб при 410 нм в кюветі з товщиною оптичного шару 1 см. Як розчин порівняння використовують суміш, яка складається з 1 мл буфера, 3 мл дистильованої води і 0,1 мл робочого гемолізату.

Активність каталази розраховують за формулою:

$$A, \text{мкмоль } H_2O_2 / \text{л} \cdot \text{хв} = \frac{(E_k - E_d) \times 4,1 \times 16 \cdot 10^5 \times 10^6}{2,22 \cdot 10^6 \times 3},$$

де A – активність ферменту (мкмоль пероксиду гідрогену/л·хв); E_k – оптична щільність контрольної проби; E_d – оптична щільність дослідної проби; 4,1 – кінцевий об'єм проби; $16 \cdot 10^5$ – фактор розведення; 10^6 – коефіцієнт перерахунку в мкмоль/л; $2,22 \cdot 10^6$ – коефіцієнт молярної екстинції H_2O_2 ; 3 – час інкубації, хв.

Референтні значення каталази (мкмоль H_2O_2 /л·хв): велика рогата худоба – 30–40; вівці – 20–30; свині – 45–60; кури – 40–60.

Клінічне значення. Каталаза – гемопротейн, який містить 4 гемові групи. Вона каталізує розщеплення пероксиду гідрогену на воду і молекулярний кисень. Фермент є в усіх тканинах, де відбуваються процеси клітинного дихання за присутності цитохромів, тобто там, де можливо утворення пероксиду гідрогену (токсичної для клітин сполуки). Найвища активність ферменту виявлена в печінці, еритроцитах і нирках. У клітині каталаза локалізується у цитозолі і мітохондріях. У позаклітинних рідинах вона швидко втрачає свою активність. Активність ферменту підвищується завжди, коли активізуються процеси ПОЛ і в клітинах збільшується концентрація H_2O_2 .

Література: [10; 60, С. 175–176; 62, С. 16–19; 71, С. 66–68].

9.10.6. Визначення активності пероксидази у крові

Принцип методу. Метод оснований на визначенні швидкості реакції окиснення бензидину пероксидом гідрогену за участі ферменту з утворенням забарвленого комплексу, який має максимум поглинання за 520 нм.

Обладнання. Спектрофотометр; ультратермостат; аналітичні ваги; секундомір, бюретки для титрування; хімічні і центрифужні пробірки; мірні колби, піпетки з поділками або автоматичні дозатори об'ємом 0,02–10 мл.

Реактиви: 1) 2,5 ммоль/л розчин бензидину: 184,2 мг бензидину розчиняють під час нагрівання в суміші з 100 мл бідистильованої води і 2,3 мл льодяної оцтової кислоти. Після повного розчинення бензидину розчин охолоджують і розчиняють у ньому 5,45 г триводного натрію ацетату. Після цього загальний об'єм розчину доводять дистильованою водою до 400 мл; 2) 0,333 н розчину пероксиду гідрогену: спочатку готують його 0,6% і концентрацію пероксиду визначають титруванням

0,1 н розчином калію перманганату. На титрування 3 мл 0,333 н розчину H_2O_2 має визначатися 10 мл 0,1 н KMnO_4 . За результатами титрування розчин H_2O_2 доводять до потрібної концентрації дистильованою водою.

П р и м і т к а. Оскільки метод вимагає визначення оптичної щільності реакційної суміші в точно визначений момент часу, слід використовувати спектрофотометр з цифровою реєстрацією результатів часу (СФ–46, СФ–56 або СФ–2000).

Вимоги до проби і приготування гемолізатів. Для дослідження необхідно 0,5 мл стабілізованої гепарином крові, яку можна зберігати за 4°C упродовж доби після взяття крові. До 0,5 мл стабілізованої гепарином крові додають 3,5 мл дистильованої води, добре перемішують і залишають на 5–10 хв за кімнатної температури – основний гемолізат, з якого надалі отримують робочий гемолізат. Основний гемолізат можна зберігати в замороженому стані до 14 діб (за температури -15°C) або упродовж 7 діб за температури $4-8^\circ\text{C}$.

Хід визначення. До 0,1 мл основного гемолізату додають 19,9 мл дистильованої води – робочий гемолізат. У термостатуючу кювету з довжиною оптичного шляху 1 см доливають 2 мл розчину бензидину і 0,5 мл розчину пероксиду гідрогену, попередньо підігрітих до 37°C . Вміст кювети перемішують, відкривають шторку спектрофотометра і, змінюючи ширину щілини, встановлюють показання приладу на нульову позначку за довжини хвилі 520 нм. У кювету добавляють 0,1 мл робочого гемолізату, перемішують і рівно через 1 хв (за секундоміром) знімають показники оптичної щільності дослідної проби.

Для обліку змін оптичної щільності за рахунок неферментативного окиснення бензидину аналогічно дослідній пробі проводять вимірювання оптичної щільності контрольної проби, яка містить замість робочого гемолізату 0,1 мл дистильованої води.

Розрахунок активності пероксидази крові проводять за формулою:

$$A, \text{ ум.од.опт. густ./л}\cdot\text{с} = \frac{(E_d - E_k) \times 16,08 \cdot 10^6}{60},$$

де A – активність ферменту, ум. од. опт. густ./л·с; E_d – оптична густина дослідної проби; E_k – оптична густина контрольної проби; $16,08 \cdot 10^6$ – фактор розведення; 60 – час проведення реакції, с.

Референтні значення (ум. од. опт. густ./л·с): велика рогата худоба – 40–60; вівці – 40–50; свині – 45–65; кури – 30–40.

Клінічне значення пероксидази. В організмі тварин пероксидаза міститься в багатьох біологічних субстратах, а саме: у слині, соку підшлункової залози, кишечнику, печінці, нирках, легенях, селезінці та лейкоцитах. Вона відновлює H_2O_2 до води і кисню.

Пероксидазна активність крові зумовлена наявністю її в зернистих лейкоцитах. Фермент адсорбується на мембранах фагоцитованих бактерій, генерує альдегіди, синглетний кисень, інші вільні радикали, які руйнують клітини.

Активність пероксидази зростає у разі інфекційних захворювань. Її активність у крові становить 30–65 од.опт.густ./л.с.

Література: [10; 60, С. 177–178].

9.10.7. Визначення активності глутатіонпероксидази

Принцип методу. Глутатіонпероксидаза, відновлюючи гідро пероксиди, окиснює відновлений глутатіон, за зменшенням якого в середовищі інкубації визначається активність ферменту.

Обладнання. Спектрофотометр; центрифуга рефрижераторна; водяна баня; холодильник; аналітичні ваги I класу точності; секундомір; рН-метр; мірні колби; хімічні та центрифужні пробірки; піпетки з поділками або автоматичні дозатори об'ємом від 0,02 до 10 мл.

Реактиви: 1) 0,1 моль/л фосфатний буфер рН 7,4: 6,8 г $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ розчиняють в 500 мл, 11,4 г $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ – у 500 мл бідистильованої води і змішують отримані розчини під контролем рН-метра до потрібного значення; 2) 31,88 ммоль/л відновленого глутатіону (Fluka, Sigma): 24,29 мг відновленого глутатіону, 14,52 мг натрію азиду і 27,68 мг ЕДТА-На розчиняють у 35 мл фосфатного буфера, рН 7,4. Розчин готують безпосередньо перед дослідженням; 4) 13,8 ммоль/л розчину пероксиду гідрогену. На титрування 1 мл такого розчину повинно витратитися 6,96 мл 1 н розчину KMnO_4 . За результатами титрування розчин пероксиду гідрогену доводять водою до потрібної концентрації; 5) 10% розчин трихлороцтової кислоти: 10 г ТХО розчиняють в 90 мл дистильованої води; 6) 0,3 моль/л фосфатний буфер, рН 8,0: 10,2 г $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ розчиняють у 250 мл; 34,2 г $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ – у 500 мл бідистильованої води, під контролем рН-метра розчини змішують до необхідного водневого показника (рН); 7) 10,0 ммоль/л розчину Еллмана (Fluka): 39,6 мг 5,5-дітіо-біс-(2-нітро-бензойної) кислоти розчиняють в 10 мл абсолютного метилового спирту.

Вимоги до проб і приготування гемолізатів. Відразу після взяття до 0,5 мл стабілізованої гепарином крові приливають 3,5 мл бідистильованої води, інтенсивно перемішують і залишають у холодильнику або в льоді на 10–15 хв для більш повноцінного гемолізу. Визначення активності ферменту проводять не пізніше 24 год після взяття крові і отримання

гемолізату за умов його зберігання за температури 4–8° С. (*Гемолізати не заморозувати!*)

Хід визначення. У пробірках змішують по 1 мл розчину глутатіону і гемолізату. Потім по 0,5 мл суміші переносять у 2 центрифужні пробірки (дослідна і контрольна), ставлять їх у водяну баню за 37° С та інкубують 5 хв. У першу пробірку (дослідну) добавляють 0,1 мл розчину пероксиду водню, інтенсивно струшують і залишають у водяній бані. Рівно через 1 хв (за секундоміром) у дослідну і контрольну проби приливають по 2 мл холодного 10% розчину ТХО. У контрольну пробірку тільки після цього добавляють 0,1 мл розчину Н₂О₂. Обидві пробірки струшують і ставлять на 10 хв у холодильник. Потім пробірки центрифугують за 3000 об./хв і температурі 4–8° С 15 хв. По 0,5 мл надосадової рідини з дослідної і контрольної пробірок переносять у хімічні пробірки і приливають по 10 мл фосфатного буфера (рН 8,0). В обидві пробірки добавляють по 0,05 мл реактиву Еллмана й інтенсивно перемішують. Вимірюють оптичну густину дослідної і контрольної проб проти холостої (готують як і дослідну, але замість гемолізату вносять 1 мл дистильованої води) в кюветі з товщиною оптичного шару 1 см за довжини хвилі 412 нм.

П р и м і т к а. Реактив Еллмана необхідно добавляти до буфера після внесення в нього супернатанту якомога швидше.

Розрахунок активності глутатіонпероксидази крові проводять за формулою:

$$A, \text{мкмоль } G-SH / \text{л} \cdot \text{хв} = \frac{(E_k - E_d) \times 10,55 \cdot 10^6 \times 166,4}{13100},$$

де E_d – оптична щільність дослідної проби; E_k – оптична щільність контрольної проби.

Фізіологічні значення (мкмоль G-SH/л·хв) для тварин: велика рогата худоба – 10–20; вівці – 8–15; свині – 8–15; кури – 10–15.

Клінічне значення. Глутатіонпероксидаза є одним із важливих елементів антиоксидантної системи організму. Вона локалізується в цитозолі та матриксі мітохондрій. Глутатіонпероксидаза – селеновмісний фермент, який каталізує перетворення не лише пероксиду гідрогену, а й гідропероксиди жирних кислот, білкового та нуклеїнового походження, які в подальшому можуть метаболізуватися клітинними системами. Спорідненість глутатіонпероксидази до Н₂О₂ вища, ніж у каталази, тому вона більш ефективно каталізує Н₂О₂ за низьких її концентрацій, у той же час за високих концентрацій Н₂О₂ ключова роль належить каталазі.

За впливу глутатіонпероксидази відновлений глутатіон реагує з пероксидом гідрогену і перетворюється в окиснений, який за участі

глутатіонредуктази знову переходить у відновлений. Зміна концентрації селену в крові добре корелює з активністю глутатіонпероксидази.

Активність глутатіонпероксидази підвищується під час інтенсивного утворення продуктів ПОЛ в організмі тварин, у раціонах яких надлишок поліненасичених жирних кислот. Зниження активності ферменту спостерігається в разі дефіциту селену, залізодефіцитної анемії, отруєння плумбумом (свинцем), ниркової недостатності, аутоімунних захворювань, пухлин, ревматоїдних артритів, репродуктивних порушень у самок.

Література: [46, С. 203–207; 60, С. 178–180; 71, С. 69–71; 78, С. 2–18].

9.10.8. Визначення активності глутатіонредуктази в крові

Принцип методу. Глутатіонредуктаза, використовуючи відновлені форми піридиннуклеотидів, переводить окиснену форму глутатіону у відновлену. За ступенем збільшення кількості відновленого глутатіону в середовищі інкубації розраховують активність ферменту.

Обладнання. Спектрофотометр або фотоелектроколориметр; центрифуга рефрижераторна; водяна баня; холодильник; аналітичні ваги I класу точності; секундомір; рН-метр; мірні колби; хімічні та центрифужні пробірки; піпетки з поділками або автоматичні дозатори місткістю від 0,02 до 10 мл.

Реактиви: 1) 0,1 М фосфатний буфер, рН 7,4: 6,8 г $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ розчиняють у 500 мл; 11,4 г $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ – у 500 мл бідистильованої води і змішують отримані розчини під контролем рН-метра до потрібного значення; 2) 4,0 ммоль/л окисненого глутатіону (Fluka). 134,75 мг окисненого глутатіону і 0,5 мг ЕДТА-На розчиняють у 55 мл фосфатного буфера, рН 7,6. Розчин готують в день дослідження; 3) 5,35 ммоль/л розчин НАДФ·Н₂: 11,16 мг НАДФ·Н₂ (Fluka, Sigma) розчиняють в 2,5 мл бідистильованої води. Розчин готують перед використанням; 4) 10% розчин трихлороцтової кислоти: 10 г ТХО кислоти (Fluka, Sigma) розчиняють в 90 мл дистильованої води і доводять об'єм до 100 мл у мірній колбі; 5) 0,3 моль/л фосфатний буфер, рН 8,0: 10,2 г $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ розчиняють у 250 мл дистильованої води, 34,2 г $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ – у 500 мл води, під контролем рН-метра розчини змішують до потрібного водневого показника (рН); 6) 10,0 ммоль/л розчин реактиву Еллмана: 39,6 мг 5,5-дитіо-біс-2-нітробензойної кислоти розчиняють в 10 мл абсолютного метилового спирту.

Вимоги до проб і приготування гемолізатів. Відразу після взяття до 0,5 мл стабілізованої гепарином крові приливають 3,5 мл бідистильованої води, інтенсивно перемішують і залишають у холодильнику на 10–15 хв для більш повноцінного гемолізу. Визначення активності ферменту

проводять не пізніше 24 год після взяття крові і отримання гемолізату за умов його зберігання за температури 4–8°С. *Гемолізати не заморозувати!*

Хід визначення. У дві пробірки вносять по 2 мл розчину окисненого глутатіону, додають по 1 мл гемолізату крові і добре перемішують. По 1 мл отриманої суміші переносять у дві центрифужні пробірки, поміщають їх у водяну баню за 37°С та інкубують 5 хвилин. У дослідну пробірку додають 0,1 мл розчину НАДФ·Н₂, інтенсивно струшують і залишають у водяній бані. Рівно через 10 хв у дослідну і контрольну пробірки приливають по 1 мл холодного 10% розчину ТХО. У контрольну пробірку тільки після цього додають 0,1 мл розчину НАДФ·Н₂. Обидві пробірки струшують і поміщають на 10 хв у холодильник. Проби центрифугують 15 хв за 3000 об/хв і температури 4–8°С.

По 1 мл супернатанту з контрольної та дослідної пробірок переносять в окремі хімічні пробірки і приливають по 5 мл фосфатного буфера, рН 8,0. Потім у обидві пробірки додають по 0,05 мл реактиву Еллмара і вміст ретельно перемішують. Вимірюють оптичну щільність дослідної проби порівняно з контрольною в кюветі шириною 1 см за 412 нм.

Розрахунок активності глутатіонредуктази проводять за формулою:

$$A, \text{ мкмоль GS / л} \cdot 5\text{хв} = \frac{E \cdot 6,05 \cdot 10^6 \cdot 84}{13100 \cdot 10 \cdot 2},$$

де A – активність ферменту, мкмоль окисненого глутатіону/л·5 хв; E – оптична щільність; 6,05 – кінцевий об'єм проби; 10^6 – коефіцієнт перерахунку в мкмоль/л; 84 – фактор розведення крові; 13100 – коефіцієнт молярної екстинції ТНФА; 10 – час інкубації, хв; 2 – коефіцієнт перерахунку на окиснений глутатіон.

Референтні величини, мкмоль GS/л·хв: велика рогата худоба – 150–450; вівці – 100–200; свині – 250–350; кури – 200–300.

Клінічне значення (ГР). Глутатіонредуктазі (ГР) належить важлива роль у перетворенні окисненої форми глутатіону (GSSG) у відновлену (GSH), що дає можливість забезпечити функціонування глутатіонзалежних антипероксидазних систем. Як донор гідрогену для відновлення окисненого глутатіону переважно використовується НАДФ, меншою мірою – НАДН. Активність глутатіонредуктази залежить суттєво від забезпеченості організму рибофлавіном. *Підвищення* активності глутатіонредуктази спостерігається за хронічних захворювань печінки, новоутворень. *Зниження* активності ферменту буває за В₂-гіповітамінозу.

Література: [10; 60, С. 178–180; 46; 71, С. 71–73].

9.10.9. Визначення відновленого глутатіону (GSH) у крові

Принцип методу. Сульфогідрильна група відновленого глутатіону вступає у реакцію з 5,5-дитіо-біс-2-нітробензойною кислотою (реактив Еллмана), внаслідок чого в еквімолярній кількості утворюється забарвлений у жовтий колір тіонітрофенільний аніон (ТНФА), який має максимум поглинання за $\lambda=412$ нм.

Обладнання. Спектрофотометр або фотоелектроколориметр; центрифуга рефрижераторна; водяна баня; холодильник; аналітичні ваги I класу точності; секундомір; рН-метр; мірні колби; хімічні та центрифужні пробірки; піпетки з поділками або автоматичні дозатори місткістю від 0,02 до 10 мл.

Реактиви: 1) 20% розчин ТХО кислоти (Fluka); 2) 0,3 моль/л фосфатний буфер, рН 8,0: 10,2 г $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ розчиняють у 250 мл і 34,2 г $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ – у 500 мл бідистильованої води. У розчин двозаміщеного калію фосфорнокислого під контролем рН-метра доливають розчин однозаміщеного калію фосфорнокислого до рН 8,0; 3) 10,0 ммоль/л розчин реактиву Еллмана: 39,6 мг 5,5-дитіо-біс-2-нітробензойної кислоти розчиняють в 10 мл абсолютного метилового спирту.

Вимоги до проб і приготування гемолізатів. Відразу після взяття до 0,5 мл стабілізованої гепарином крові доливають 3,5 мл бідистильованої води, ретельно перемішують і залишають у холодильнику на 10–15 хв для більш повного гемолізу. Визначення активності ферменту проводять не пізніше 24 год після взяття крові і отримання гемолізату за умови зберігання за температури 4–8° С. *Гемолізати не заморожувати!*

Хід визначення. До 2 мл гемолізату в центрифужній пробірці додають 1 мл 20% розчину ТХО. Проби інтенсивно перемішують і залишають у холодильнику на 15–20 хв. Потім їх центрифугують 15 хв за 3000 об/хв і температури від 0 до 4° С. Відбирають супернатант.

У дві хімічні пробірки набирають по 0,5 мл фосфатного буфера і в кожену додають по 1 мл супернатанту. У дослідну пробірку доливають 0,05 мл розчину реактиву Еллмана, а в контрольну – 0,05 мл метанолу. Уміст пробірок добре перемішують. Вимірюють оптичну щільність обох проб проти фосфатного буфера за довжини хвилі 412 нм в кюветі з шириною оптичного шару 10 мм.

Концентрацію відновленого глутатіону розраховують за формулою:

$$X, \text{ ммоль / л} = \frac{E_{\text{д}} - E_{\text{к}}}{13,1 \cdot 10^3} \cdot 72,6 \cdot 10^3,$$

де X – рівень відновленого глутатіону; $E_{\text{д}}$ – оптична щільність дослідної проби; $E_{\text{к}}$ – оптична щільність контрольної проби; 10^3 –

коефіцієнт молярної екстинції ТНФА при 412 нм; $72,6 \cdot 10^3$ – фактор розведення; $13,1 \cdot 10^3$ – коефіцієнт молярної екстинції ТНФА при 412 нм.

Референтні величини, ммоль/л: велика рогата худоба – 0,5–0,8; вівці – 0,5–0,7; свині – 0,4–0,7; кури – 0,6–0,8.

Література: [10; 19; 60, С. 181–183; 71, С. 73–75].

9.10.10. Визначення відновленого глутатіону в еритроцитах крові (метод Батлера–Дюбона–Келлі)

Принцип методу. Відновлений глутатіон у результаті взаємодії з реактивом Еллмана (5,5-дитіо-біс-2-нітробензойної кислоти) утворює сполуку (2-нітро-6-меркаптобензойна кислота) жовтого кольору, інтенсивність забарвлення якої пропорційна вмісту глутатіону.

Реактиви: 1) осаджувальний реактив. У мірному стакані на 500 мл розчиняють послідовно (в невеликому об'ємі дистильованої води): льодяну метафосфорну кислоту – 6,68 г, трилон Б – 0,8 г, натрій хлористий – 120 г. Доводять об'єм дистильованою водою до 400 мл; 2) 0,3 М розчин Na_2HPO_4 ; 3) реактив Еллмана (0,04% розчин 5,5-дитіобіс-2-нітробензойної кислоти в 1% розчині тризаміщеного натрію цитрату); 4) стандартний розчин відновленого глутатіону – 5 ммоль/л. Із нього розведенням готують робочі розчини: 0,1 ммоль/л; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 3,5; 4,0 і 4,5 ммоль/л; 5) розчин антикоагулянту. Використовують 6% розчин ЕДТА в 0,15 М розчині КСІ рН 7,3–7,4 (до потрібного рН доводять краплями 5% розчином КОН).

Хід визначення. А. *Отримання еритроцитарної маси.* У чисту центрифужну пробірку, яка містить 1 мл антикоагулянту, набирають 4 мл крові. Потім її центрифугують 15 хв за 3000–3500 об./хв. Плазму крові видаляють і додають у пробірку 0,9% розчин NaCl у співвідношенні з еритроцитарною масою 1:3. Уміст пробірок інтенсивно перемішують і центрифугують 15 хв за 3000–3500 об./хв. Відсмоктують прозорий шар розчину NaCl, подібним чином еритроцити промивають трічі.

Б. *Приготування гемолізату еритроцитів 1:10.* 0,2 мл еритроцитарної маси вносять у 1,8 мл дистильованої води. Перемішують скляною паличкою.

Інгредієнти	Дослідна проба, мл	Контрольна проба, мл
Гемолізат еритроцитів 1:10	2,0	–
Осаджувальний реактив	3,0	3,0
Дистильована вода	–	2,0

Перемішують і витримують 5 хв за кімнатної температури, центрифугують 15 хв за 3000–3500 об/хв, після чого відфільтровують надосадову рідину.

Центрифугат	2,0	2,0
0,3М Na ₂ HPO ₄	8,0	8,0
Реактив Еллмана	0,1	0,1

Через 5 хв фотометрують дослідну пробу проти контрольної за $\lambda=412$ нм в кюветі з товщиною шару 10 мм.

Розрахунок кількості відновленого глутатіону в еритроцитах проводять за калібрувальною кривою, яку будують шляхом введення в методику, замість гемолізату еритроцитів, робочих розчинів відновленого глутатіону: 0,1 ммоль/л; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 3,5; 4,0; 4,5 і 5,0 ммоль/л. На кожне розведення готують три і більше паралельних проби.

Клінічне значення. У організмі глутатіон знаходиться в основному у відновленій формі (G-SH) і лише 1–3% припадає на окиснену (G-SS-H). Глутатіон – головне джерело мобільних сульфогідрильних груп. Він бере активну участь у транспорті амінокислот, метаболізмі дисульфідів та підтриманні сульфогідрильних груп білків у відновленому стані, у реакціях з гідропероксидами без присутності ферментів або каталізаторів. Крім того, він реагує з вільними радикалами, подібно до α -токоферолу.

Клінічне значення має зниження концентрації глутатіону в разі підвищення інтенсивності ПОЛ в організмі.

Література: [21, С. 370–372; 22, С. 382–384].

РОЗДІЛ 10

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ ОБМІНУ МАКРО- І МІКРОЕЛЕМЕНТІВ

Із 92 елементів, що зустрічаються у природі, 81 знайдено в організмі тварин. Залежно від кількості, в якій вони містяться в організмі, мінеральні елементи поділяють 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} – $10^{-5}\%$ від 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 містить 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 у різних індивідуумів;
- синтетичний раціон, який не містить цього елемента, спричинює у тварин характерні симптоми недостатності й типові біохімічні зміни;
- симптомам і змінам можна запобігти або усунути їх шляхом включення цього елемента в експериментальний раціон.

Література: [17, С. 193].

10.1. Визначення загального кальцію в реакції з кальційарсеназо III

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

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

Реактиви: 1) реагент для визначення кальцію (робочий) – 0,008% розчин арсеназо III в 0,05 М трис-НСІ або ацетатному буфері з рН 6,7–6,8; 2) еталон кальцію (0,025 М CaCl₂ в 0,02 М НСІ).

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 об'ємами бідистильованої води. Розчин стабільний за умови зберігання у 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 за зберігання 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 за кімнатної температури і колориметрують за довжини хвилі 590–650 нм на спектрофотометрі або фотоелектроколориметрі відносно контролю в кюветі з товщиною оптичного шару 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 10.1.

Діагностичне значення. Зниження вмісту кальцію у сироватці крові – *гіпокальціємія* – діагностується у разі тривалої нестачі кальцію в раціоні, зменшення засвоєння його внаслідок дефіциту вітаміну D та порушення його обміну, у разі рахіту, остеодистрофії, післяродової гіпокальціємії (родильного парезу). Хвороби печінки у разі хронічного перебігу (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 у еритроцитах кальцієзв'язувального білка. Крім того, через хвороби печінки зменшується виділення жовчі та синтез жовчних кислот, які сприяють всмоктуванню важкорозчинних солей кальцію і вітаміну D.

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)	8,0–12,0	2,0–3,0
Кури (продуктивний період)	18,0–36,0	4,5–9,0
Індики (продуктивний період)	26,0–42,0	4,0–4,5

Ураження нирок (нефрит, нефроз, нефролітаз) також спричиняє гіпокальціємію. У разі нефриту, й особливо нефрозу, настає гіпопротеїнемія внаслідок втрати з сечею альбумінів, з якими частково зв'язаний кальцій сироватки крові. Крім того, у разі 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*) діагностують у разі передозування препаратів вітаміну D, згодовування тваринам рослин, що містять дигідроксивітамін D₃, гіперфункції прищитоподібних залоз.

Література: [4, С. 72–74; 12, С. 121–134; 179–187; 60, С. 77–78].

10.2. Визначення вмісту загального, ультрафільтрувального, іонізованого та білокзв'язаного кальцію в сироватці крові

Принцип методу. Кальцій утворює з розчином гліоксаль-біс-(2-оксианілом) у лужному середовищі комплекс червоного кольору, який визначають фотометрично.

Обладнання. КФК-2, СФ-46, Specoll-11, КФК-3, СФ-2000, хімічно індиферентні та термостійкі пластикові пробірки, мірні колби, циліндри, напіваавтоматичні біохімічні дозатори.

Реактиви: Набір реактивів фірми "Lachema diagnostics": 1) стандартний розчин карбонату кальцію 25 ммоль/л у 1,7% хлоридній (соляній) кислоті (11 мл); 2) гліоксаль-біс-(2-оксианіл) (1 флакон); 3) розчин натрію гідроксиду (1 моль/л; 1 флакон – 32 мл); 4) 96% етиловий спирт; 5) бідистильована вода; 6) оксид алюмінію нейтрального, стандартизований за Брехманом.

Приготування робочих розчинів

1. У мірну колбу ємністю 50 мл вносять 5,0 мл реактиву № 1 і доводять водою до позначки. Розчин містить 2,5 ммоль/л кальцію. Стійкість: декілька тижнів за температури +2—+25° С.

2. Наважку реактиву № 2 розчиняють у цілому об'ємі реактиву № 4 або залежно від кількості визначень 30 мг гліоксаль-біс-(2-окси-анілу) на 29 мл метанолу. **Готується перед використанням!**

3. Змішують 20 мл реактиву № 3 з 30 мл бідистильованої води. Розчин містить 0,4 моль/л гідроксиду натрію або, залежно від кількості досліджуваних проб, 2 г кристалічного NaOH на 125 мл бідистильованої води. **Готується перед використанням!**

10.2.1. Визначення вмісту загального кальцію

Хід визначення. До 1,0 мл бідистильованої води додають 0,04 мл сироватки крові, перемішують, після чого вносять по 0,5 мл 0,4 моль/л розчину гідроксиду натрію, ретельно перемішують і через 5–10 хв додають по 2 мл розчину гліоксаль-біс-(2-оксианілу). Знову перемішують та у проміжку між 5 та 15 хвилинами вимірюють оптичну щільність досліджуваних зразків і стандарту за довжини хвилі 540 нм, товщина оптичного шару кювети 10 мм відносно контрольного розчину. Стандартний та контрольний розчини готують таким же чином, але замість сироватки крові додають по 0,04 мл стандартного розчину кальцію з концентрацією 2,5 ммоль/л та 0,04 мл бідистильованої води відповідно.

Розрахунок проводять за формулою:

$$Ca_z \text{ (ммоль/л)} = (E_{\text{досл.}} : E_{\text{стан.}}) \times 2,5,$$

де $E_{\text{досл.}}$ і $E_{\text{стан.}}$ – екстинція дослідної і стандартної проб.

10.2.2. Визначення вмісту білокзв'язаного кальцію в сироватці крові

До 0,1 мл сироватки крові додають по 1,0 мл 96% розчину етанолу, ретельно перемішують (автоматичний змішувач) і залишають за кімнатної температури на 30 хв. Потім центрифугують за 3000 об/хв, упродовж 15 хв до утворення щільного осаду. Зливають надосадову рідину та підсушують осад на водяній бані за 45–50° С до остаточного видалення залишків етанолу. Щільний осад розчиняють у 0,5 мл 0,4 М розчину гідроксиду натрію і ставлять для гідролізу в киплячу водяну баню на 10 хв. Охолоджують до кімнатної температури. До утвореного гідролізату додають 1,0 мл бідистильованої води, а потім 2 мл розчину глюксаль-біс-(2-оксианілу). Екстинцію вимірюють між 5 та 15 хвилинами (540 нм, кювета з шириною оптичного шару 10 мм).

Розрахунок проводять за формулою:

$$\text{Білокзв'язаний кальцій (ммоль/л)} = (E_{\text{досл.}} : E_{\text{стан.}}).$$

Вміст ультрафільтрувального кальцію визначають за різницею концентрації загального та білокзв'язаного кальцію сироватки крові.

10.2.3. Визначення вмісту іонізованого кальцію в сироватці крові

У хімічно індиферентні пластикові пробірки вносять по 20 мг оксиду алюмінію нейтрального. Додають по 1,0 мл сироватки крові. Перемішують скляною паличкою або на автоматичному змішувачі 2–3 хв. Після цього центрифугують за 3000 об/хв упродовж 10 хв до утворення щільного осаду. Потім відбирають по 0,04 мл надосадової рідини та проводять дослідження відповідно до методики визначення загального кальцію в сироватці крові.

Вміст іонізованого кальцію розраховують за різницею концентрації загального та кальцію, який не вступив в іонний обмін, а зв'язаного з кислотами – за різницею ультрафільтрованого та іонізованого.

П р и м і т к и: 1. Відбір крові слід проводити натще. Для взяття крові необхідно використовувати вакуумні пробірки і за можливості скоротити час між відбором крові та її направленням у лабораторію.

2. Під час постановки реакції слід уникати дослідження гемолізованих та ліпінізованих зразків сироватки крові.

3. Лабораторний посуд для визначення фракційного складу кальцію має бути ідеально чистим та підготовленим до використання за правилами, описаними у розділі 1.

Діагностичне значення. Кальцій у сироватці крові не є гомогенним (Бауман В.К., 1968), майже 40% його зв'язано з білками крові. Решта знаходиться в ультрафільтрувальній формі (приблизно 60–65%), яка містить іонізований (42–44%) та кальцій, зв'язаний з лимонною, карбонатною і ортофосфатною кислотами (до 25%). Іони кальцію відіграють надзвичайно важливу роль у нейром'язовому збудженні, вивільненні медіаторів, згортанні крові, проникності клітинних мембран; беруть участь у гомеостазі та метаболізмі глікогену; будучи вторинними внутрішньоклітинними месенджерами, забезпечують синтез гормонів.

Іони кальцію є ключовим регулятором клітинного метаболізму, тому рівень іонізованого кальцію суворо контролюється організмом і розглядається як фізіологічна константа. Регуляція підтримання кальцієвого гомеостазу здійснюється декількома органами – кишечником, нирками, кістковою тканиною, печінкою і трьома основними гормонами – паратиреоїдним, кальцитріолом та кальцитоніном.

Зниження вмісту загального кальцію в сироватці крові – *гіпокальціємія* – діагностується за недостатнього надходження його з кормом, дефіциту в раціоні вітаміну D або ж у разі порушення їх всмоктування та обміну в організмі. Різке зниження вмісту загального та іонізованого кальцію є характерним для післяродової гіпокальціємії [17, 42, 59]. Гострий ацидоз зменшує міцність зв'язування іонів кальцію з молекулою альбуміну, тому з підвищенням рН частка іонізованого кальцію збільшується. За алкалозу іони водню дисоціюють із молекули альбуміну, що призводить до зниження концентрації кальцієвих іонів.

Найбільш варіабельний гомеостаз кальцію у курей. У 150-добової птиці (на початку яйцекладки) вміст загального кальцію зростає у 2,5 рази (3,8–8,5; $6,28 \pm 0,53$ ммоль/л), порівняно з 90-добовою, і з невеликими змінами утримується на цьому рівні ($6,81 \pm 0,43$ ммоль/л) до 410-го дня. Збільшення рівня кальцію відбувається за рахунок ультрафільтрувальної фракції, зокрема кальцію, що зв'язаний з карбонатною, цитратною та фосфатною кислотами (кількість його зростає у 7–8 разів, порівняно з 90-добовою птицею). Вміст іонізованого кальцію залишається стабільним [61].

Література: [42; 59; 60, С. 80–82; 61].

10.3 Визначення загального кальцію (за реакцією з о-крезолфталеїнкомплексом)

Принцип методу. Іони кальцію в лужному середовищі вступають у реакцію з о-крезолфталеїнкомплексом. Інтенсивність фіолетового кольору пропорційна концентрації кальцію.

Обладнання: фотоелектроколориметр; пробірки об'ємом 10 мл; піпетки – 0,1 і 5 мл.

Реактиви: 1) хромоген: а) о-крезолфталеїнкомплексон; б) 8-оксихінолін; в) хлоридна кислота – 1 флакон (120 мл); 2) буфер – моноетаноламін – 1 флакон (120 мл); 3) калібрувальний розчин кальцію (2,5 ммоль/л, або 10 мг/100 мл) – 1 флакон (5 мл).

Використовують набір реактивів ТОВ НПП “Філісім-діагностика”, м. Дніпропетровськ. Розрахований на 44 макровизначень (об'єм для фотометрії відповідно 5 і 2 мл) або 110 напівмікровизначень.

Приготування робочих розчинів. Аналіз можна проводити у двох варіантах: біреагенту і монореагенту. Для варіанту аналізу *біреагент* всі розчини, готові для роботи, зберігаються за температури +2–8°С. Під час роботи у варіанті *монореагент* змішують рівні об'єми буфера і хромогену. Монореагент зберігається упродовж двох діб за температури +15–25°С або 4 доби за температури +2 – 4°С (зберігають у посуді з пластику).

Хід аналізу

Варіант аналізу	Інгредієнт, мл	Дослідна проба		Калібрувальна проба		Контрольна проба	
		мікро-аналіз	макро-аналіз	мікро-аналіз	макро-аналіз	мікро-аналіз	макро-аналіз
Моно-реагент	монореагент	2,0	5,0	2,0	5,0	2,0	5,0
	сироватка	0,02	0,05	–	–	–	–
	калібрувальний розчин	–	–	0,02	0,05	–	–
Біреагент	хромоген	1,0	2,5	1,0	2,5	1,0	2,5
	сироватка	0,02	0,05	–	–	–	–
	калібрувальний розчин	–	–	0,02	0,05	–	–
	буфер	1,0	2,5	1,0	2,5	1,0	2,5

Змішують і витримують 10±1 хв за кімнатної температури (+20–25°С). Вимірюють *не пізніше* 30±5 хв оптичну густину дослідної (E_D) і контрольної (E_K) проб проти контрольної за довжини хвилі 570 нм (550–590) у кюветах з шириною оптичного шляху 5 або 10 мм.

Розрахунок результатів:

Кальцій, ммоль/л = $2,5 \times (E_D : E_K)$, або

Кальцій, мг/100 мл = $10 \times (E_D : E_K)$.

П р и м і т к и: 1. Якщо концентрація кальцію у сироватці більша 4 ммоль/л, його розбавляють у співвідношенні 1:1 бідистильованою водою і результат перемножують на 2.

2. Кювети й пробірки необхідно упродовж кількох годин замочувати у хлоридній (HCl) кислоті (концентрація приблизно 2 ммоль/л) і ретельно промивати.

Література: [21, С.398–400; 22, С.408–410].

10.4. Визначення загального кальцію у сироватці крові трилонометричним методом

Принцип методу. Мурексид утворює з іонами кальцію в лужному середовищі нестійку комплексну сполуку червоно-фіолетового або блідо-рожевого кольору (залежить від концентрації кальцію). У разі додавання до розчину трилону Б утворюється більш стійка комплексна сполука, мурексид вивільняється, що зумовлює зміну кольору – рожевий переходить у фіолетовий або блідо-бузковий.

Обладнання: стаканчики на 50 мл, мікробюретка на 2 мл, піпетки.

Реактиви: 1) 0,005 н розчин трилону Б (готують з фіксаналу). 10 мл 0,1 н розчину доводять у мірній колбі дистильованою водою до 200 мл. Стійкий 2 міс.; 2) 2 н розчин натрію гідроксиду: 80 г реактиву (х.ч.) розчиняють в 1 л дистильованої води; 3) водний розчин індикатора мурексиду (чда, х.ч.) – 10–20 мг розчиняють у 20 мл води (готується в день проведення аналізу); 4) стандартний розчин кальцію – 2,5 ммоль/л (10 мг у 100 мл): 25 мг кальцію карбонату безводного розчиняють у мірній колбі на 100 мл. Для більшої точності на початку готують розчин, що містить 25 ммоль/л кальцію, розчинивши 100 мг кальцію карбонату (CaCO₃) у 5 мл 1 н HCl і довівши об'єм розчину до 100 мл дистильованою водою. З основного готують робочий стандартний розчин з концентрацією 2,5 ммоль/л: відбирають 10 мл основного розчину у мірну колбу на 100 мл і додають дистильовану воду до мітки. У такому разі готують не 2 н, а 9 н розчин натрію гідроксиду. У ході дослідження крові продуктивної птиці готують розчин з концентрацією кальцію 3,8 ммоль/л.

Хід визначення. У стаканчик вносять 10 мл води, 0,2 мл натрію гідроксиду, 0,5 мл сироватки крові і 3 краплі мурексиду. Одержують слабо-рожевий колір. Титрують розчином трилону Б до слабо-фіолетового або бузкового кольору, ідентичного стандартній пробі.

У стандартну пробу замість сироватки крові додають 0,5 мл розчину кальцію карбонату з умістом 10 мг/100 мл кальцію (2,5 ммоль/л). Титрують розчином трилону Б до такого ж кольору.

Розрахунок виконують за формулою:

$$X=A:B \times 2,5,$$

де: X – кількість кальцію, ммоль/л; A – кількість розчину трилону, витрачена на титрування сироватки крові; B – кількість розчину, витрачена на титрування стандарту; 2,5 – коефіцієнт для перерахунку в ммоль/л. Якщо розрахунок ведуть у мг/100 мл, то коефіцієнт – 10.

П р и м і т к а. Для порівняння кольору в контрольний стаканчик наливають 10 мл води, додають 0,2 мл розчину натрію гідроксиду і 3 краплі мурексиду – виникає блідо-фіолетове або бузкове забарвлення, з яким порівнюють під час титрування забарвлення дослідної і стандартної проб.

Література: [21, С. 397–398; 22, С. 407–408; 60, С.793; 63, С. 23–25].

10.5. 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.). Під час зберігання сироватки крові органічний фосфор розкладається зі збільшенням неорганічного. Щоб уникнути помилки у процесі дослідження, необхідно проводити аналіз лише свіжої сироватки крові або одержувати її безбілковий фільтрат після додавання трихлороцтової кислоти.

10.5.1. Визначення неорганічного фосфору в сироватці (плазмі) крові (за методом Пулса у модифікації Коромислова В.Ф. і Кудрявцевої Л.А.)

Принцип методу. Фосфор у безбілковому фільтраті крові з ванадат-молібденовим реактивом утворює лимонно-жовте забарвлення, інтенсивність якого пропорційна концентрації фосфору в зразку.

Обладнання: фотоелектроколориметр; центрифуга, колби конічні термостійкі ємністю 1 л, колби мірні на 50, 100, 500 і 1000 мл; піпетки.

Реактиви: 1) 20% розчин ТХО кислоти (ч.д.а.); 2) сульфатна (сірчана) кислота, х.ч.; 3) розчин молібдату амонію: 100 г речовини розчиняють у 500 мл дистильованої води, підігрітої до 50° С; після охолодження доливають 100 мл концентрованої сульфатної кислоти, знову охолоджують, переносять у мірну колбу ємністю 1 л і доводять бідистильованою водою до позначки. Реактив стійкий протягом 12 міс.; 4) розчин ванадату амонію: 2,5 г речовини розчиняють у 500 мл киплячої дистильованої води. Кип'ятіння продовжують, поки розчин не набуде жовтого забарвлення. Після охолодження розчин переносять у мірну колбу ємністю 1 л і доводять дистильованою водою до позначки. Реактив стійкий протягом 12 міс.; 5) *реактив на фосфор*. Готують змішуванням розчинів молібдату і ванадату амонію в рівних об'ємах. Реактив придатний до роботи упродовж 2 міс. за умови зберігання його у посудині з темного скла в холодильнику; 6) стандартний розчин фосфору. 0,4394 г однозаміщеного калію фосфату (ч.д.а.), висушеного до постійної маси за температури 105° С, розчиняють у мірній колбі ємністю 100 мл у 50 мл дистильованої води і доводять водою до позначки. В 1 мл розчину міститься 1 мг фосфору; 7) робочий стандартний розчин фосфору: 5 мл основного стандартного розчину вносять у мірну колбу на 100 мл і доливають дистильованою водою до позначки.

Хід визначення. 1. У центрифужну пробірку вносять 0,5 мл сироватки крові, додають 2,5 мл дистильованої води і 2 мл 20% розчину ТХО кислоти, перемішують і центрифугують 10 хв за 3000 об/хв.

2. 2,5 мл центрифугату переносять у пробірку, додають 2,5 мл реактиву на фосфор (див. реактив 5).

3. Стандарт: у пробірку вносять 0,5 мл робочого стандартного розчину, додають 2,5 мл дистильованої води і 2 мл 20% розчину ТХО кислоти, перемішують. 2,5 мл суміші переносять у пробірку, додають 2,5 мл реактиву на фосфор.

4. Контроль з реактивів: до 3 мл дистильованої води додають 2 мл 20% розчину ТХО кислоти. Далі контроль обробляють за п. 2.

5. Колориметрують досліджувані зразки і стандарт за довжини хвилі 436 нм у кюветі з товщиною оптичного шару 10 мм проти контролю з реактивів.

Розрахунок результатів проводять за формулою:

$$X = \frac{E_{\partial}}{E_{cm}} \times 5,$$

де X – вміст неорганічного фосфору в пробі, мг/100 мл; E_{∂} і E_{cm} – оптична густина дослідної проби і стандарту; 5 – коефіцієнт для робочого стандартного розчину фосфору (5 мг/100 мл).

- П р и м і т к и:** 1. Вільну від гемолізу сироватку необхідно досліджувати упродовж доби після взяття крові.
2. Для перерахунку у ммоль/л результат, одержаний у мг/100 мл, необхідно помножити на коефіцієнт 0,3229.

Література: [60, С. 82–84; 63, С. 25–27].

10.5.2. Визначення вмісту 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 і 5 мл, пробірки.

Реактиви: 1) молібденовий реактив – 0,39 М амоній молібденовокислий у 0,21М H₂SO₄ за присутності поверхнево-активних речовин; 2) стандартний розчин фосфору (50 мкг/мл) у вигляді КН₂РO₄).

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 за кімнатної температури і колориметрують за довжини хвилі 340 нм на спектрофотометрі або фотоелектроколориметрі відносно контролю у кюветі з товщиною оптичного 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:

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

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 становитиме: $0,85 \times 50 : 1,15 = 36,95$ мкг/мл (3,695 мг в 100 мл).

- П р и м і т к и:** 1. За концентрації неорганічного фосфору понад 80 мкг/мл пробу сироватки крові необхідно розвести дистильованою водою і повторити дослідження (результат помножити на ступінь розведення).

2. Якщо вміст фосфору менше 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.

Діагностичне значення. В організмі дорослих тварин міститься 0,6–0,75% фосфору в розрахунку на свіжу тканину. Майже 83–85% фосфору тіла знаходиться у кістковій тканині, де він разом з кальцієм утворює кристали гідроксиапатиту, який є головною структурою її мінерального компонента. У м'яких тканинах фосфор міститься в основному в органічній і частково – у мінеральній формах. Усі синтетичні процеси, зв'язані з ростом і утворенням продукції, здійснюються за участі сполук фосфатної кислоти. Фосфор входить до складу структури нуклеїнових кислот, які є носіями генетичної інформації, регулюють біосинтез білка та імунітет. Фосфор необхідний для фосфорилювання і окиснення багатьох важливих субстратів в обмінних процесах. Фосфатна кислота входить до складу коензимів переамінування, карбоксилювання, окиснювально-відновних ферментів.

Макроергічні фосфорні сполуки, серед яких центральне місце належить АТФ, є універсальними акумуляторами і донорами енергії, присутні в усіх клітинах організму і забезпечують як накопичення запасів енергії в ньому, так і її витрати (АТФ, АДФ, креатинфосфат). Похідний АТФ – циклічний аденозинмонофосфат (цАМФ) – локалізується в усіх тканинах і біологічних рідинах організму. За його участі реалізується дія багатьох гормонів на ферментні системи.

У сироватці крові для діагностики патології, зазвичай, визначають вміст неорганічного фосфору. Фізіологічні величини його наведено в таблиці 10.2.

Таблиця 10.2

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	1,45–2,10
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	1,45–2,10
Поросята відлучені	5,5–8,0	1,78–2,58
Собаки	4,0–6,0	1,30–1,94
Кішки	4,5–8,0	1,45–2,60
Кролі	2,5–3,5	0,81–1,13
Норки	2,5–6,5	0,81–2,10
Песці	2,0–5,0	0,66–1,62
Лисиці	2,0–5,2	0,66–1,68
Кури (продуктивний період)	4,5–6,8	1,45–2,20

Концентрація неорганічного фосфору у сироватці крові збільшується (*гіперфосфатемія*) у разі надлишку його в раціоні, передозування вітаміну D та зниження активності прищитоподібних залоз (збільшується реабсорбція фосфору в нирках), гломерулонефриту, нефротичного синдрому. Зниження вмісту неорганічного фосфору в сироватці крові (*гіпофосфатемія*) спостерігається у разі нестачі його в раціоні тварин, недостатнього засвоєння внаслідок розладів функцій травного каналу, дефіциту вітаміну D, а також за гіперфункції прищитоподібних залоз (збільшується виділення фосфору із сечею внаслідок зменшення його реабсорбції у ниркових каналцях), аліментарної остеодистрофії, рахіту та інших хвороб. Особливо виражено зменшення вмісту фосфору в сироватці крові високопродуктивних корів у перші дні після отелення (*післяродова гіпофосфатемія*) [17].

Література: [12, С. 127–134; 136–139; 17, С. 191–193].

10.6. Визначення магнію в сироватці крові

В організмі дорослих тварин міститься 0,035–0,040% магнію в розрахунку на свіжу тканину. Відкладається в основному у кістковій тканині (65–68%) та м'язах (25–28), решта його (7–8%) міститься у тканинній рідині, крові та інших тканинах. У крові магній циркулює у вільній, або іонізованій (65%), і зв'язаній з білками (35%) формах.

10.6.1. Визначення магнію в сироватці крові (з індикатором кальмагітом)

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

Обладнання: фотоелектроколориметр (КФК-2, КФК-3) або спектрофотометр, піпетки на 1 і 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 год за кімнатної температури. Зазвичай, готують такий об'єм робочого реактиву, який використовуватиметься 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 за кімнатної температури і колориметрують за довжини хвилі 520 нм на спектрофотометрі або фотоелектроколориметрі КФК-3 відносно 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 становитиме: $(0,123 \times 0,823 : 0,151 = 0,670 \text{ ммоль/л})$.

П р и м і т к а. Об'єми дослідного зразка і реагенту можна пропорційно зменшити або збільшити.

10.6.2. Визначення магнію в сироватці крові (за реакцією з титановим жовтим)

Принцип методу. Магній з титановим жовтим у лужному середовищі утворює оранжево-червону сполуку, інтенсивність забарвлення якої пропорційна концентрації магнію.

Реактиви: 1) 10% розчин натрію вольфрамату; 2) 0,67 н розчин сульфатної кислоти; 3) 1,5 н розчин натрію гідроксиду; 4) 0,2 н розчин натрію гідроксиду; 5) 2% розчин хлоридного (сульфатного) гідроксиламіну (зберігати у посудині з темного скла); 6) 0,075% розчин титанового жовтого; стабільний не більше 10 діб за умови зберігання в холодильнику у посуді з темного скла; 7) 0,1% розчин метилового червоного в 96° етанолі (індикатор з зоною переходу рН 4,4–6,2); 8) стандартний розчин магнію 1 ммоль/л: 0,2465 г кристалічного магнію сульфату $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ розчиняють у мірній колбі на 1 л, доводять об'єм до позначки дистильованою водою.

Хід визначення

Інгредієнти	Дослідна проба, мл	Контрольна проба, мл
Сироватка крові	1,0	–
Дистильована вода	2,0	3,0
Вольфрамат натрію	1,0	1,0
Перемішують		
Сульфатна кислота	1,0	1,0
Перемішують. Через 15 хв центрифугують 15–20 хв за 3000 об./хв		
Центрифугат	2,5	2,5
Індикатор	1 крапля	1 крапля
Нейтралізують 0,2 н NaOH до появи жовтого забарвлення		
Гідроксиламін	1,0	1,0
Титановий жовтий	1,0	1,0
Натрію гідроксид 1,5 н	2,0	2,0

Перемішують, доводять об'єм дистильованою водою до 10 мл і фотометрують на ФЕК за довжини хвилі 500–560 нм у кюветі з товщиною оптичного шару 10 мм проти контрольної проби.

Розрахунок проводять за калібрувальним графіком (табл. 10.3).

Таблиця 10.3

Дані для побудови калібрувального графіка на магній

№ з/п	Стандартний розчин магнію, мл	Вода, мл	Концентрація магнію, ммоль/л
1	0,2	5,8	0,4
2	0,4	5,6	0,8
3	0,6	5,4	1,2
4	0,8	5,2	1,6
5	1,0	5,0	2,0
6	1,2	4,8	2,4

У всі пробірки додають по 1,0 мл гідроксиламіну, 1,0 мл титанового жовтого, 2,0 мл 1,5 н розчину натрію гідроксиду, перемішують і колориметрують за тих же умов, що й дослідні проби проти контрольної, в якій замість стандартного розчину використовують 6,0 мл дистильованої води.

Література: [21, С. 391–393; 22, С. 400–402].

10.6.3. Визначення магнію в сироватці крові за кольоровою реакцією з титановим жовтим (метод Кункеля в модифікації Петрухіна І.В.)

Принцип – див. підрозділ 10.6.2.

Реактиви: 1) 20% розчин ТХО кислоти; 2) 0,02% розчин полівінілового спирту (200 мг розчинити в 1 л бідистильованої води при нагріванні), реагент стійкий; 3) титановий жовтий, амонійна сіль, ч., 0,01% розчин; готують у день аналізу на бідистильованій воді; 4) 2 н розчин натрію гідроксиду х.ч. (80 г лугу розчиняють у мірній колбі на 1 л бідистильованої води); 5) стандартний розчин магнію: 0,8458 г магнію хлориду ($MgCl_2 \cdot 6H_2O$) розчиняють бідистильованою водою у мірній колбі на 100 мл (або 8,458 г на 1 л) і доводять водою до позначки. В 1 мл розчину міститься 1 мг магнію (100 мг у 100 мл); 6) робочий стандартний розчин магнію: 1 мл основного розчину магнію хлориду переносять у мірну колбу на 50 мл і доводять водою до мітки.

Стандартний 0,01н розчин магнію можна готувати з фіксаналу, який містить 12,15% магнію. Робочий стандарт готують розведенням основного (0,01 н): 1 мл основного + 5 мл бідистильованої води; одержують розчин з умістом 2,02 мг магнію у 100 мл.

Хід визначення. У центрифужну пробірку вносять 1 мл сироватки (плазми) крові та 1 мл розчину ТХО кислоти, старанно перемішують і через 10 хв центрифугують 15 хв за 5000 об/хв, або 20 хв за 3000 об/хв. Надосадова рідина має бути прозорою.

Відбирають 0,5 мл центрифугату, додають 1 мл 0,01% розчину титанового жовтого, 1 мл 0,02% розчину полівінілового спирту і 2 мл 2 н розчину натрію гідроксиду.

Таким же чином готують стандартну пробу. В пробірку вносять 1 мл стандартного робочого розчину магнію (2 мг у 100 мл), 1 мл ТХО кислоти, перемішують. До 0,5 мл відібраної суміші додають 1 мл титанового жовтого, 1 мл розчину полівінілового спирту і 2 мл розчину натрію гідроксиду, змішують.

Паралельно готують контроль на реактиви. У пробірку вносять 1 мл бідистильованої води, 1 мл ТХО кислоти, 1 мл розчину титанового жовтого, 2 мл полівінілового спирту і 2 мл розчину натрію гідроксиду, перемішують.

Через 10 хв колориметрують у кюветі з товщиною оптичного шару 10 мм за довжини хвилі 520 нм (500–600 нм; зелений світлофільтр) проти контролю на реактиви.

Розрахунок проводять за формулою:

$$X = \frac{Ad}{Bct} \times 2,$$

де X – кількість магнію у мг/100 мл; Ad – екстинція дослідної проби; Bct – екстинція стандартного робочого розчину магнію; 2 – коефіцієнт для перерахунку у мг/100 мл.

Якщо за стандарт використовували магнію сульфат з умістом 2,02 мг магнію у 100 мл, то перемножують на коефіцієнт 2,02.

Під час розрахунку вмісту магнію у ммоль/л за коефіцієнт беруть відповідно 0,822 і 0,830.

П р и м і т к а. Якщо результат визначений у мг/100 мл, то одержану величину перемножують на коефіцієнт 0,411 і результат виражають у ммоль/л.

Діагностичне значення. Магній є основним катіоном внутрішньоклітинного середовища. У клітинах він бере участь у проміжному обміні як активатор ферментів циклу Кребса і нуклеїнових кислот. У мітохондріях клітин іони магнію активують процеси окиснювального фосфорилування. У м'язах магній забезпечує зв'язок актину з міозином у процесі синтезу білкового комплексу, необхідного для м'язових скорочень. Іони магнію активують АТФ-азу, забезпечуючи роботу К-Na-насоса мембран клітин.

Магній впливає на функції центральної нервової системи, активуючи холінестеразу, внаслідок чого прискорюється розпад ацетилхоліну. Збудливість нервових закінчень при цьому гальмується, і м'язи розслаблюються. За нестачі магнію активність холінестерази знижується, виділення ацетилхоліну збільшується, через що зростає нервова збудливість і м'язовий тонус, виникають клонічні й тетанічні судоми. За підвищення концентрації магнію в крові може настати гальмування функції кори головного мозку – аж до розвитку наркотичного стану.

Магній необхідний також для формування кісткової тканини, оскільки він входить до складу кристалів гідроксиапатиту, що сприяє підвищенню міцності кісток і зубів.

Вміст магнію у сироватці крові складає: у великої рогатої худоби і коней – 2–3 мг/100 мл (0,82–1,23 ммоль/л), овець – 2,0–3,5 (0,82–1,44), свиней – 2,5–3,5 мг/100 мл (1,03–1,44 ммоль/л).

Зменшення вмісту магнію в крові (*гіпомагніємія*) є характерним для пасовищної тетанії високопродуктивних корів 5–8-річного віку. Хвороба виникає в разі згодовування зеленої маси, вирощеної на ділянках, де вносили надмірну кількість калійних добрив. Калій знижує засвоєння рослинами магнію. Окрім того, у зеленій масі міститься багато азоту, особливо білкового, який у рубці гідролізується з утворенням аміаку – утворюються важкорозчинні сполуки аміаку з магнієм, що недостатньо

засвоюються в кишечнику. У хворих тварин вміст магнію зменшується до 1,5 мг/100 мл (0,62 ммоль/л), а за тяжкого перебігу хвороби – до 1,1 мг/100 мл (0,45 ммоль/л) і менше. Рідше гіпомагніємія може бути за аліментарної недостатності.

Гіпермагніємія буває абсолютною – внаслідок швидкого надходження магнію в тканини за ін'єкцій препаратів або відносною – на фоні різкого зниження вмісту в крові іонів кальцію.

Література: [39, С. 201; 60, С. 86–88; 93, С. 25–34].

10.6.4. 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% розчином лантану хлориду (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 й 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 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 гіпомагніємію ставлять з урахуванням умісту неорганічного магнію в сироватці крові (див. 10.6.3).

10.7. 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 і 5 мл, пробірки.

Реактиви: 1) реагент 1 – 0,048 г Hg (CNS)₂, хч – 1 флакон; 2) реагент 2 – 4,5% Fe(NO₃)₃•9 H₂O, 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 за інтенсивного перемішування у 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. Реагент зберігають за кімнатної температури 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 таблиці 10.4.

Таблиця 10.4

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
Перемішують і через 5 хв визначають оптичну густину проб і стандарту проти контролю			

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 пробою 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 кишечника, 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 у лактуючих тварин – з молоком.

У шлунковому соку хлор знаходиться у формі хлоридної 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 хлоридної кислоти в шлунковий сік (ахлоргідрія). Надмірна втрата хлору у разі діареї та порушень функції нирок спричинює посилене утворення бікарбонатів і розвиток алкалозу, а надмірне надходження в організм іонів хлору знижує концентрацію бікарбонатних аніонів і підвищує кислотність.

Література: за інструкцією з набору реактивів.

10.8. Визначення натрію у крові

У тілі дорослих тварин міститься в середньому 0,13–0,16% натрію в розрахунку на свіжу тканину. Увесь натрій організму розподіляється приблизно так: у кістках його міститься 25%, шкірі – 22, м'язах – 16, крові та лімфі – 20, інших тканинах і органах – 17%. Натрій є основним катіоном позаклітинної рідини. Концентрація його в плазмі крові тварин різних видів більша, ніж в еритроцитах, у жуйних і собак – навпаки. Співвідношення між натрієм і калієм у плазмі крові становить приблизно 25:1.

10.8.1. Визначення натрію в сироватці крові

Принцип методу. Натрій сироватки переводять в осад уранілацетатом магнію. Ураніл-іони, що залишилися в розчині, створюють зафарбований комплекс з тіогліколятом. Концентрація натрію пропорційна різниці між контрольною (без преципітації) і дослідною пробами.

Обладнання: фотометр.

Реактиви: 1) реагент №1 – 1 флакон, 25 мл (чутливий до світла); 2) реагент №2 – 1 флакон, 50 мл; 3) калібрувальний розчин натрію – 150 ммоль/л – 1 флакон, 1 мл.

Всі реагенти готові до роботи і стабільні упродовж 12 міс. за кімнатної температури у щільно закритих флаконах у темноті. Після відкриття реагент стабільний упродовж 1 міс. Відразу після використання флакони щільно закривають.

Використовують набір реактивів, виготовлений у Республіці Білорусь (220080, м. Мінськ, вул. Ленінградська, 14, лаб. 123).

Хід визначення. Підбирають компоненти згідно з табл. 10.5.

Пробірки закривають і енергійно перемішують реакційну суміш. Через 5 хв ще раз перемішують (упродовж 30 с) вміст пробірок і залишають на 30 хв у темряві. Потім центрифугують упродовж 10 хв (900–1200 хq).

Таблиця 10.5

Співвідношення компонентів для визначення натрію

Інгредієнт, мл	Дослідна проба	Калібрувальний розчин	Контрольна проба
Реагент № 1	1,0	1,0	1,0
Сироватка крові	0,02	–	–
Калібрувальний розчин	–	0,02	–

У всі пробірки відбирають по 0,02 мл супернатанту і додають по 2 мл реагенту № 2.

Реакційну суміш добре перемішують та інкубують 5 хв за кімнатної температури. Після цього вимірюють оптичну густину контрольної ($A_{\text{конт.}}$), калібрувальної ($A_{\text{кал.}}$) і дослідної ($A_{\text{д}}$) проб проти води.

Увага. Колір стабільний упродовж 25 хв після закінчення інкубації за умови попередження попадання сонячного світла.

Розрахунок. Кількість натрію ($C_{\text{д}}$) у ммоль/л вираховують за формулою:

$$C_{\text{д}} = C_{\text{к}} \times (A_{\text{конт.}} - A_{\text{д}}) / (A_{\text{конт.}} - A_{\text{кал.}})$$

де: $C_{\text{к}}$ – концентрація калібрувального розчину натрію, який відповідає оптичній густині $A_{\text{кал.}}$.

П р и м і т к и: 1. Лінійна ділянка визначень до 300 ммоль/л.

2. Сироватку додають до реагенту 1 і суміш негайно енергійно перемішують.

3. Реагент № 1 зберігають у темноті.

4. Застосування пральних порошоків для миття посуду категорично забороняється.

Література: за інструкцією з набору реактивів.

10.8.2. Визначення натрію методом атомно-абсорбційної спектрофотометрії

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 не виконує в організмі якоїсь специфічної функції, але він у край необхідний для нормальної життєдіяльності тканин. Натрій має основне значення для підтримання осмотичного тиску позаклітинної рідини, яка на 92% залежить від нього, і розподілу води між позаклітинною та внутрішньоклітинною рідинами. Втрата натрію завжди призводить до втрати води, а його ретенція – до затримання її. Іони натрію підтримують кислотно-основний баланс крові, величину рН вмісту рубця.

Натрій разом з кальцієм і магнієм беруть участь у реакції нервово-м'язового збудження, у взаємодії з калієм підтримує нормальну функцію міокарда [5, 12].

Натрій відіграє важливу роль у функціонуванні Na^+ , K^+ -АТФ'ази, яка забезпечує створення електричного градієнта на мембранах. Na^+ , K^+ -помпа забезпечує транспорт глюкози, амінокислот і фосфору в клітини та гідрогену, кальцію, бікарбонату, калію й хлору з клітин [7, 12].

Оптимальна кількість натрію в сироватці (плазмі) крові становить 135–150 ммоль/л. Обмін натрію в організмі контролюється альдостероном і антидіуретичним (АДГ, вазопресином) гормоном та натрійуретичним фактором передсердя. Альдостерон посилює реабсорбцію натрію і води у звивистих каналцях нирок. Виділення ж самого альдостерону регулюється рівнем іонів натрію й калію в крові та ренін-ангіотензивною системою. Натрійуретичний фактор у разі збільшення об'єму циркулюючої крові стимулює клубочкову фільтрацію, діурез і натрійурез, гальмує виділення реніну нирками і блокує синтез альдостерону, тобто він гальмує ренін-ангіотензин-ІІ-альдостеронову систему, яка затримує іони

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

Гіпонатріємія характеризується вмістом натрію у плазмі меншим 135 ммоль/л. Вона буває *відносною* за надмірного надходження води, або *абсолютною*, що спостерігається за дефіциту натрію в раціоні та збільшення його виділення у разі втрати рідини (діареї), сильного потовиділення, хронічних захворювань нирок, недостатнього утворення альдостерону та у разі водянок. 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 за збільшеної кількості натрію хлориду в раціоні та значної втрати води через легені, травний канал, внаслідок поліурії центрального (дефіцит вазопресину) і ниркового (порушення фільтраційної функції нирок) походження та 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.

Література: [7, С. 19–40; 12, С. 142–144].

10.9. Визначення калію в крові

Калій є третім з найбільш поширених мінеральних елементів у тілі тварин: його вміст становить 0,18–0,27% у розрахунку на свіжу тканину. Він має постійно надходити з кормами, оскільки запаси його в тілі тварин незначні, а потреба їх у калії вища, ніж в інших мінеральних катіонах.

10.9.1. Визначення калію в сироватці (плазмі) крові

Принцип методу. У процесі взаємодії іонів калію з іонами тетрафенілборату у лужному середовищі утворюється стабільна суспензія, оптична густина якої за довжини хвилі 578 нм пропорційна концентрації іонів калію у досліджуваному зразку.

Обладнання: фотометр, який забезпечує вимірювання оптичної густини за 578 нм (590) у кюветах з шириною оптичного шляху 10 мм; пробірки ємністю 10 мл; піпетки – 2 і 0,05 мл.

Реактиви: 1) осаджувальний реагент – 1 флакон (50 мл): тетрафенілборат натрію – 35 ммоль/л і натрію гідроксид – 200 ммоль/л; 2) калібрувальний розчин калію з концентрацією $5,0 \pm 0,25$ ммоль/л (1мл). Розчин стійкий.

Приготування робочих розчинів. Обидва реактиви готові до роботи. Після використання осаджувального реагенту **негайно** (!) закрити флакон. Розчин стійкий упродовж місяця після відкриття флакона за температури $18-25^\circ\text{C}$ у темноті.

Для аналізу використовують набір реактивів ТОВ НПП “Філісім-Діагностика” (м. Дніпропетровськ).

Хід аналізу показано у таблиці 10.6.

Увага! Сироватку (плазму) крові вводять повільно в осаджувальний реагент без перемішування.

Через 2 хв інкубації за температури $18-25^\circ\text{C}$ реакційну суміш та контрольну пробу інтенсивно перемішують і продовжують інкубацію протягом 10 хв за тієї ж температури.

Таблиця 10.6

Визначення калію у сироватці (плазмі) крові

Інгредієнт, мл	Дослідна проба	Калібрувальна проба	Контрольна проба
Осаджувальний реагент	1,0	1,0	1,0
Сироватка (плазма)	0,025	–	–
Калібрувальний розчин калію	–	0,025	–
Дистильована вода	–	–	0,025

Перед фотометрією проби слід енергійно перемішати.

Вимірюють оптичну густину дослідної і калібрувальної проб проти контрольної.

Розрахунок проводять за формулою:

$$C = E_d / E_{\text{кал}} \times 5,0 \text{ ммоль/л,}$$

де: C – концентрація калію в сироватці крові, ммоль/л; E_d – оптична густина дослідної проби, од. оптичної густини; $E_{\text{кал}}$ – оптична густина калібрувальної проби, од. оптичної густини; 5 – концентрація калію в калібрувальному розчині, ммоль/л.

Література: [94, С. 225–226].

10.9.2. 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 KCl).

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 (у режимі абсорбції); *нижня межа визначення* – 0,01 мкг/л; *діапазон оптимальних концентрацій* – 0,1–2,0 мкг/л.

Діагностичне значення. Головна функція калію в організмі – підтримання збудливості клітин, передусім м'язових. Разом з іонами натрію він бере участь у створенні потенціалу “спокою” і виникненні “потенціалу дії” у м'язах. За участі калію, що міститься в еритроцитах, здійснюється перенесення кисню (кисню) і вуглекислого газу (карбону оксиду) гемоглобіном.

Калій бере участь у підтриманні кислотно-основного балансу, регуляції внутрішньоклітинного осмотичного тиску, утворенні та розпаді фосфорних сполук, багатих на енергію, у підтриманні величини рН вмісту рубця. Він є активатором чи кофактором багатьох ферментних реакцій, бере участь у поглинанні клітинами амінокислот, синтезі білків та обміні вуглеводів.

Калій є основним катіоном внутрішньоклітинного середовища: концентрація його становить 150–155 ммоль/л. Оптимальна кількість калію у сироватці крові – 4,0–5,5 ммоль/л. Регулює обмін калію в організмі альдостерон, який стимулює його виведення з сечею. За зниження секреції альдостерону екскреція калію дистальними відділами звивистих каналців нирок зменшується, а концентрація в сироватці крові, міжклітинній рідині і клітинах підвищується.

Гіперкаліємія може розвиватися у разі надмірного надходження калію в організм із заміниками молока або із зеленою масою пасовищ, куди вносили велику кількість калійних добрив (пасовищна тетанія); за надмірного вмісту солей калію у складі регідраційних 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 (під час травм, опіків). Особливо небезпечним є поєднання надмірного екзогенного надходження калію з патологією нирок та ендогенними факторами. Гіперкаліємія розвивається також унаслідок порушення регуляції обміну калію через зменшення виділення альдостерону корою надниркових залоз (амілоїдоз, ураження за інфекційних хвороб, зокрема туберкульозу, аутоімунного руйнування).

Надлишок калію в організмі порушує скорочення та знижує функціональні резерви кардіоміоцитів. Токсична дія калію на серце проявляється у разі збільшення його концентрації в плазмі понад 6,0–6,5 ммоль/л. За вищих значень спостерігаються брадикардія та характерні зміни ЕКГ: зубець Т стає високим і гострим, зубець Р зникає, тривалість інтервалу Р–Q зростає. За концентрації калію в плазмі понад 8 ммоль/л комплекс QRS деформується та 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 за одночасного зменшення концентрації іонів натрію в плазмі. Коли вона зменшується до 120 ммоль/л (у нормі – 135–150), тоді типові для гіперкаліємії зміни ЕКГ спостерігаються вже за концентрації іонів калію 5,5–5,8 ммоль/л.

Гіпокаліємія через дефіцит калію в раціонах сільськогосподарських тварин, особливо жуйних, у звичайних умовах малоїмовірна. За добової потреби 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 внаслідок втрати калію через травний канал (діарея в новонароджених, блювання) та із сечею за хронічного пієлонефриту і первинного гіперальдостеронізму (аденома кори надниркових залоз), застосування сечогінних (фуросеміду) і кортикостероїдних препаратів або їхніх синтетичних аналогів під час лікування запальних процесів.

Гіпокаліємія спричинює порушення функцій нервової системи, м'язів серця, системи кровообігу і нирок. Клінічний прояв цих порушень настає в результаті зниження концентрації калію в плазмі до 2,5 ммоль/л і менше. Тварини при цьому стають сонливими і малорухливими; глибокі рефлексії в них послаблені, тонус м'язів знижений; може виникати парестезія. За ускладнень 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, за ускладнень розвиваються тахіаритмія та мерехтіння передсердя).

Література: [7, С. 19–40; 12, С. 139–141].

10.10. Визначення феруму (заліза) в сироватці крові

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%).

10.10.1. Визначення феруму в сироватці крові (за реакцією з бета-фенантроліном)

Принцип методу. Бета-фенантролін утворює з іонами двовалентного феруму комплекс червоного кольору, інтенсивність якого визначають фотометрично за довжини хвилі 510–550 нм.

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

Реактиви: 1) стандартний розчин амонію феруму (II) сірчаноокислого 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 міс. 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 за 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) відносно контрольного розчину за довжини хвилі 510–550 нм на спектрофотометрі або КФК-3 в кюветі з товщиною оптичного шару 10 мм.

Вміст феруму 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.

П р и м і т к и. 1. У ході визначення заліза необхідно використовувати лабораторний посуд, призначений виключно для цієї мети, оброблений розбавленою хлоридною кислотою.

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

3. Використовується лише бідистильована вода.

Література. [21, С. 402–404; 60, С. 216–217].

10.10.2. Визначення феруму в сироватці крові (за реакцією з ферозином)

Принцип методу. Ферум звільняється із ферумзв'язувальних пептидів сироватки крові та відновлюється завдяки дії гуанідину і гідроксиламіну. Натрієва сіль 3-(2-піридол) – 5,6-біс (4-сульфофеніл)–1,2,4-триазину (ферозину) дає з іонами Fe^{+2} комплекс фіолетового кольору. Оптична щільність дослідного розчину пропорційна концентрації феруму в пробі, визначають її фотометрично за довжини хвилі 530–590 нм та довжини оптичного шляху 10 або 5 мм.

Обладнання: 1) фотоелектроколориметр (КФК–2, КФК–3) або спектрофотометр; 2) пробірки місткістю 10 мл (ГОСТ 1770-74); 3) піпетки місткістю 0,1; 1 та 5 мл (ГОСТ 29227-9); 4) центрифуга для пробірок (швидкість від 2000 до 5000 об/хв).

Реактиви: 1) буферний розчин – тіосечовина – 11,9 ммоль/л; гуанідину гідрохлорид – 3,75 ммоль/л; гідроксиламіну гідрохлорид > 60 ммоль/л; гліцин, HCl – 0,2 моль/л; 2) колірореагент (ферозин – 1,1 ммоль/л); 3) калібрувальний розчин феруму (20 мкмоль/л або 112 мкг%); 4) деіонізована вода.

Використовують набір ТОВ НВП «Філісім-Діагностика», м. Дніпропетровськ.

Розчини готові та придатні до використання після відкупорювання флаконів протягом місяця за умови зберігання від плюс 2 до 8° С.

Хід визначення. Аналіз проводять згідно зі схемою, наведеною в таблиці 10.7.

Таблиця 10.7

Схема визначення вмісту феруму

Об'єм, мл	Дослідна проба			Калібрувальна проба			Контрольна проба		
	мікро-аналіз	напів-мікро-аналіз	макро-аналіз	мікро-аналіз	напів-мікро-аналіз	макро-аналіз	мікро-аналіз	напів-мікро-аналіз	макро-аналіз
Буферний розчин	1,0	2,0	4,0	1,0	2,0	4,0	1,0	2,0	4,0
Сироватка (плазма)	0,2	0,5	1,0	–	–	–	–	–	–
Калібрувальний розчин	–	–	–	0,2	0,5	1,0	–	–	–
Деіонізована вода	–	–	–	–	–	–	0,2	0,5	1,0
Вимірювання екстинції	Е досл.			Е кал.					
Витримують 5–10 хв за кімнатної температури, вимірюють щільність дослідної (Е досл.) і калібрувальної (Е кал.) проб відносно контрольної за довжини хвилі 530–590 нм (562 нм)									
Колірний реагент	0,02	0,04	0,08	0,02	0,04	0,08	0,02	0,04	0,08
Вимірювання екстинції	Е досл.′			Е кал.′					
Перемішують, витримують 15–20 хв, вимірюють оптичну щільність дослідної (Е досл.) і калібрувальної (Е кал.) проб відносно контрольної з колірореагентом									

Розрахунок результатів:

$$C_{\text{феруму}} = C_{\text{калібратора}} \times (E_{\text{досл.}'} - E_{\text{досл.}}) / (E_{\text{кал.}'} - E_{\text{кал.}}),$$

де: $C_{\text{феруму}}$ – концентрація заліза в пробі (мкмоль/л чи мкг/100 мл); $C_{\text{калібратора}}$ – концентрація феруму в калібрувальному розчині (20 мкмоль/л чи 112 мкг/100 мл); $E_{\text{досл.}}$, $E_{\text{досл.}'}$, $E_{\text{кал.}}$, $E_{\text{кал.}'}$ – оптичні густини розчинів.

Діагностичне значення. Сполуки, що містять ферум, виконують в організмі 4 основні функції: а) транспорт електронів (цитохроми і залізосіркопротеїни; б) транспорт і депонування кисню (гемоглобін, міоглобін); в) участь в утворенні активних центрів окиснювально-відновних ферментів (каталаза, пероксидаза, супероксиддисмутаза); г) транспорт і депонування феруму (трансферин, гемосидерин, феритин, сидерохроми).

Вміст феруму у сироватці крові наступний (мкг/100 мл): у великої і дрібної рогатої худоби – 100–150; свиней – 100–180; собак – 100–120; у мкмоль/л, відповідно: 18,0–26,7; 18,0–32,2; 18,0–21,5. У коней різних порід вміст феруму дещо відрізняється: в української верхової він

становить 30,0–44,5 мкмоль/л, російської рисистої і російських ваговозів майже однаковий – 32,0–58,0 мкмоль/л [72].

Зниження вмісту заліза в сироватці крові (гіпосидероз) є показником розвитку залізодефіцитної анемії, яку часто діагностують у молодняку. Причинами її можуть бути недостатнє надходження феруму з кормом, порушення всмоктування з кишечника (гастрит, ентерит), хронічні кровотечі (виразкова хвороба шлунка чи кишечника), уповільнення мобілізації і транспорту феруму з депо.

Підвищується вміст феруму в сироватці крові за гіперсидерозів (коли транспортований у кістковий мозок ферум не використовується для еритроцитопоезу), гемолітичних анемій, гепатиту, цирозу печінки (порушується її функція депонувати залізо), гіповітамінозу В₆, отруєнь залізом і свинцем.

Література: [21, С. 402–404; 12, С. 152–156; 60, С. 216–218; 72].

10.10.3. Визначення феруму 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 у термостаті за 38° С на 1 год. Після цього додають 1 мл 20% розчину ССІ₃СООН, розмішують, витримують 1 год за кімнатної температури 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 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 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. Абсорбція феруму залежить від віку, забезпеченості ним організму, стану шлунка і кишечника, хімічної форми, в якій надходить залізо, та компонентів корму. У тварин з однокамерним

шлунком комплексні сполуки феруму під впливом хлоридної кислоти й пепсину розщеплюються і тривалентний ферум, відновлюючись, переходить у двовалентний. Всмоктування феруму відбувається, головним чином, у дванадцятипалій і порожній кишках. У деяких сполуках добре всмоктується також тривалентний ферум. Для оптимального всмоктування феруму необхідна нормальна секреція шлункового соку. Сприяють його засвоєнню білок тваринного походження (очевидно, внаслідок утворення комплексів з амінокислотами), аскорбінова кислота, токоферол, прості вуглеводи (лактоза, фруктоза), сорбіт, амінокислоти (цистеїн, лізин, гістидин). Пригнічують всмоктування феруму білки сої і фосфати.

Впливають на засвоєння феруму різні захворювання. *Стимулюється* засвоєння у разі його нестачі, різних анемій, В₆-гіповітамінозу, що пояснюється посиленням еритроцитопоезу. *Зменшується* засвоєння за гіпоацидних і анацидних гастритів, діарей різної етіології внаслідок швидкого транзиту хімусу.

У дорослих тварин із кормів засвоюється 5–10% феруму, а за інтенсивного еритроцитопоезу – 15–20%. У телят засвоюється 15–25% феруму молока.

Майже 70% феруму 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 ферум виділяється, в основному, під час злущування епітелію слизової оболонки кишечника і з жовчю. Усього за добу в людини виділяється 0,6–1 мг феруму і така ж кількість засвоюється.

Дефіцит феруму (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 менш виражені порівняно з поросятами. Захворювання реєструють у 30–40% телят. Основною причиною анемії поросят є нестача феруму, тому її називають ферумодефіцитною, оскільки запаси його в органах і тканинах невеликі (близько 50 мг), а з молозивом чи молоком матері вони одержують 1 мг за добової потреби 7–10 мг. До тритижневого віку поросятам потрібно від 114 до 200 мг феруму, з молоком вони одержують 23–24 мг.

Запаси феруму в телят, нагромаджені у внутрішньоутробний період, швидко витрачаються після народження, оскільки добова потреба телят становить 50–100 мг, а в перші чотири тижні життя вона задовольняється лише на 10%. Тому вміст феруму 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. Окрім кількісних змін, виявлені

якісні зміни еритроцитів: у кров'яне русло надходять "молоді", функціонально незрілі еритроцити, збільшується кількість "зрілих" та зменшується – "старих" еритроцитів. Мембрани еритроцитів хворих на анемію телят містять менше холестеролу і більше фосфоліпідів, зростає вміст 2,3-ДФГ [56; 67].

Література: [12, С. 152–156; 56; 67].

10.10.4. Визначення загальної ферумозв'язувальної здатності сироватки крові (ЗФЗЗ)

Принцип методу. Трансферин у непатологічних сироватках крові зв'язує іони феруму до 1/3 свого об'єму. Для насичення трансферину сироватку крові обробляють надлишковою кількістю іонів Fe⁺³. Від незв'язаних іонів феруму розчин звільняють за допомогою карбонату магнію. Визначаючи концентрацію заліза в насиченій сироватці, знаходять її загальну ферумозв'язувальну здатність (ЗФЗЗ) за довжини хвилі 530–590 нм та ширини оптичного шляху кювети 10 або 5 мм.

Обладнання: 1) фотоелектроколориметр (КФК–2, КФК–3) або спектрофотометр; 2) пробірки місткістю 10 мл (ГОСТ 1770–74); 3) піпетки місткістю 0,1; 1 та 5 мл (ГОСТ 29227–9); 4) центрифуга для пробірок (швидкість від 2000 до 5000 об/хв).

Реактиви: 1) насичувальний розчин феруму (90±10) мкмоль/л; 2) сорбент (лужний карбонат магнію); 3) буферний розчин – тіосечовина – 11,9 ммоль/л; гуанідину гідрохлорид – 3,75 ммоль/л; гідроксиламіну гідрохлорид – 60 ммоль/л; гліцин, HCl – 0,2 моль/л; 4) кольорореагент (ферозин – 1,1 ммоль/л); 5) калібрувальний розчин заліза (20 мкмоль/л або 112 мкг/100 мл); 6) деіонізована вода.

Розчини готові та придатні до використання після відкупорювання флаконів протягом місяця за умови зберігання від плюс 2 до 8° С.

Використовують набір реактивів ТОВ НВП «Філісім-Діагностика», м. Дніпропетровськ.

Хід визначення

Об'єм, мл	Напівмікроаналіз	Макроаналіз
Насичувальний розчин феруму	1,0	2,0
Сироватка (плазма)	0,5	1,0
Вміст пробірок перемішують та витримують їх 5–6 хв за кімнатної температури (від плюс 20 до плюс 25° С)		
Сорбент	0,1–0,2 г (близько 0,5 мл)	0,2–0,4 г (близько 1,0 мл)
На шпателі або скальпелі внести у пробірку сорбент у приблизній кількості згідно з таблицею. Тримують 5–10 хв за кімнатної температури від плюс 20 до плюс 25° С, збовтуючи кожних 2–3 хв. Центрифугують 9–10 хв за 2000–5000 об/хв. Надосадова рідина – супернатант		

Визначення феруму в супернатанті проводять за такою схемою:

Об'єм, мл	Дослідна проба			Калібрувальна проба			Контрольна проба		
	мікро-аналіз	напів-мікро-аналіз	макро-аналіз	мікро-аналіз	напів-мікро-аналіз	макро-аналіз	мікро-аналіз	напів-мікро-аналіз	макро-аналіз
Буферний розчин	1,0	2,0	4,0	1,0	2,0	4,0	1,0	2,0	4,0
Супернатант	0,2	0,5	1,0	–	–	–	–	–	–
Калібрувальний розчин	–	–	–	0,2	0,5	1,0	–	–	–
Деіонізована вода	–	–	–	–	–	–	0,2	0,5	1,0
Вимірювання екстинції	Е досл.			Е кал.					
Витримують 5–10 хв за кімнатної температури, вимірюють щільність дослідної (Е досл.) і калібрувальної (Е кал.) проб проти контрольної									
Колірний реагент	0,02	0,04	0,08	0,02	0,04	0,08	0,02	0,04	0,08
Вимірювання екстинції	Е досл.′			Е кал.′					
Перемішують, витримують 15–20 хв, вимірюють оптичну щільність дослідної (Е досл.′) і калібрувальної (Е кал.′) проб проти контрольної з кольорореагентом									

Розрахунок результатів:

$$C_{\text{супернатанта}} = C_{\text{калібратора}} \times (E_{\text{досл.}'} - E_{\text{досл.}}) / (E_{\text{кал.}'} - E_{\text{кал.}}) \times 3,$$

де: $C_{\text{супернатанта}}$ – концентрація феруму в супернатанті (мкмоль/л чи мкг/100 мл) – загальна ферумозв'язувальна здатність сироватки крові (3333); $C_{\text{калібратора}}$ – концентрація феруму в калібрувальному розчині (20 мкмоль/л чи 112 мкг/100 мл); $E_{\text{досл.}}$, $E_{\text{досл.}'}$, $E_{\text{кал.}}$, $E_{\text{кал.}'}$ – оптичні щільності розчинів; 3 – коефіцієнт розведення.

Ненасичена ферумозв'язувальна здатність сироватки крові (НФ33) розраховується за наступним рівнянням:

$$\text{НФ33} = 3\Phi33 - \text{концентрація феруму в сироватці (мкмоль/л)}.$$

Коефіцієнт насичення трансферину ферумом:

$$K (\text{у процентах}) = (\text{концентрація феруму в сироватці} \cdot 100 : 3333).$$

Вміст трансферину:

$$Tr = 3\Phi33 / 125 \cdot 5,585 (\text{г/л}),$$

де 125 і 5,585 – коефіцієнти перерахунку.

- П р и м і т к и:
1. Не визначати ферум та 3Φ33 у ліпемічних і гемолізованих сироватках, оскільки результати будуть завищеними.
 2. Концентрація стабільна протягом 4 діб за кімнатної температури (18–25°С).
 3. Кювети та лабораторний посуд повинні бути цілком чистими та призначеними тільки для аналізу феруму.
 4. Мити використаний посуд слід у 20% розчині соляної кислоти (хч чи чда) або хромовою кислотою сумішшю.

5. Вимитий посуд ретельно полощуть деіонізованою чи бідистильованою водою і висушують.

Діагностичне значення. Вміст феруму, ЗФЗЗ та НФЗЗ сироватки крові і вміст трансферину (транспортного білка феруму) – показники, які об'єктивно характеризують стан еритроцитопоезу. За гіпопластичної і постгеморагічної анемії вміст феруму в сироватці крові зменшується, а транспортного білка – трансферину зростає, тому коефіцієнт насичення трансферину ферумом зменшується. Таким чином, кількість феруму, який може зв'язатися із трансферином, тобто загальна ферумозв'язувальна здатність сироватки (ЗФЗЗ), зростає. Оскільки загальна ферумозв'язувальна здатність сироватки крові збільшується, а вміст феруму в ній зменшується, то збільшується її латентна ферумозв'язувальна здатність.

У клінічно здорових коней української верхової породи ЗЗЗЗ сироватки крові знаходиться в межах 60–73, російської рисистої і російських вагозовів за вигульного утримання – 94–158 мкмоль/л; ЛЗЗЗ або ненасичена, відповідно, – 29,0–40 і 57–104 мкмоль/л; вміст трансферину – 2,7–3,3 і 4,0–7,0 г/л, а коефіцієнт насичення трансферину ферумом – 0,43–0,606 і 0,25–0,45 відповідно [72]. У поросят показники обміну заліза значно залежать від віку. Найбільше феруму міститься в сироватці крові поросят тритижневого віку – $41,4 \pm 2,18$ мкмоль/л, ЗФЗЗ сироватки у цій віковій групі – $48,7 \pm 1,83$ мкмоль/л, ЛФЗЗ – $7,3 \pm 0,42$ мкмоль/л, вміст трансферину становить $5,97 \pm 0,39$ г/л, а коефіцієнт насичення його залізом – $0,85 \pm 0,09$ [68].

Загальна ферумозв'язувальна здатність сироватки крові (ЗФЗЗ) вказує на кількість феруму, який може зв'язатися з трансферином. Цей показник збільшується в останні місяці вагітності, за дефіциту феруму в кормі та порушення його всмоктування, за гіпохромних анемії, хронічних кровотеч, гострого гепатиту.

Знижені величини ЗФЗЗ спостерігаються за гемохроматозу, гемолітичної анемії, хронічних інфекційних захворювань, отруєнь ферумом, хронічних хвороб печінки та нирок, злоякісних пухлин.

Література: інструкція з набору реактивів; 68; 72.

10.11. Визначення купруму (міді)

Мідь (купрум) всмоктується у верхній ділянці тонкого кишечника. Засвоюваність її дорослими тваринами з однокамерним шлунком становить 5–10%, молодняком – 15–30, жуйними – 30–40%. Утруднюється всмоктування міді під час вживання кормів, багатих на молібден і сульфати (нормальне співвідношення міді та молібдену в кормах – 10:1 за

0,1–0,2% сульфатів у сухій речовині корму). За надлиш-ку молібдену і сульфатів утворюються важкорозчинні сполуки купруму, 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 (CuS_2). Надлишок у раціоні сірки, кальцію і кадмію також спричинює утворення важкорозчинних комплексних сполук із міддю.

Купрум, що всмоктався, депонується головним чином у печінці, кістковому мозку, селезінці, підшлунковій залозі, а в молодняку – також в епіфізах кісток. Печінка є основним депо купруму, і тому її вміст у ній є важливим показником забезпеченості організму цим мікроелементом. У тілі новонароджених телят міститься 13–14 мг купруму, 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. Цитохром-оксидазна активність у тварин із недостатнім вмістом купруму в організмі у 8 разів нижча за норму.

Купрум є також необхідним елементом для кровотворення: він посилює мобілізацію депонованого феруму в кістковий мозок, забезпечує перехід мінеральних форм феруму в органічні, чим каталізує включення його у структуру гема і сприяє дозріванню еритроцитів на ранніх стадіях розвитку. За нестачі купруму ферум недостатньо використовується для синтезу гемоглобіну, і тому порушується гемопоез, розвивається гіпохромна анемія.

Література: [12, С. 150–152].

10.11.1. Визначення куапруму (міді) в сироватці крові за реакцією з бетакупріоном

Принцип методу. Бетакупріон утворює з іонами одновалентної купруму стійкий комплекс оранжевого (жовтогарячого) забарвлення.

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 купруму 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 купруму в 1 л. За кімнатної температури розчин стабільний декілька тижнів.

2. *Розчин для осадження білків.* Наважку реагенту 3 розчиняють у всьому об’ємі реагенту 4. За температури нижче + 10° С в темному місці розчин стійкий мінімально 3 міс.

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 за 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) відносно контрольного розчину на спектрофотометрі або фотоелектроколориметрі КФК-3 за довжини хвилі 460–500 нм у кюветі з товщиною робочого шару 10 мм.

Уміст купруму в сироватці крові визначається за формулою:

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

де A_1 – оптична густина дослідного зразка; A_2 – оптична густина стандарту.

Література: інструкція з набору реактивів.

10.11.2. Визначення купруму (міді) за реакцією з батокупреїном

Принцип методу. Батокупреїн утворює з іонами одновалентного купруму стійкий комплекс оранжевого (жовто-гарячого) кольору.

Обладнання: фотоколориметр (спектрофотометр), центрифуга.

Реактиви: 1) стандартний розчин міді сульфату (3 ммоль/л); 2) батокупреїн; 3) відновлювальний реактив (гідроксиаміну сульфат); 4) реактив для зсідання білка: трихлороцтова кислота (0,6 моль/л) і хлоридна кислота (2 моль/л).

Використовують набір реактивів PLIVA-Lachema Diagnostica s.r.o., Брно.

Приготування робочих розчинів

Розчин 1. У мірну колбу на 100 мл відмірюють 1,0 мл реактиву 1 і розбавляють дистильованою водою до позначки. Розчин містить 30 мкмоль/л двовалентного купруму. Стійкий кілька тижнів за 15–25°С.

Розчин 2. Всю наважку реактиву 3 розчиняють у всьому об'ємі реактиву 4. Стійкий 3 міс. за температури від +2 до +8°С.

Відміряти, мл	Проба	Стандарт	Контрольний розчин
Розчин 2	1,0	1,0	1,0
Сироватка	1,0	–	–
Розчин 1	–	1,0	–
Дистильована вода	–	–	1,0
Старанно перемішують і через 30 хв пробу центрифугують 10хв за 3000 об/хв			
Надосадова рідина	1,0	1,0	1,0
Реактив 2	1,0	1,0	1,0
Перемішують та в інтервалі 5–90 хв вимірюють оптичну густину проби (A_1) і стандарту (A_2) проти контрольного розчину			

Розрахунок:

$$\text{Купрум (мкмоль/л)} = 30 \times A_1 / A_2.$$

П р и м і т к и: 1. Визначення міді необхідно проводити в абсолютно чистому посуді, який призначений лише для цієї мети. Після звичайного миття посуд рекомендують помістити на ніч приблизно у 2% розчин комплексону 3 у розбавленому аміаку водному (1+1), потім старанно сполоснути бідистильованою водою і висушити.

2. Реактив необхідно зберігати за температури від +2 до 8°С у темряві.

3. Після використання флакон з реактивом негайно закривають.

Література: інструкція з набору реактивів.

10.11.3. Визначення купруму (міді) в сироватці крові (за методом Шмідта)

Принцип методу. Купрум утворює комплексну сполуку з діетилдитіокарбаматом жовтого кольору.

Обладнання: фотометр, центрифуга.

Реактиви: 1) 20% розчин трихлороцтової (ТХО) кислоти; 2) 4% розчин пірофосфату натрію ($\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$); 3) 25% концентрований розчин NH_4OH ; 4) 1% розчин діетилдитіокарбамату натрію. Реактив старанно перемішують, оскільки він погано розчиняється у воді, з наступним фільтруванням. Стабільний не довше одного місяця за умови зберігання у холодильнику в посуді з темного скла; 5) калібрувальний розчин купруму:

а) основний розчин: 0,3928 г міді сульфату ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) розчиняють у бідистильованій воді у мірній колбі на 1 л. В 1 мл міститься 100 мкг міді;
 б) робочий стандартний розчин міді: 1 мл основного розчину в мірній колбі на 100 мл доводять бідистильованою водою до мітки. В 1 мл міститься 1 мкг купруму (15,74 мкмоль/л).

Хід визначення

Інгредієнти, мл	Дослідна проба, мл	Стандартна проба, мл	Контрольна проба, мл
Сироватка крові	2,0	–	–
Робочий стандартний розчин міді	–	1,0	–
Бідистильована вода	5,0	2,5	3,5
Розчин ТХО кислоти	3,0	1,5	1,5
Вміст пробірки з дослідною пробю перемішують скляною паличкою і через 10 хв центрифугують 30 хв за 4 тис. об/хв			
Центрифугат	5,0	–	–
Розчин пірофосфату натрію	1,0	1,0	1,0
Концентрований розчин аміаку	0,5	0,5	0,5
Розчин діетилдитіокарбамату натрію	1,0	1,0	1,0

Вміст пробірок перемішують упродовж 15–20 с, колориметрують за довжини хвилі 450–480 нм у кюветі шириною оптичного шару 10 мм проти контрольної пробі.

Результат розраховують за формулою:

$$C_{\text{міді}} = E_{\text{д}} / E_{\text{ст}} \times 15,74 \text{ (мкмоль/л)},$$

де: C – вміст міді у мкмоль/л; $E_{\text{д}}$ – екстинція дослідної пробі; $E_{\text{ст}}$ – екстинція стандартної пробі; 15,74 – концентрація стандартного розчину.

Література: [21, С. 393–395; 22, С. 403–404; 32, С. 323–325].

10.11.4. Визначення купруму (міді) методом атомно-абсорбційної спектроскопії

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

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

Методика вимірювання. Атомно-абсорбційний спектроскоп (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 (мкг/100 мл): у великої рогатої худоби – 80–120; свиней – 100–120. Перевідний коефіцієнт у мкмоль/л – 0,1574.

Недостатність купруму характеризується розвитком гіпохромної анемії, депігментацією волосяного 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 (SH) у дисульфідні внаслідок нестачі міді і ферменту сульфідоксидази. Слід зазначити, що конкретний механізм участі міді в процесах кератинізації залишається ще не з'ясованим. Окрім того, за 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 купруму – 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 у зрілий колаген. Тому недостатність міді призводить до розвитку дифузного остеопорозу. 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 легневих судин. Дефіцит міді в раціоні кітних овець спричинює внутрішньоутробне порушення розвитку ягнят, оскільки внаслідок демієлінізації півкулі мозку перетворюються в тонкостінні міхурі, 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 забруднення навколишнього середовища міддю поблизу промислових підприємств. Найбільш чутливі до інтоксикації вівці, для яких токсичною дозою купруму сульфату є 20 мг/кг маси. Тривале надходження невисоких

токсичних доз купруму через травний канал спричинює розвиток гепатодистрофії, а пізніше – атрофічного цирозу печінки з порушенням усіх її функцій, метгемоглобінемії та гемолізу еритроцитів з появою гемоглобінурії.

10.11.5. Визначення активності церулоплазміну в сироватці крові (метод Ревіна у модифікації Бестужева С.В. і Колб В.Г.)

Принцип методу. Метод ґрунтується на окисненні п-фенілен-діаміну за участі церулоплазміну. Реакцію зупиняють додаванням натрію фториду.

Реактиви: 1) 0,5% водний розчин солянокислого п-фенілендіаміну; зберігають у холодильнику у посуді з темного скла; 2) 0,4 моль/л ацетатного буфера, рН= 5,5. Одержують з двох розчинів (“а” і “б”): а) ацетатного буфера, рН 5,5: 54,44 г ацетату натрію розчиняють в 1 л дистильованої води; б) 22,6 мл льодяної оцтової кислоти доводять дистильованою водою до 1 л. Обидва розчини змішують у співвідношенні 9:1. Зберігають у холодильнику; 3) 3% розчин натрію фториду, розчиняють у дистильованій воді, осад відфільтровують. Готують невелику кількість.

Хід визначення

Інгредієнти, мл	Дослідна проба	Контрольна проба
Сироватка крові	0,1	0,1
Розчин натрію фториду	–	2,0
Ацетатний буфер	8,0	8,0
Розчин п-фенілендіаміну	1,0	1,0
Струшують, ставлять на 1 год у водяну баню за 37 °С		
Розчин натрію фториду	2,0	–

Вміст пробірок перемішують і ставлять у холодильник на 30 хв за температури +4°С. Колориметрують за довжини хвилі 530–540 нм у кюветі з шириною оптичного шару 10 мм проти контрольної проби (блідо-рожевий колір).

Розрахунок результатів:

$$C_{\text{церулопл.}}, \text{ мг/л} = E_{\text{досл}} \times 875,$$

де 875 – коефіцієнт перерахунку.

Діагностичне значення. Церулоплазмін – білок, який синтезується в печінці, за хімічною природою належить до α_2 -глікопротеїнів, кожна молекула якого містить 8 атомів купруму, тобто є депо міді. До 95% міді, що знаходиться в крові, зв’язана з церулоплазміном, решта 5% – з альбуміном і гістидином. Зниження вмісту церулоплазміну спричиняє відкладання купруму в гепатоцитах, клітинах нирок і мозку, що зумовлює

розвиток цирозу печінки і пошкодження гангліїв. Церулоплазмін має ферментативні властивості: він каталізує окиснення Fe^{2+} до Fe^{3+} , що забезпечує зв'язування феруму з трансферином, який транспортує ферум до кісткового мозку. Церулоплазмін є одним з найважливіших антиоксидантів плазми крові: попереджує окиснення поліненасичених жирних кислот та руйнує супероксидрадикали кисню. Він є пізнім білком гострої фази запалення. Рівень церулоплазміну зростає під час запальних та некротичних процесів, за лейкозу, лімфогранулематозу, а знижується за важких уражень печінки (цироз), нефротичного синдрому та ентеропатій.

Література: [21, С. 395–397; 22, С. 405–406].

10.12. 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 та нуклеїнових кислот. Цинковмісні ферменти належать до всіх шести класів, але найбільше їх серед гідролаз.

Еритроцити містять карбонатдегідрогеназу, яка каталізує реакцію утворення і розпаду H_2CO_3 . За 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 і трипсину, тому його нестача спричинює розлади азотного обміну, зменшує всмоктування продуктів гідролізу протеїну.

Цинк стимулює активність лужної фосфатази, за його дефіциту активність ферменту у хондроцитах епіфізарного хряща знижується, що стає причиною порушення остеогенезу.

Цинку належить важлива роль у синтезі білка та 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, у тонкому кишечнику: у великої рогатої худоби – частково (близько третини) в сичузі, у курей – у залозистому 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.

10.12.1. Визначення цинку спектрофотометричним методом

Принцип методу. Цинк реагує з 2-(5-бром-2-піридулазо)-5-(N-піропіл-N-сульфопропіламіно-)фенолом (5Br-PAPS) у лужному середовищі з утворенням кольорового комплексу. Інтенсивність забарвлення, вимірюваного за довжини хвилі 560 нм (± 10), прямо пропорційна концентрації цинку.

Обладнання: спектрофотометр або фотометр з фільтром 560 (± 10) нм; термостат, дозатори 50 мкл (0,05 мл) і 1 мл, секундомір.

Реактиви: 1) Реагент рН 9,8 – 50 мл: а) (5Br-PAPS) – 0,02 ммоль/л; б) диметилгліоксим (170 ммоль/л); в) бікарбонатний буфер (200 ммоль/л); г) детергент – 1%; 2) стандарт цинку – 200 мг/100 мл (30,6 мкмоль/л). Реагенти стабільні за зберігання за 18–22° С, готові до роботи.

Виробник – DAK-SPECTRO MED S.R.L., м. Кишинів.

Хід визначення. У дослідні, стандартну та контрольні проби вносять по 1 мл реагенту. У стандартну пробу додають 0,05 мл стандарту цинку, у дослідну – 0,05 мл сироватки крові.

Перемішують та інкубують 5 хв за температури 37° С. Вимірюють оптичну густину дослідної сироватки і стандарту проти контролю за довжини хвилі 560 нм.

Розрахунок. Концентрацію цинку (K_c) в сироватці вираховуємо за наступною формулою:

$$K_c = E_{\partial} / E_{cm} \times K_{cm},$$

де: K_c – концентрація цинку в сироватці крові; E_{∂} – оптична густина дослідної проби; E_{cm} – оптична густина стандарту; K_{cm} – концентрація цинку в стандарті.

Якщо цинку в стандарті 200 мкг/100 мл (30,6 мкмоль/л), то:

$$K_c \text{ мкг/100 мл} = E_{\partial} / E_{cm} \times 200; K_c \text{ мкмоль/л} = E_{\partial} / E_{cm} \times 30,6.$$

П р и м і т к а. Коефіцієнт перерахунку з мкг/100 мл у міжнародну одиницю – мкмоль/л становить 0,153, а для зворотного перерахунку – 6,537.

Література: інструкція з набору реактивів; 101.

10.12.2. Визначення цинку методом атомно-абсорбційної спектрофотометрії

Приготування зразків. Для визначення цинку сироватку крові розводять бідистильованою водою у співвідношенні 1:3–1:10 (оптимально 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 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 проводять в окиснювальному полум'ї ацетилен – повітря. Для запобігання розсіюванню світла рекомендується 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 наступні (мкг/100 мл): у великої рогатої худоби – 100–150; свиней – 100–160; собак – 70–120. Для перерахунку в мкмоль/л показник у мкг/100 мл необхідно помножити на коефіцієнт 0,154.

У разі цинкової 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 міс. 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 кольорів. 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.

Література: [12, С. 156–158; 17, С. 207–211].

РОЗДІЛ 11

ДОСЛІДЖЕННЯ ОБМІНУ ВІТАМІНІВ

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 їх фізико-хімічних властивостях, зокрема розчинності та хімічній природі. Залежно від розчинності, розрізняють вітаміни *жиророзчинні* (А, D, Е, К) і *водорозчинні* (В₁, В₂, В₃, В₅, В₆, В₁₂, В_с, 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 В₁₃ і В₁₅, інозит, убіхінон, карнітин, лінолева і ліноленова кислоти (вітамін F), вітамін U (S-метилметіонін), параамінобензойна кислота.

11.1. Визначення каротину в сироватці крові фотометричним методом

Принцип методу. Каротин екстрагується з білкового фільтрату сироватки крові петролейним ефіром (гексаном) і визначається колориметрично.

Обладнання: фотоелектроколориметр, пробірки, колби мірні на 250 і 500 см³, піпетки на 1, 2, 5 і 10 см³.

Реактиви: 1) петролейний ефір (гексан); 2) 96° етиловий спирт; 3) основний стандартний розчин на каротин: 360 мг калію двохромовоокислого розчиняють у мірній колбі на 500 мл у невеликому об'ємі дистильованої води і доводять до мітки водою. За кімнатної температури розчин зберігається упродовж 12 міс.; 4) робочий стандартний розчин готують у день аналізу розведенням основного водою 1:1.

Хід визначення. 1. У пробірку вносять 1 мл сироватки крові, додають 3 мл 96° етилового спирту і перемішують скляною паличкою.

2. Додають 6 мл петролейного ефіру (гексану), струшують протягом 3 хв.

3. Обережно по стінці пробірки додають 0,5 мл дистильованої води і залишають стояти в темному місці до чіткого розділення і просвітлення верхнього шару (50–60 хв).

4. Верхній шар обережно відбирають піпеткою, переносять у кювету з товщиною оптичного шару 1 см і колориметрують за довжини хвилі 436 нм (синій світлофільтр, № 4) проти розчинника.

5. Паралельно вимірюють екстинцію робочого стандартного розчину проти води.

Розрахунок результатів проводять за формулою:

$$X = E_d / E_{cm} \times 1248,$$

де X – кількість каротину в мкг/100 мл сироватки крові; E_d – екстинція досліджуваної проби; E_{cm} – екстинція робочого стандартного розчину; 1248 – коефіцієнт перерахунку в мкг/100 мл.

П р и м і т к а. Для перерахунку в мкмоль/л необхідно одержаний результат помножити на коефіцієнт 0,01863.

Література: [4, С. 188–189; 63, С. 34–36; 90, С. 128–129].

11.2. Визначення вітаміну А і каротину в сироватці крові, молозиві, жовтку яєць та печінці (за методом Бессей О. в модифікації Левченка В.І. зі співавт., 1998)

Принцип методу полягає в лужному гідролізі та екстракції вітаміну А і каротину з сироватки крові (молозива), печінки 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 гідроксид, хч; 3) ксилол, ч, краще метаксилол; 4) октан, хч.

Приготування реактивів: а) 1 н розчин КОН у 96° етанолі (для приготування 100 мл розчину необхідно до 5,6 г КОН, х.ч., додати 6,0 мл дистильованої води, розчинити його і довести етанолом об'єм до 100 мл, після чого суміш старанно перемішати). Реактив готують у день аналізу; б) ксилол-октанова суміш (āā), яку готують за 2–3 год. до роботи; краще використовувати метаксилол.

Підготовка субстрату. Свіжовідібрані проби печінки гомогенізують, потім відбирають від 50 до 3000 мг гомогенізатору і вносять у центрифужну пробірку.

Хід визначення. У центрифужні пробірки вносять 2 мл сироватки крові (жовтка яєць, молозива) або частину гомогенізованої печінки, додають 2 мл спиртового розчину КОН, перемішують тонкою скляною паличкою до утворення однорідної суміші. Пробірки ставлять для гідролізу у водяну баню на 20 хв за 60° С (печінку на 40 хв). Через кожні 10 хв проби перемішують. Після гідролізу пробірки охолоджують протягом 10 хв у морозильній камері холодильника або у крижаній воді. У кожен пробірку додають по 4 мл ксилол-октанової суміші, пробірки закривають капроновими пробками, інтенсивно струшують протягом 2–3 хв, знову охолоджують 7–10 хв, а потім центрифугують 10–15 хв за 3000 об/хв. Верхній шар, що містить екстракт вітаміну А і каротиноїдів у ксилол-октановій суміші, відбирають піпетками у пробірки зі скла пірекс, закривають скляними притертими пробками. Фотометрію проводять у кюветі з товщиною робочого шару 10 мм. Для контролю використовують ксилол-октанову суміш. Визначення каротину на СФ-46 проводять за довжини хвилі 460 нм, ретинолу – 328 нм (на КФК-2 або КФК-3 відповідно 440 і 315 нм). Повторно оптичну густину суміші за 328 нм для визначення вітаміну А вимірюють після опромінення пробірок ультрафіолетовими променями протягом 50 хв з сироваткою крові (молозивом) і 70 хв (проби печінки і жовтка яєць). Для цього 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 під час фотометрії до і після опромінення, визначають концентрацію вітаміну А у сироватці крові (молозиві, печінці, жовтках яєць).

Розрахунок вмісту вітаміну А у сироватці крові і молозиві проводять 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 за довжини хвилі 328 нм (315 нм); E_2 – екстинція розчину після опромінення за тієї ж довжини хвилі; 1274 та 1500 – коефіцієнти для визначення вітаміну А за фотометрії, відповідно, на СФ (1274) і КФК (1500).

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

де E – екстинція розчину за довжини хвилі 440 нм; 762 та 850 – коефіцієнти для визначення каротину.

У ході дослідження печінки і жовтка яєць розрахунок проводять за формулами:

$$A, \text{мкг/г} = \frac{(E_1 - E_2) \times 19,1}{M},$$

де M – маса печінки, взятої для аналізу, г; 19,1 – коефіцієнт для визначення вітаміну А на СФ-16 або СФ-46;

$$\text{Каротин, мкг/г} = \frac{E \times 14,4}{M},$$

де E – екстинція розчину за довжини хвилі 460 нм; M – маса печінки, в грамах; 14,4 – коефіцієнт для визначення каротину.

П р и м і т к и: 1. Вміст вітаміну А в печінці і жовтках яєць визначають на спектрофотометрі.

2. Вірогідної різниці вмісту вітаміну А у різних частках печінки немає.

3. Зберігання свіжовідібраної печінки у морозильній камері побутового холодильника упродовж 30 діб, не впливає суттєво на вміст вітаміну А [54, 55].

4. За відсутності гомогенізатора шматочки печінки розтирають у фарфоровій ступці.

Діагностичне значення. Кількість каротину в сироватці крові залежить від віку і виду тварин. У новонароджених телят виявляють лише сліди каротину, одномосячних – 20–50 мкг/100 мл, молодняку 3–6-місячного віку – 250–800, у тварин більш старшого віку і корів – 450–1250 мкг/100 мл. У пасовищний період уміст каротину в сироватці крові корів може сягати 2 мг/100 мл. Незважаючи на те, що каротин засвоюється телятами з перших днів життя, оцінювати стан А-вітамінного обміну за цим показником неможливо до 3-місячного віку, тому що 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 за низького вмісту каротину в сироватці крові А-гіповітаміноз може не розвиватися за умови використання препаратів вітаміну А у складі преміксу або парентеральних ін'єкцій. За певних умов (нестача йоду, протеїну, жиру) А-гіповітаміноз, навпаки, розвивається за нормальної 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 у разі

їх запалення або патології печінки. Критичним рівнем для корів є вміст 300–350 мкг у 100 мл сироватки крові (Левченко В.І., Сахнюк В.В., 1996).

Зважаючи на обмежену діагностичну інформативність визначення каротину, у 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, місячного віку – 12,5–25 мкг/100 мл (Левченко В.І., Сахнюк В.В.), тримісячного – 15–35, у 6–12-місячного молодняку – 30–80 (Щуревич Г.О., 1986), корів у стійловий період – 25–80, літній – 40–150; вівцематок і коней – 15–25; 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.

У першому–другому молозиві корів, свиноматок, кобил, вівцематок вміст вітаміну А становить 3–6 мг/л (критичний – 2, 3 мг/л).

Визначення вмісту ретинолу в печінці дає змогу враховувати його запаси в організмі. Уміст ретинолу в печінці становить (мкг/г сирової печінки): в одnodенних телят – 6–10, молодняку великої рогатої худоби – 30–90; корів – 60–200; поросят одnodенних – 9–12 взимку і 15–17 – влітку, двотижневих – 12–20, 1–2-місячних – 15–30, у групі вирощування та відгодівельних – 25–60; у добових курчат – 20–30, каченят – 15–80, гусенят – 25–140, індичат – 40–50, у молодняку птиці – не менше 60. Про ступінь забезпечення потреби птиці у вітаміні А судять за його вмістом у жовтку інкубаційних яєць. У курей вміст вітаміну А має становити 6–8, а каротину – більше 15 мкг/г, індичок – 7–10 і більше 15, качок – 8–12 і більше 20, гусей – 10–13 і більше 20 мкг/г.

П р и м і т к а. Для перерахунку вмісту вітаміну А у мкмоль/л необхідно результат, одержаний у мкг/100 мл, помножити на коефіцієнт 0,0349.

Література: [4, С. 186–187; 17, С. 501–503; 54; 55; 63, С. 36–38].

11.3. Визначення вмісту 25ОНD₃ імуноферментним методом

Принцип методу. IDS 25-hydroxy Vitamin D тест ґрунтується на методі імуноферментного аналізу. Калібрувальні, контрольні і дослідні зразки розводять біотинізованим 25-ОН Vit D. Під час реакції 25-ОН Vit D калібраторів, контролів і зразків конкурує з біотинізованим 25-ОН Vit D за місця зв'язування на високоспецифічних овечих анти-25-

ОН Vit D антитілах, сорбованих у лунках планшети упродовж 2 год за кімнатної температури. Після аспірації реагента і промивання планшет додається пероксидаза хрону, **кон'югована** з авідином. Формується комплекс, який визначається кількісно під час інкубації з субстратом – тетраметилбензидином (ТМБ). Інтенсивність забарвлення зворотно пропорційна вмісту 25-ОН Vit D у субстратах, зразках і контролі.

Реактиви, що входять до складу набору:

1. Cal-калібратори 25-ОН Vit D NoNo – 6-калібратори містять ліофілізовані стандарти 25-ОН Vit D і 0,09% азид натрію. Концентрація стандартів вказана на флаконах, об'єм 1 мл у кожному з 7 флаконів.

2. Мікропланшет на 96 лунок з сорбованими всередині поліклональними овечими анти-25-ОН Vit D антитілами (12 стрипів по 8 лунок) у запечатаному пакеті з адсорбентом вологи.

3. 25-D Biotin – концентрат 50×25-D біотинового кон'югату. Ліофілізований буферний розчин, який містить 25-гідроксिवітамін D, мічений біотином, патентовані стабілізатори – 1 мл у флаконі.

4. Буферний розчин: реагент для дисоціації 25-гідроксिवітаміну D з комплексів зі зв'язувальними білками – 50 мл у флаконі.

5. Ферментний кон'югат – фосфатний буфер, що містить, кон'югований з пероксидазою хрону авідин, білок, ферментні стабілізатори і консерванти – 22 мл у флаконі.

6. Контролі 1–2. Ліофілізована сироватка людини, містить 25-гідроксिवітамін D, 0,09% азидину натрію (по 1 мл у 2 флаконах).

7. ТМБ субстрат – патентована водна форма тетраметилбензидину і пероксиду гідрогену (водню) – 28 мл у флаконах.

8. Стоп-розчин – 0,5 М хлоридна кислота – 13 мл.

9. Промивний буферний розчин – концентрат 20-фосфатно-сольовий буферний розчин, містить Твін – 50 мл. (Кат. № AC-WASHL).

10. Вісім адгезивних плівок для мікропланшета.

Набір стабільний до вказаного терміну придатності за умови зберігання за 2–8° С .

Приготування реагентів і зразків

1. Калібратори і контролі поставляють у ліофілізованому вигляді. Розчиняють у 1 мл бідистильованої або деіонізованої води, закривають кришкою і залишають за кімнатної температури на 10–15 хв, потім перевертають кілька разів до повного розчинення. Зберігається за температури + 2–8° С до двох місяців.

2. 25-D біотиновий кон'югат: додають 10 мл буферного розчину (№ 4) у флакон з концентратом (№ 3), утворюється розчин блакитного кольору. Закривають кришечкою і залишають на 10–15 хв за кімнатної температури, потім перевертають кілька разів до повного розчинення. Розведений біотиновий кон'югат (10 мл)

добавляють у флакон із залишком (40 мл) буферного розчину (4), добре перемішують, перевернувши. Готовий розчин (50 мл) 25-D біотинового кон'югату має зелений колір. Позначають флакон «25-D біотиновий кон'югат». Зберігається за температури 2–8° С до двох місяців.

3. Промивний розчин (9) – 50 мл розчину додають до 950 мл дистильованої або деіонізованої води, добре перемішують. Зберігається за кімнатної температури до 8 тижнів.

Всі інші реагенти (№ 1, 5, 6, 7, 8) готові для використання. До початку роботи вони мають досягти кімнатної температури, перед використанням старанно перемішують перевертанням. Невикористані стрипи необхідно покласти в пакет з адсорбентом вологи і щільно закрити краї липкою стрічкою. Необхідно зберігати за температури 2–8° С. Термін – упродовж 2 міс.

Показники руйнування реагентів:

- наявність сторонніх залишків у будь-якому з реагентів;
- зниження оптичної густини нульового калібратора;
- зміни нахилу кривої порівняно з оптимальною позицією.

Збір і зберігання зразків: для аналізу можна використовувати сироватку або плазму (ЕДТА- і гепаринову). Їх необхідно відокремити як можна швидше від еритроцитів після взяття крові. Тривале зберігання можливе за температури –20° С. Уникають повторного заморожування і відтавання зразків.

Хід визначення. 1. Готують марковані пробірки розміром 12×75 мм з боросилікатного скла або поліпропілену для кожного калібратора, контролю і зразка.

П р и м і т к а: полістиренові пробірки непридатні, не використовувати пробірки повторно.

2. Вносять по 25 мкл (0,025 мл) кожного калібратора, контролю або зразка у марковані пробірки.

3. У всі пробірки добавляють по 1 мл 25-D біотинового розчину. Перемішують упродовж 10 с.

4. Додають по 200 мкл (0,2 мл) розбавленого калібратора, контролю або зразка у відповідні лунки сорбованого планшета (кожний – у 2 лунки). Закривають планшет адгезивною плівкою. Інкують 2 год за температури 18–25° С.

5. Промивають лунки три рази промивним розчином. У разі автоматичного режиму використовують 300 мкл (0,3 мл) на лунку на один цикл промивання, повністю видаляють рідину після кожного з трьох циклів.

Якщо режим промивання ручний, то необхідно звільнити лунки перевертанням. Добавляють 250 мкл (0,25 мл) промивного розчину у всі лунки. Видаляють рідину і повторюють цикл промивання, потім

видаляють рідину і повторюють ще двічі. Просушують лунки, перевернувши їх на фільтрувальний папір або інший сорбент для видалення залишків промивного розчину.

6. Додають по 200 мкл ферментного кон'югату (реагент № 5) у всі лунки багатоканальним дозатором. Закривають планшет адгезивною плівкою. Інкують 30 хв за температури 18–25 °С.

7. Повторюють пункт 5 (промивання лунок).

8. Додають по 200 мкл ТМБ субстрату (реагент № 7) у всі лунки багатоканальним дозатором. Закривають планшет адгезивною плівкою. Інкують 30 хв за температури 18–25 °С.

П р и м і т к а. ТМБ субстрат легко забруднюється, тому із флакона треба відбирати лише необхідну кількість реагенту. Залишок відібраного реагенту викинути.

9. Додають 100 мкл (0,1 мл) стоп-розчину (хлоридної кислоти – реагент № 8) у всі лунки багатоканальним дозатором.

10. Визначають оптичну густину лунок за 450 нм із фільтром порівняння 650 нм упродовж 30 хв після додавання стоп-реагенту.

Калібрування. Калібратори вітаміну 25-ОНD стандартизовані за кількістю V.V.

Розрахунок результатів

Розрахувати процент зв'язування (В/Во%) кожного калібратора, контролю та невідомого зразка наступним чином (табл. 11.1):

Таблиця 11.1

Приклад даних аналізу для ілюстрації

(їх не можна використовувати для розрахунку результатів зразків)

№ лунки	Зразок	Оптична густина (ОГ)	Середня ОГ	В/Во%	Значення мМЕ/мл
A1, A2	Калібратор 0 (0 нмоль/л)	2,476/2,530	2,503		
B1, B2	Калібратор 1 (6,8 нмоль/л)	2,313/2,288	2,301	91,9	
C1, C2	Калібратор 2 (14 нмоль/л)	1,912/1,908	1,910	76,3	
D1, D2	Контроль 3 (27 нмоль/л)	1,495/1,499	1,497	59,8	
E1, E2	Контроль 4 (67 нмоль/л)	0,919/0,905	0,912	36,4	
F1, F2	Калібратор 5 (179 нмоль/л)	0,521/0,522	0,522	20,8	
G1, G2	Калібратор 6 (380 нмоль/л)	0,372/0,368	0,370	14,8	
H1, H2	Зразок пацієнта 1	1,237/1,257	1,247	49,8	39
H3, H4	Зразок пацієнта 2	0,951/0,969	0,960	38,4	62
A3, A4	Зразок пацієнта 3	0,591/0,612	0,602	24,0	138

$$B / Vo\% = \frac{Ec}{Ec,к} \times 100,$$

де, V/V_0 – процент зв'язування; E_s – середнє значення оптичної густини; E_c, k – середнє значення оптичної густини калібратора "О".

На підставі результатів вимірювання калібраторів будують калібрувальний графік на напівлогарифмічному папері, відкладаючи значення $V/V_0\%$ на осі ординат проти концентрації 25-гідроксिवітаміну D на осі абсцис (рис. 11.1).

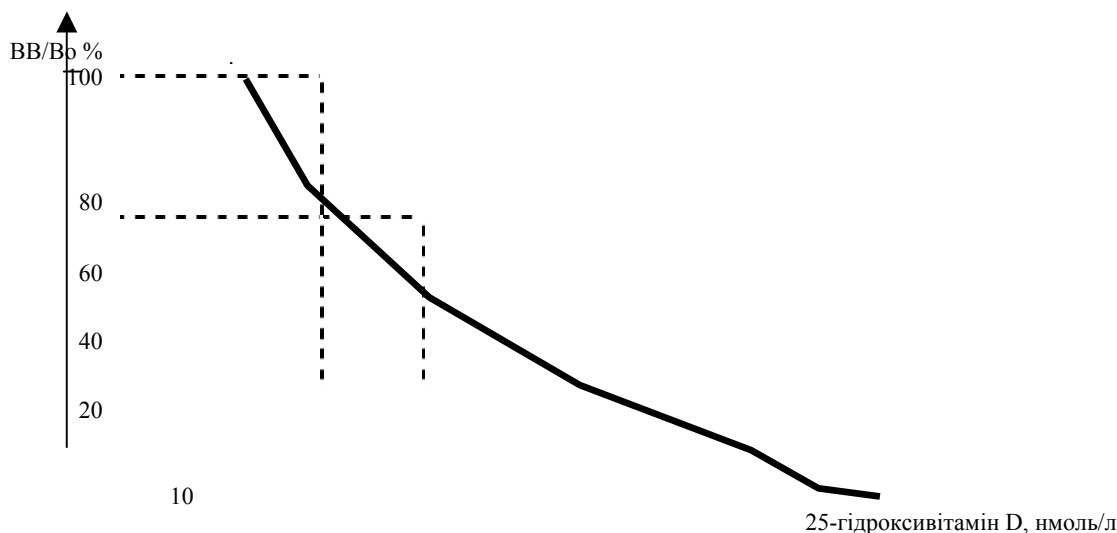


Рис. 11.1. Калібрувальний графік

Розрахувати $V/V_0\%$ для кожного невідомого зразка і його значення в нмоль/мл (нМ) за калібрувальною кривою.

П р и м і т к а. $\text{Нмоль/л} \times 0,40 \rightarrow \text{нг/мл} \times 2,5 = \text{нмоль/л}$.

11.4. Визначення активного метаболіту вітаміну D₃ в сироватці (плазмі) крові

1. Засоби та допоміжні пристрої. Мікроплашковий імуноферментний аналізатор, що налаштовується на довжину хвилі 450, 620 або 690 нм; інкубатор-шейкер, автоматичний дозатор-промивач; вортекс (автоматичний струшувач); центрифуга з охолоджувачем на 3000 об/хв; охолоджувальний блок (+4° С) для мікропланшет, проб та контролів; холодильний пристрій (5–10° С); морозилка для заморожування (до –20° С); механічні одноканальні дозатори зі змінним об'ємом 5–50, 50–200, 200–1000 і 1000–5000 мкл; механічний 8-канальний дозатор змінного об'єму 50–200 мкл; фольга для накриття плашки під час інкубації; наконечники; градуйований лабораторний посуд, полістиролові пробірки; фільтрувальний папір для просушування стрипів;

бідистильована вода; міліметровий папір для побудови калібрувального графіка (за відсутності програмного забезпечення).

2. Підготовка реагентів та дослідних проб до визначення вмісту активного метаболіту вітаміну D_3 – 25OHD_3 в сироватці (плазмі) крові. Реактиви готують залежно від кількості проб. Реагенти за об'ємом менше 100 мкл перед використанням слід центрифугувати для запобігання втрати кількості.

Мийний буфер. До 100 мл концентрату додається 900 мл дистильованої води (1:10). Термін зберігання готового розчину – 1 міс. (2–8 °С).

Робочий буфер. Перед використанням інкубують у водяній бані 10 хв за температури 37° С.

Реагент VDBP (vitamin D binding protein) – вітамін D-зв'язувальний протеїн. Вміст флакона з VDBP розчиняють в 11 мл робочого буфера, ретельно перемішують (без використання вортекса). Залишають за кімнатної температури на 30 хв. Готовий реагент розносять у декілька скляних флаконів, які заморожують за температури мінус 20° С і використовують за необхідністю. Перед використанням заморожений реагент VDBP інкубують 10 хв за температури 37° С. Забороняється повторне заморожування.

Анти-VDBP антитіло (11 мл) – реагент готовий до використання.

Стандарти 25OHD_3 (0; 6,4; 16; 40; 100; 250 нмоль/л); NSB-контроль (неспецифічний зв'язувальний контроль); контролю (2 по 0,5 мл) – готові до використання.

Кон'югат, мічений пероксидазою (22 мл) – готовий до використання.

ТМВ-субстрат (2 флакони по 15 мл); стоп-розчин (7мл) – готові до використання.

Підготовка проб. Сироватку (плазму) крові відбирають та отримують загальноприйнятим методом. Проби зберігають за температури 2–8° С до – 24 год, за -20° С – від 3 до 6 міс. Ліпемічні зразки сироватки крові перед використанням центрифугують (10 хв – 3000 об/хв).

3. Методика та правила проведення визначення вмісту активного метаболіту вітаміну D_3 – 25OHD_3 в сироватці (плазмі) крові

Принцип методу. Тест базується на конкуренції 25OHD_3 , що наявний у зразку, з 25OHD_3 вітаміном D трейсером за зону зв'язування вітаміну D-зв'язувального протеїну (VDBP, Gc-глобуліни). Оскільки весь циркулюючий 25OHD_3 зв'язується з VDBP *in vivo*, зразки потрібно осаджувати преципітувальним реагентом для екстракції аліквоти. Супернатант може використовуватися без подальшої обробки в тесті.

За час першої інкубації зразок, калібратор, контроль, вітамін D-зв'язувальний протеїн і VDBP-антитіло, антитіло, специфічне до цього протеїну, додаються до реагуючого компоненту.

Присутній у зразку 25ОНD₃ конкурує з трейсером, прив'язаним до лунки, за специфічну ділянку сполучення зв'язувального протеїну, і VDBP-антитіло поєднується з вітамінозв'язувальним протеїном. Відповідно, за збільшення концентрації 25ОНD₃ у зразку кількість зв'язаного протеїну, імібілізованого до лунок через трейсер, зменшується. Після кожного промивання для видалення незв'язаних компонентів VDBP кількісно визначається шляхом інкубації зі специфічним антитілом, міченим пероксидазою, за використання ТМБ як ензимного субстрату. Потім додають окиснювальний стоп-розчин для зупинки реакції. Колір змінюється на жовтий. Інтенсивність жовтого кольору обернено пропорційна концентрації 25ОНD₃ у зразку. На підставі отриманих результатів стандартних розчинів будується калібрувальний графік. Концентрація 25ОНD₃, яка присутня в пробі, визначається за допомогою стандартної кривої.

Дослідження проводять у два етапи: процедура екстракції та постановка тесту.

Процедура екстракції

1. У пластикові пробірки поміщають 50 мкл зразка, калібратора та NSB (неспецифічний зв'язувальний контроль, лише робочий буфер).

2. Додають 400 мкл преципітувального реагенту до зразка, калібратора та NSB-контролю. Ретельно перемішують на вортексі. Інкують 30 хв за температури мінус 20° С.

3. Центрифугують 10 хв (3000 об/хв) за температури 4° С. Супернатант містить екстрагований 25ОНD₃ і його терміново досліджують.

П р и м і т к а. Під час перенесення зразків мікро планшет утримують за температури 4° С.

Постановка тесту. Перед використанням всі реагенти та дослідні зразки доводять до кімнатної температури (18–26° С).

У протоколі відмічають положення стандартів, зразків і контролів.

1. Встановлюють мікропланшет, преципітовані стандарти, контролі й проби в охолоджувальний блок і витримують до закінчення внесення реагентів.

2. Додають 20 мкл стандартів, контролів, зразків у дублікатах у відповідні лунки.

3. Додають 100 мкл VDBP у кожен лунку, окрім неспецифічного зв'язувального контролю (NSB).

4. Додають 100 мкл робочого буфера в лунку з NSB.

5. Додають 100 мкл анти-VDBP антитіла в кожен лунку.

6. Планшет ретельно накривають та інкубують 3 год за температури 5–10° С у темному місці.
7. Аспірують і промивають лунки 5 разів по 350 мкл промивним буфером. Залишки струшують на фільтрувальний папір.
8. Додають 200 мкл кон'югату у кожен лунку.
9. Планшет ретельно накривають та інкубують упродовж 1 год за температури 5–10° С у темному місці.
10. Аспірують і промивають лунки 5 разів по 350 мкл мийним буфером. Залишки струшують на фільтрувальний папір.
11. Додають 200 мкл субстрату в кожен лунку.
12. Інкубують 20–30 хв за кімнатної температури (18–26° С) у темному місці.
13. Додають 50 мкл стоп-розчину в кожен лунку та ретельно перемішують.
14. Визначають оптичну щільність (абсорбцію) розчину в лунках на автоматичному аналізаторі за довжини хвилі 450 нм.

4. Правила оформлення результатів

1. Підраховують показники абсорбції для кожного стандарту, контролю та дослідного зразка.
2. На міліметровому папері будують калібрувальний графік. Значення абсорбції кожного стандарту наносять на вісь „Y”, значення концентрацій активного метаболіту 25ОНD₃ в нмоль/л – на вісь „X”.
3. Визначають концентрацію контролів та дослідних зразків за стандартною кривою.

П р и м і т к а. Під час підключення мікроплашкового імуноферментного аналізатора до персонального комп'ютера і за наявності відповідного програмного забезпечення калібрувальний графік (стандартна крива) і результати дослідження проб сироватки (крові) вираховують автоматично.

5. Допустимі похибки

Внутрішньотестовий (n = 20)		
Проба	25ОНD ₃ (нмоль/л)	Vk (%)
1	4,5	10,7
Внутрішньотестовий (n=20)		
Проба	25ОНD ₃ (нмоль/л)	Vk (%)
1	39,8	13,2
2	86,7	11,8

6. Клінічне значення визначення концентрації активного метаболіту вітаміну D₃ – 25ОНD₃. Вітамін D – це стероїдний гормон, який бере участь в абсорбції кальцію в кишечнику і регулює його гомеостаз. Є дві різні форми вітаміну D: D₂ (ергокальциферол) та D₃ (холекальциферол), які подібні за своєю структурою.

Фізіологічний рівень вітаміну D₃ залежить не тільки від спожитого корму, але й від біосинтезу 7-дегідрохолестеролу та ультрафіолетового випромінювання. У печінці вітамін D гідроксилується до 25-гідроксихолекальциферолу, визначення якого є інформативним тестом ранньої діагностики D-гіповітамінозу.

Визначення 25ОНD₃ у сироватці (плазмі) крові дозволяє ставити чіткий діагноз, проводити ефективний контроль за ефективністю лікування остеопорозу, остеомалаяції, рахіту, ниркової остеодистрофії, неонатальної гіпокальціємії та гіперпаратиреодизму.

Значення вітаміну D в гомеостазі кальцію та фосфору. У регуляції гомеостазу кальцію і фосфору важлива роль належить вітамінам групи D. Найбільш поширені вітамін D₂ (ергокальциферол) і вітамін D₃ – холекальциферол. У печінці з них синтезується 25-гідроксихолекальциферол (25ОН D₃), активність якого в 1,5–2 рази вища порівняно з початковою. Він є основною транспортною формою вітаміну D₃. 25ОНD₃ транспортується в нирки, де утворюються гормонально активні метаболіти вітаміну D₃ – 1,25- і 24,25-дигідроксихоле-кальциферол. 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 – зі зниженням рівня паратгормону, що зменшує виділення фосфатів з сечею.

Доведено вплив метаболітів вітаміну D₃, зокрема 1,25(ОН)₂D₃, на абсорбцію фосфору в кишечнику, проте поки що не вдалося виділити специфічний для вітаміну D білок, який брав би участь у транспорті фосфору. Ймовірно, дія вітаміну D опосередковується лужною фосфатазою, під впливом якої на поверхні кишкового епітелію відбувається гідроліз різних моноефірів фосфорної кислоти, що призводить до підвищення концентрації аніонів фосфору в місцях його транспортування.

Крім лужної фосфатази, вітамін D регулює транспорт фосфору в кишечному епітелії через модифікацію активними метаболітами ліпідної фази мембран ентероцитів, що приводить до підвищення її проникності. Останнім часом встановлено, що вітамін D₃ і його активний метаболіт 1,25(ОН)₂D₃ у відділі порожньої кишки стимулюють активний насичувальний транспортний механізм, який залежить від концентрації

Na⁺. 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 Ca²⁺. Вплив вітаміну D на процеси всмоктування цих елементів здійснюється незалежними механізмами.

Окрім стимуляції абсорбції кальцію і фосфору в кишечнику, вітамін D впливає на їх реабсорбцію в нирках. Щодо кальцію цей вплив реалізується через кальцієзв'язувальний білок, який синтезується в клітинах нирок під дією 1,25(OH)₂D₃, та через безпосередній вплив його на мембранний потенціал і транспорт кальцію в проксимальних канальцях нирок. Роль вітаміну D у нирковій екскреції фосфору тривалий час залишалася не з'ясованою. І лише в останні десятиліття ХХ ст. доведено стимулювальний вплив фізіологічних доз 1,25(OH)₂D₃ на реабсорбцію фосфору в ниркових канальцях.

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 з кісткової тканини. У тварин, які мали низькокальцієву дієту, введення 1,25(OH)₂D₃ 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 компонента і мобілізацію кальцію з кісток у взаємодії з білком – остеокальцином, синтез якого стимулюється вітаміном D. Саме тому кальцитріол вважають “аварійним” гормоном, який діє за вираженої гіпокальціємії, швидко відновлюючи оптимальний рівень кальцію в крові шляхом активації всмоктування його з кишечнику і резорбції кісток.

Література: Настанова щодо використання набору реактивів; [12, С. 179–187; 15, С. 25–39; 53].

Діагностичне значення. Вміст 25ОНD₃ у клінічно здорового молодняка великої рогатої худоби становить 30–70 нг/мл (Левченко В.І., 1986), у хворих на рахіт телят – 7–14 нг/мл (Левченко В.І., Чумак Г.В., 1990) [17]. За результатами визначення 25ОНD₃ запропоновано функціональне оцінювання ступеня вираженості D-гіповітамінозу. Вважається за необхідний рівень вміст метаболіту в межах від 40 нг/мл (100 нмоль/л) до 80–88 нг/мл (200–220 нмоль/л). Вміст 25ОНD₃ в межах від 20 до 40 нг/мл характерний для латентного D-гіповітамінозу, 10–20 – для D-вітамінного дефіциту [103].

Вміст вітаміну D₃ може збільшуватися і зменшуватися. Гіпервітаміноз D₃ розвивається у птиці та дрібних домашніх тварин внаслідок використання високих доз вітаміну D₃ або через порушення його обміну за умов активації ниркового і позаниркового синтезу 1,25 (OH)₂D₃ та первинного гіпервітамінозу. Для сільськогосподарської птиці будь-якого виду і віку вміст вітаміну D₃ не має перевищувати 6 тис. МО в 1 кг комбікорму. D-гіпервітаміноз у птиці характеризується гіперкальціемією та гіперфосфатемією з кальцифікацією м'яких тканин і судин. Особливо інтенсивним є ураження легень, серця, стінок кровоносних судин, нирок і шлунка. Біохімічні зміни проявляються стійким збільшенням у сироватці крові кальцію та фосфору, низькою активністю лужної фосфатази.

D-гіповітаміноз може бути причиною розвитку різних захворювань, передусім рахіту та остеодистрофії. Існують екзо- та ендогенні фактори D-гіповітамінозу. Екзогенні фактори – це дефіцит вітаміну D в раціоні та недостатнє ультрафіолетове опромінення. До ендогенних факторів належать: а) зниження синтезу вітаміну D₃ в шкірі (у собак і кішок не синтезується); б) порушення всмоктування в кишечнику (хронічний гастроентерит); в) порушення обміну вітаміну D в печінці зі зниженням синтезу 25OHD₃ (гепатодистрофія, гепатит, цироз і пухлини печінки); г) порушення синтезу біологічно активних метаболітів – 1,25 (OH)₂D₃ і 24,25 (OH)₂D₃ за патології нирок (Апуховська Л.І. та ін.) та втрата з сечею вітамін-D-зв'язувальних білків з метаболітами вітаміну D за нефротичного синдрому (Kurnik V.R., Hrusko K.A., 1985) [102]; д) генетичні порушення синтезу 1,25 (OH)₂D₃ внаслідок рецесивно спадкової недостатності вітамін-D-гідроксилаз у нирках (вітамін-D-залежний рахіт (рахіт II типу), який виникає внаслідок резистентності органів-мішеней до гормонально-активних метаболітів вітаміну D через порушення синтезу рецепторних білків до активних метаболітів вітаміну D [12, 15].

Література: [12, С. 179–187; 15, С. 25–39; 17, С. 373–382; 53; 102; 103].

11.5. Визначення вітаміну Е у біологічному матеріалі

Принцип методу. Метод ґрунтується на окисненні токоферолів хлоридом феруму і визначенні двовалентного феруму, що утворився, у вигляді забарвленого у рожево-червоний колір комплексу з α, α¹-дипіридиллом (2,2-дипіридиллом), який має максимум поглинання за 520 нм.

Обладнання: водяна баня, фотоколориметр або спектрофотометр, зворотний холодильник, центрифуга, ділильні лійки на 100 і 200 мл;

піпетки градуйовані на 1, 2 і 5 мл; мірні циліндри (колби) на 50 і 100 мл; конічні колби на 100 і 250 мл; пробірки хімічні і центрифужні; вага аналітична; ротаційний випарювач IP-1M2 або інших моделей.

Реактиви: 1) спирт етиловий 96°; 2) бензол (перегнаний), х.ч.; 3) гексан х.ч.; 4) діетиловий ефір; 5) калію гідроксид, 60% розчин; 6) сульфатна (сірчана) кислота, х.ч.; 7) натрію сульфат безводний; 8) ферум (залізо)-дипіридиловий реактив: 250 мг феруму хлориду (х.ч.) і 500 мг α , α^1 -дипіридилу розчиняють в 1 л льодяної оцтової кислоти (х.ч.). Реактив придатний до використання через 5–7 днів після приготування. Зберігати за кімнатної температури в посуді з темного скла. Термін зберігання – протягом 1 року; 9) олійний розчин вітаміну Е в ампулах (100 мг/мл).

Матеріал для дослідження: сироватка крові, печінка, молозиво (молоко), жовток яєць.

Побудова калібрувального графіка. Калібрувальний графік будується для кожної партії залізо-дипіридилового реактиву.

У колбу ємністю 100–150 мл вносять 1 мл олійного розчину токоферолу ацетату з концентрацією 100 мг/мл, додають 10 мл 96° етилового спирту і 2 мл 60% розчину КОН. Колбу з'єднують із зворотним повітряним холодильником і поміщають на 40 хв у водяну баню за температури 78–80° С для омилення ліпідів.

Омилений розчин охолоджують, розбавляють 20 мл дистильованої води, переносять у ділильну лійку і проводять екстракцію вітаміну Е діетиловим ефіром. На першу екстракцію беруть 30 мл, а на дві наступні – по 25 мл ефіру.

Екстракти об'єднують і промивають у ділильній лійці дистильованою водою до нейтральної реакції (проба на лакмусовий папір).

Відмитий екстракт фільтрують у колбу через фільтр з 15 г натрію сульфату безводного. Натрію сульфат промивають невеликою кількістю ефіру.

Ефір упарюють на ротаційному випарювачі (або на водяній бані з застосуванням вакууму) за температури 45–50° С. Сухий залишок розчиняють у бензолі і доводять об'єм у мірному циліндрі до 90 мл.

Один мл основного стандартного розчину містить 1 мг вітаміну Е.

Робочий стандартний розчин вітаміну Е: 5 мл основного стандартного розчину поміщають у мірну колбу на 50 мл і доводять бензолом до мітки. Один мл основного стандартного розчину містить 100 мкг вітаміну Е.

З робочого стандартного розчину вітаміну Е готують серію калібрувальних розчинів (табл. 11.2).

**Приготування розчинів
для калібрувального графіка на токоферол**

№ з/п	Концентрація калібрувальних розчинів, мкг/мл	Приготування розчинів	
		об'єм робочого розчину, мл	об'єм бензолу, мл
1	10	1	9
2	20	2	8
3	30	3	7
4	40	4	6
5	60	6	4
6	80	8	2

Із кожної концентрації вносять у хімічні пробірки по 1 мл розчину і додають по 2 мл ферум-дипіридилового реактиву. Одночасно готують контрольний зразок (1 мл бензолу + 2 мл залізо-дипіридилового реактиву), перемішують і ставлять у темне місце на 30 хв.

Колориметрують на фотоелектроколориметрі в кюветі шириною 5 мм за довжини хвилі 520 нм (світлофільтр № 6) проти контролю. За одержаними результатами будують калібрувальний графік.

11.5.1. Визначення вітаміну Е в сироватці крові

У центрифужну пробірку вносять 1 мл сироватки крові, додають 1 мл 96° етилового спирту, 3 мл гексану, енергійно струшують протягом 2 хв і центрифугують за 3000 об/хв протягом 5 хв. Переносять 2 мл гексанового центрифугату у пробірку з шліфом і випарюють під вакуумом на водяній бані за температури 50° С.

Сухий залишок розчиняють в 1 мл бензолу, додають 2 мл ферум-дипіридилового реактиву, перемішують і ставлять у темне місце на 30 хв. Одночасно готують контрольний зразок (1 мл бензолу + 2 мл залізо-дипіридилового реактиву).

Колориметрують на фотоелектроколориметрі (спектрофотометрі) у кюветі з товщиною робочого шару 5 мм за довжини хвилі 520 нм (світлофільтр № 6) проти контролю.

Розрахунок вмісту токоферолу в сироватці крові проводять за формулою:

$$X = \frac{a \times 3 \times 100}{2 \times 1000},$$

де X – кількість вітаміну Е в сироватці крові, мг/100 мл; a – кількість вітаміну Е за калібрувальним графіком, мкг; 2 – об'єм випареного екстракту; 3 – загальна кількість екстракту; 1000 – перерахунок у мг.

П р и м і т к а. Для перерахунку в мкмоль/л одержаний результат у мг/100 мл необхідно перемножити на коефіцієнт 24.

11.5.2. Визначення вітаміну Е у печінці і жовтках яєць

У конічну колбу ємністю 100 мл вносять 2–5 г подрібненої печінки (жовтків яєць), додають 20 мл 96° етилового спирту і 3 мл 60% розчину КОН. Омилюють на водяній бані із зворотним холодильником за температури 70–80° С до повного розчинення печінки.

Омилений розчин охолоджують, розбавляють 20 мл дистильованої води, переносять у ділильну лійку і проводять екстракцію вітаміну Е діетиловим ефіром. На першу екстракцію беруть 30 мл, а на дві наступні – по 25 мл ефіру. Екстракти об'єднують і промивають у ділильній лійці дистильованою водою до нейтральної реакції (проба на лакмусовий папір).

Відмитий екстракт фільтрують у колбу через фільтр з 15 г натрію сульфату безводного. Натрію сульфат промивають невеликою кількістю ефіру.

Заміряють об'єм ефірного екстракту, з нього відбирають 5 мл, переносять у колбу ротаційного випарювача і випарюють за температури 45–50° С.

Сухий залишок розчиняють в 5 мл бензолу, переносять у центрифужну пробірку, додають 1 мл концентрованої сульфатної кислоти, перемішують і центрифугують за 3000 об/хв протягом 10 хв (для звільнення від каротиноїдів і вітаміну А).

З верхнього бензольного шару відбирають 1 мл, переносять у хімічну пробірку, додають 2 мл залізо-дипіридилового реактиву, перемішують і ставлять у темне місце на 30 хв. Одночасно готують контрольний зразок з реактивів.

Колориметрують на фотоелектроколориметрі (спектрофотометрі) у кюветі з товщиною робочого шару 5 мм за довжини хвилі 520 нм (світлофільтр № 6) проти контролю.

Розрахунок вмісту вітаміну Е в печінці (жовтках яєць, молозиві, молоці) проводять за формулою:

$$X = \frac{a \times V \times 100}{m \times 1000},$$

де X – кількість вітаміну Е в печінці, жовтках яєць, мг/100 г (мг/100 мл молока); a – кількість вітаміну Е, знайдена за калібрувальним графіком, мкг; V – загальний об'єм ефірного екстракту, мл; m – наважка печінки, жовтків яєць, г (молозива, мл); 1000 – перерахунок в мг; 100 – перерахунок на 100 г (100 мл).

11.5.3. Визначення вітаміну Е в молоці (молозиві)

У конічну колбу ємністю 250 мл вносять 100 мл молока (25 мл молозива), додають 10 мл 60% розчину КОН і 20 мл 96° етилового спирту. Омиляють на водяній бані із зворотним холодильником за температури 78–80° С протягом 2–2,5 год.

Омилений розчин охолоджують, розбавляють 20 мл дистильованої води, переносять у ділильну лійку і проводять екстракцію вітаміну Е діетиловим ефіром. На першу екстракцію беруть 30 мл, а на дві наступні – по 25 мл ефіру. Екстракти об'єднують і промивають у ділильній лійці дистильованою водою до нейтральної реакції (проба на лакмусовий папір).

Відмитий екстракт фільтрують у колбу через фільтр з 15 г натрію сульфату безводного. Натрію сульфат промивають невеликою кількістю ефіру.

Заміряють об'єм ефірного екстракту, з нього відбирають 5 мл, переносять у колбу ротатійного випарювача і випарюють за температури 45–50° С.

Сухий залишок розчиняють у 5 мл бензолу, переносять у центрифужну пробірку, додають 1 мл концентрованої сульфатної кислоти, перемішують і центрифугують за 3000 об/хв протягом 10 хв (для звільнення від каротиноїдів і вітаміну А).

З верхнього бензольного шару відбирають 1 мл, переносять у хімічну пробірку, додають 2 мл ферум-дипіридилового реактиву, перемішують і ставлять у темне місце на 30 хв. Одночасно готують контрольний зразок з реактивів.

Колориметрують на фотоелектроколориметрі (спектрофотометрі) у кюветі з товщиною робочого шару 5 мм за довжини хвилі 520 нм (світлофільтр № 6) проти контролю.

Розрахунок вмісту вітаміну Е в молоці (молозиві) проводять за формулою, наведеною вище (підрозділ 11.5.2). Похибка методу не перевищує $\pm 5\%$.

Діагностичне значення. Вітамін Е (токоферол) бере участь в обміні білків, жирів і вуглеводів, реакціях окиснення та відновлення, діє як стабілізатор у процесі обміну пероксидних і гідропероксидних сполук, кетонів та альдегідів. Токоферол входить до ліпопротеїнової структури мембран із високим умістом поліненасичених жирних кислот, завдяки чому забезпечується їхня структурно-функціональна стабільність. Підтримуючи цілісність мембран, токоферол опосередковано стимулює локалізовані у ній ферменти, зокрема Na^+ , K^+ -АТФ-ази, необхідної для підтримання оптимального співвідношення іонів Na і K всередині клітин і поза ними. Недостатній або надлишковий уміст токоферолу в мембранах призводить до їхньої дезорганізації, тобто посилення проникності та

інших змін. Вітамін Е має антиоксидантну дію, яка ґрунтується на приєднанні кисню, а також протидії токсичному впливу самих перекисних сполук.

У курчат, каченят та індичат через нестачу токоферолу розвивається енцефаломалія з характерним ураженням мозочка (множинні крововиливи, розм'якшення, набряки). У молодняку 2–4-місячного віку за одночасного дефіциту токоферолу і селену може розвиватися ексудативний діатез, який проявляється множинними набряками під шкірою в ділянці грудей, шиї, голови, живота, біля основи стегон і крил, інколи спостерігається набряк головного мозку, легень, нирок та серця. За Е-гіповітамінозу в каченят також розвивається м'язова дистрофія і виразки гладеньких м'язів м'язового шлунка, у свиней – токсична гепатодистрофія, у молодняку тварин різних видів – аліментарна м'язова дистрофія або білом'язова хвороба.

У сироватці крові клінічно здорових телят токоферолу міститься 0,3–0,7 мг/100 мл, корів – 0,4–0,6 у стійловий і 0,7–1,4 – у пасовищний періоди; у кобил, відповідно, 0,28–0,32 і 0,45–0,55; свиней – 0,2–0,4; ягнят не менше 0,25; у птиці – 0,9–1,0 мг/100 мл.

У молозиві корів вміст вітаміну Е становить 3,5–5,0 мг/л, у молоці влітку близько 2, взимку – 0,4–1,0 мг/л. Яйця курей (жовток і білок) містять 8–12 мкг вітаміну Е в 1 г, жовток – 16–39 мкг/г. У дефіцитному щодо токоферолу раціоні в 1 г жовтка міститься лише 5–6 мкг токоферолу.

Література: [12, С. 187–190; 50, С. 37–42; 63, С. 41–45].

11.5.4. Експрес-метод визначення вітамінів А і Е в плазмі крові

Принцип методу базується на використанні рідинної хроматографії екстрагованих з біологічних рідин вітамінів.

Реактиви: 0,025% спиртовий розчин бутилокситолуолу (БОТ), 0,0125% гексановий розчин БОТ, 11 н водний розчин КОН, етиловий спирт.

Хід визначення. У пробірки (100×10 мм) вносять 0,5 мл гепаринізованої плазми крові. Для осадження білків додають 0,5 мл 0,025% спиртового розчину бутилокситолуолу (БОТ), добре перемішують, додають 1 мл 0,0125% гексанового розчину БОТ, закривають корками і струшують протягом 5 хв. Після цього з метою розділення водно-спиртової та гексанової фаз проби центрифугують 5 хв за 3000 об/хв і температури 4° С. Відбирають 100 мкл верхнього шару для хроматографічного аналізу на колонці 2×60, заповненій сорбентом Сіласорб 600 з розміром частинок 5 мкм.

Хроматографування проводять у такому режимі:

- 1) об'єм проби, яка вноситься в колонку – 50 мкл;
- 2) швидкість потоку елюенту гексан: ізопропанол (98,5+1,5) – 200 мкл/хв;
- 3) детектування α -токоферолу, якщо $\lambda=292$ нм;
- 4) детектування ретинолу, якщо $\lambda=324$ нм.

Для кількісного визначення вітамінів через колонку прогоняють стандартні розчини вітамінів А і Е. Концентрацію вказаних вітамінів вираховують за формулою:

$$X = \frac{S_3 \times C \times P}{S_c \times M},$$

де X – концентрація вітаміну Е або А в зразку, мкг/г (мкг/мл; S_3 – площа піку ретинолу або α -токоферолу в зразку, ΔE ; S_c – площа піку ретинолу або α -токоферолу в стандартному розчині, ΔE ; C – концентрація вітаміну Е або А у стандартному розчині, мкг; мл; P – фактор розведення, мл; M – наважка зразка, г (мл).

Література: [90, С. 130–131].

11.6. Визначення вітаміну В₂ в яйцях

Принцип методу. Розчини рибофлавіну мають жовте забарвлення і в ультрафіолетовому світлі жовто-зелену флуоресценцію, інтенсивність якої залежить від концентрації рибофлавіну в розчині.

Обладнання: флуориметр, холодильник, ваги аналітичні.

Реактиви: 1) етиловий спирт – 55; 75,5 і 96%; 2) основний стандартний розчин рибофлавіну: 20 мг рибофлавіну (в перерахунку на чисту речовину) розчиняють у дистильованій воді у мірній колбі на 500 мл і доводять водою до мітки. Один мл розчину містить 40 мкг рибофлавіну, розчин стійкий протягом місяця за умови зберігання у холодильнику; 3) робочий стандартний розчин рибофлавіну: Один мл основного стандартного розчину вносять у мірну колбу на 100 мл і доводять дистильованою водою до мітки. 1 мл робочого стандартного розчину містить 0,4 мкг рибофлавіну; 4) натрію гідроксид, х.ч., 15% розчин.

Матеріалом для досліджень є білок і жовток яєць. Яйця розбивають і відбирають окремо білок і жовток, на одне дослідження беруть зразки від 10 яєць.

11.6.1. Визначення вітаміну В₂ у білку

У конічну колбу вносять 20 г білка, додають 75 мл 96° етилового спирту, кілька скляних бусинок і ставлять на апарат для струшування на 1 год. Вміст колби фільтрують через сухий паперовий фільтр і заміряють у циліндрі об'єм фільтрату.

Фільтрат переносять у кювету флуориметра і проводять вимірювання інтенсивності флуоресценції. Паралельно проводять вимірювання інтенсивності флуоресценції стандартного робочого розчину.

У кювети додають по 1 мл 15% розчину натрію гідроксиду для гасіння флуоресценції рибофлавіну. Ретельно перемішують і проводять повторне вимірювання інтенсивності флуоресценції сторонніх флуоресціюючих речовин.

11.6.2. Визначення вітаміну В₂ у жовтку

У конічну колбу вносять 50 мл 55%-ного етилового спирту, додають кілька скляних бусинок, 8 г жовтка, струшують, додають ще 50 мл 55%-ного етилового спирту і ставлять на апарат для струшування упродовж 1 год. Вміст колби фільтрують через сухий паперовий фільтр і заміряють об'єм фільтрату. Вимірювання виконують аналогічно.

Розрахунок результатів проводять за формулою:

$$X = \frac{(A - A_1) \times C \times V}{(B - B_1) \times m},$$

де X – вміст рибофлавіну в білку (жовтку), мкг/г; A – середній із показників флуориметра для дослідного зразка до гасіння флуоресценції; A_1 – після гасіння флуоресценції; B – середній з показників флуориметра для стандартного розчину до гасіння флуоресценції, B_1 – після гасіння флуоресценції; C – концентрація робочого стандартного розчину, мкг; V – загальний об'єм фільтрату, мл; m – наважка білка (жовтка), г.

Діагностичне значення. Рибофлавін, що надходить в організм або синтезується мікрофлорою, у печінці перетворюється у флавін-аденіндинуклеотид (ФАД) і частково у флавінмононуклеотид (ФМН), які є коферментами більше 60 флавінових ферментів (флавопротеїнів), що присутні практично у всіх тканинах і беруть активну участь в обміні білків, вуглеводів, ліпідів, у тканинному диханні – перенесенні гідрогену (водню) з НАДНФН (нікотинамідаденіннуклеотиду фосфату) на цитохроми й назад і таким чином є проміжними акцепторами-донорами гідрогену. Флавопротеїни беруть участь в окисненні амінокислот, оксикислот, глюкози, альдегідів, НАДН і НАДФН.

Основною причиною В₂-гіповітамінозу у птиці є недостатнє надходження вітаміну з кормами.

Діагностичне значення у сільськогосподарських тварин (ссавців) має визначення вмісту рибофлавіну в крові та печінці, а в птиці – в яйцях.

Вміст вітаміну В₂ в 1 г білка яєць курей та індичок – 2–3 мкг, качок і гусей – 1–2 мкг; у жовтку, відповідно – 4–5 і 6–7 мкг. За низького вмісту рибофлавіну в інкубаційному яйці знижується виведення курчат. Половина зародків гине на 7-й день інкубації. Симптоми недостатності рибофлавіну у курчат найчастіше розвиваються у віці 14–30 днів: порушується формування оперення, розвиваються васкуляризація рогівки (кров'яне око), скарлючування пальців, розлади кишечника, парези крил, птиця опирається на скакальні суглоби. В індичат, окрім скарлючування пальців, перехресується дзьоб, розвиваються дерматити у ділянці кута ротової порожнини, повік, кінцівок, голови і шиї, набряки кінцівок та суглобів.

Література: 12. С. 187–190; 63. С. 54–56.

11.7. Визначення аскорбінової кислоти у плазмі за реакцією з 2,2-дипіридиллом

Принцип методу. Аскорбінова кислота відновлює 3-валентний ферум у 2-валентний, який утворює з 2,2-дипіридиллом комплексну сполуку рожевого кольору.

Обладнання: фотоелектроколориметр, центрифуга, пробірки, піпетки, колби мірні.

Реактиви: 1) 5% розчин ТХО кислоти; 2) 40% розчин ТХО кислоти; 3) феруму хлорид, ч.д.а., 3% розчин (зберігається не більше 3 діб); 4) 2,2-дипіридил, ч.; 1% розчин. У мірну колбу на 50 мл вносять 0,5 г 2,2-дипіридилу, додають 4 мл 96% етилового спирту, перемішують і доводять дистильованою водою до мітки; 5) 85% ортофосфатна кислота, ч.д.а.; 6) аскорбінова кислота.

Матеріалом для дослідження є плазма, відібрана від формених елементів крові не пізніше 4 год після взяття крові.

Хід визначення. У центрифужну пробірку вносять 2 мл плазми, додають 0,3 мл охолодженого 40% розчину ТХО кислоти, перемішують скляною паличкою і залишають на 10 хв на холоді (у воді з льодом) для повнішої денатурації білків. Центрифугують 15 хв за 3000 об/хв. У центрифужну пробірку вносять 1 мл надосадової рідини, додають 0,5 мл бідистильованої води, 0,1 мл 85% ортофосфатної кислоти, 0,8 мл 1% розчину 2,2-дипіридилу і 0,1 мл 3% розчину феруму хлориду й залишають

на 30 хв для проявлення забарвлення. Після додавання кожного реактиву вміст пробірки ретельно перемішують. Колір стабільний протягом доби.

Проби центрифугують протягом 5 хв за 3000 об/хв і колориметрують на фотоелектроколориметрі за довжини хвилі 525 нм (світлофільтр № 6, зелений) у кюветі з товщиною оптичного шару 5 мм проти контролю з реактивів (замість надосадової рідини беруть дистильовану воду, далі обробляють як дослідний зразок).

Побудова калібрувального графіка. Розчиняють у мірній колбі 25 мг аскорбінової кислоти на 100 мл у 5% розчині ТХО кислоти і доводять тим же розчином до позначки. Вносять у мірну колбу 10 мл основного стандартного розчину на 100 мл і доводять до позначки 5% розчином ТХО кислоти. В 1 мл робочого стандартного розчину міститься 25 мкг аскорбінової кислоти. Стандартний розчин готується перед проведенням дослідження.

У 6 мірних колб на 100 мл вносять послідовно 4; 6; 8; 10; 20 і 30 мл робочого стандартного розчину аскорбінової кислоти і доводять дистильованою водою до позначки.

У центрифужні пробірки вносять по 1 мл розчину з кожної колби і додають 0,5 мл бідистильованої води, 0,1 мл 85% ортофосфатної кислоти, 0,8 мл 1% розчину 2,2-дипіридилу і 0,1 мл 3% розчину феруму хлориду й залишають на 30 хв для проявлення забарвлення. Після додавання кожного реактиву вміст пробірки ретельно перемішують.

Проби центрифугують протягом 5 хв за 3000 об/хв і колориметрують на фотоелектроколориметрі за довжини хвилі 525 нм (світлофільтр № 6, зелений) у кюветі з товщиною оптичного шару 5 мм проти контролю з реактивів (замість надосадової рідини беруть дистильовану воду, далі обробляють як дослідний зразок).

За результатами вимірювань 3 паралельних серій стандартних розчинів будують калібрувальний графік.

Розрахунок результатів проводять за формулою:

$$X = \frac{a \times 100}{1000},$$

де X – кількість вітаміну С в плазмі крові, мг/100 мл; a – концентрація вітаміну С, знайдена за калібрувальним графіком, мкг; 100 і 1000 – коефіцієнти перерахунку на 100 мл.

Похибка методу не перевищує $3 \pm 1\%$.

Література: 63. С. 56–58.

РОЗДІЛ 12

ДОСЛІДЖЕННЯ ПІГМЕНТНОГО ОБМІНУ

Зі всіх пігментів організму людини і тварини найбільш вивченими є гематогенні. Вони утворюються головним чином у процесі синтезу і розпаду гемоглобіну. До гематогенних пігментів відносять: а) гемоглобін та його похідні: оксигемоглобін (HbO_2), карбгемоглобін (HbCO_3), карбоксигемоглобін (HbCO) і метгемоглобін (MetHb); б) порфірини: уропорфірини, копропорфірини та протопорфірини-1х (до останнього приєднується двовалентний ферум з утворенням гему; в) жовчні пігменти: білірубін і продукти його перетворення – уробілін та стеркобілін. Уробіліноген і стеркобіліноген у цю групу не входять, оскільки не мають забарвлення. Назва "жовчні пігменти" зумовлена тим, що якраз білірубін надає характерне темно-буре (коричневе) забарвлення жовчі, у складі якої він виводиться з організму.

Утворюються жовчні пігменти, головним чином, у процесі розпаду гемоглобіну еритроцитів (70–80%), значно менше (20–30%) – з інших гемовмісних сполук (міоглобіну, дихальних ферментів клітин). Хімічні перетворення гемоглобіну досить добре вивчені. Спочатку з гемоглобіну утворюється *вердоглобін*, а після від'єднання атома феруму і білка глобіну – *білівердин*, який відновлюється, приєднуючи атоми гідрогену, з утворенням *білірубіну*. Це речовина червоно-коричневого кольору, нерозчинна у воді, дуже токсична, особливо для нервових клітин. Білірубін, який утворюється в клітинах системи мононуклеарних фагоцитів (СМФ), з'єднується з білком плазми крові – альбуміном і течією крові надходить у печінку. Будь-які процеси, що зумовлюють зниження концентрації альбумінів у крові, порушують транспортування білірубіну в печінку. І все ж, зв'язування білірубіну з альбуміном не знижує його токсичності, а лише забезпечує транспорт у печінку. Така форма білірубіну називається *вільним, некон'югованим* або *непрямим білірубіном*. Остання назва пояснюється тим, що ця фракція білірубіну без попередньої обробки реактивами *не вступає у безпосередню взаємодію з діазореактивом*.

Надійшовши в печінку, вільний білірубін вибірково поглинається гепатоцитами з крові, втрачає зв'язок з альбуміном і взаємодіє (*кон'югує*) з глюкуроноювою кислотою з утворенням *білірубінглюкуронідів* за участі ферменту УДФ-глюкуронілтрансферази. Кон'югація забезпечує переведення нерозчинного у воді білірубіну в розчинний стан, що сприяє виведенню його у складі жовчі в кишечник. Білірубін-глюкуронід називається *зв'язаним, кон'югованим* або *прямим білірубіном*, оскільки

розчинність його у воді дає можливість безпосередньо взаємодіяти з діазореактивом.

Кон'югований білірубін виділяється проти градієнта концентрації в жовчні капіляри, а потім із жовчю – у дванадцятипалу кишку, де він під впливом мікрофлори гідролізується на вільний білірубін і глюкуронову кислоту. Білірубін, що звільнився, знов же під впливом ферментів мікроорганізмів піддається подальшим перетворенням, продуктами яких є *мезобілірубін* і *уробіліноген*. З тонких кишок частина уробіліногену через систему ворітної вени надходить у печінку, де він повністю руйнується. Таким чином, у здорових людей і тварин *уробіліноген не виділяється з сечею* (дивіться підрозділ 16.5).

Основна кількість уробіліногену та мезобілірубину у товстому кишечнику перетворюється у *стеркобіліноген*, який майже повністю виділяється з калом. Частина його всмоктується в систему каудальної порожнистої вени, течією крові приноситься до нирок і виділяється з сечею, але ця кількість настільки мала, що не виявляється якісними методами. За доступу кисню стеркобіліноген окиснюється у стеркобілін – пігмент, який зумовлює нормальний солом'яно-жовтий колір сечі. Таким чином, саме стеркобілін, а не уробілін є фізіологічним пігментом сечі, хоча у клінічній практиці традиційно вживається термін – ”уробілін“. В останній час, дотримуючись існуючої термінології і враховуючи, що в сечі може бути у незначній кількості уробіліноген, рекомендується об'єднувати їх в одну групу – *уробіліногенових тіл*, які на повітрі окиснюються і перетворюються в *уробілінові тіла*. Збільшення їх кількості у сечі, коли вони виявляються за допомогою якісних реакцій, називається *уробіліногенурією*.

12.1. Визначення білірубину 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 низку проміжних стадій з гему зруйнованих еритроцитів утворюється не проведений через печінку білірубін (непрямий, вільний), який є фізіологічною складовою частиною сироватки крові. Він не розчинний 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 білірубину і його фракцій у сироватці крові визначають за методом Ієндрашика, Клеггорна і Грофа в модифікації В.І. Левченка і В.В. Влізла (1988).

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

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

Реактиви: 1) 0,85% розчин натрію хлориду, чда; 2) кофеїновий реактив: 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) діазосуміш: а) діазореактив 1: 5 г сульфанілової кислоти розчиняють під час нагрівання в 300–400 мл дистильованої води, додають 15 мл концентрованої сульфатної кислоти (ч, відносна густина 1,19). Після повного розчинення сульфанілової кислоти і охолодження розчин доливають дистильованою водою до 1 л. Реактив стійкий, зберігають у посуді з темного скла; б) діазореактив 2: 0,5% 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 удвічі сироватки крові. Перша пробірка є контролем для визначення загального білірубину. У неї додають 0,25 мл ізотонічного розчину натрію хлориду і 1,75 мл кофеїнового реактиву. У другій пробірці визначають вміст загального білірубину: додають 0,25 мл діазореактиву і 1,75 мл кофеїнового розчину.

Третя пробірка є контролем для прямого (кон'югованого) білірубину. 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. 12.1).

Кон'югований білірубін визначають через 5 хв після додавання діазосуміші, а *загальний* – через 20 хв за довжини хвилі 560 нм у кюветах з товщиною оптичного шару 5 мм відносно дистильованої води. Від показників оптичної густини проб із визначення загального та кон'югованого білірубину віднімають показники оптичної густини відповідних контролів і за калібрувальним графіком або таблицею визначають вміст загального та кон'югованого білірубину в мг на 100 мл

сироватки крові, або в мкмоль/л, а за різницею між ними – вміст вільного (некон'югованого) білірубіну.

Таблиця 12.1

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% розчин NaCl	0,25	–	2,0	1,75
Діазосуміш	–	0,25	–	0,25

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

Реактиви: 1) стандарт білірубіну для приготування розчину (в мкмоль/л) – 2 флакони; 2) альбумін для приготування розчину (20 г/л) – 2 флакони.

Приготування розчину білірубіну. У флакон з реактивом 1 відмірюють точно 4 мл дистильованої води і, обережно перемішуючи, розчиняють його вміст. Розчин містить точно таку концентрацію білірубіну (у мкмоль/л), яка вказана на етикетці флакона 1. Зберігають у темному місці за температури +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. За температури +5° С розчин стійкий протягом одного тижня.

Для побудови калібрувального графіка готують низку розведень з різним умістом білірубіну (табл. 12.2). До отриманих розведень додають по 1,75 мл кофеїнового реактиву і по 0,25 мл діазосуміші. У разі появи помутніння можна додати по 3 краплі 30% розчину NaOH. Визначення проводять так само, як дослідних проб через 20 хв.

Таблиця 12.2

Розведення білірубіну для побудови калібрувального графіка

№ розчину	Розчин білірубіну, мл	Розчин альбуміну, мл	Кількість білірубіну 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

12.2. Визначення білірубіну (за методом Ієндрашика, Клеггорна і Грофа)

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

Реактиви: 1) реагент 1 – 15 мг NaNO_2 , хч; 2) реагент 2 – 60 мл 0,5% 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 1 (за об'ємом). Розчин готують перед використанням.

Хід визначення. У 4 пробірки (для визначення загального і кон'югованого білірубіну, а також – контрольні) додають реакенти відповідно до схеми (табл. 12.3).

Таблиця 12.3

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) білірубину оптичну густину проби вимірюють через 5–10 хв (за довготривалого стояння в реакцію вступає непрямий білірубін), а загального – через 20 хв. Вміст некон'югованого білірубину визначають як різницю між рівнями загального і кон'югованого. Контроль на мутність сироватки ставлять для кожної проби.

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

Діагностичне значення. Фізіологічні величини вмісту білірубину в сироватці крові тварин наведено в табл. 12.4.

Збільшення кількості білірубину в сироватці крові – *гіпербілірубінемія* – спостерігається у разі захворювань, які супроводжуються гемолізом еритроцитів за рахунок збільшення в крові некон'югованого (непрямого, вільного, не проведеного через печінку) білірубину (піроплазмідози, лептоспіроз, отруєння речовинами, що спричиняють гемоліз еритроцитів).

Таблиця 12.4

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 спостерігають у тварин за механічної жовтяниці, а одночасне підвищення вмісту обох фракцій пігменту – за паренхіматозної жовтяниці, зумовленої гепатитом або гепатодистрофією.

12.3. Визначення концентрації метгемоглобіну (геміглобіну) у крові (метод Горячковського А.М., Моїсеевої К.В., 1989)

Принцип методу. Метгемоглобін у розчинах дає характерну смугу поглинання світла певної довжини хвилі (619–630 нм). У процесі взаємодії з ціанідами метгемоглобін утворює забарвлену сполуку гемі-глобінціанід, яка не має смуги поглинання світла на згаданій ділянці спектра, внаслідок чого знижується оптична щільність розчину. Зниження оптичної щільності геміглобінціаніду, порівняно з контрольним розчином метгемоглобіну, пропорційне концентрації останнього.

Вказані явища спостерігаються не тільки у слабнокислому, але й у лужному середовищі, що дозволяє взяти за основу для приготування реактивів промислові набори для визначення гемоглобіну крові геміглобінціанідним методом.

Реактиви: 1) буферний розчин натрію двовуглекислого (карбонату) (рН=8,6), уміст флакона з натрію карбонатом (1,0 г) поміщають у мірну колбу на 1 л і доводять до позначки дистильованою водою; 2) буферний розчин ацетон-ціангідриду (уміст ампули з ацетон-ціангідридом (0,5 мл) і флакона з натрію карбонатом переносять у мірну колбу на 1 л, доводять до мітки дистильованою водою); 3) буферний розчин калію гексаціаноферату (III) (уміст флакона з калієм гексаціанофератом (III) – 0,2 г і натрію карбонатом переносять у мірну колбу на 1 л і доводять до позначки дистильованою водою); 4) трансформуючий розчин (уміст трьох флаконів: з ацетон-ціангідрином 0,5 мл, калієм гексаціанофератом (III) 0,2 г, натрієм двовуглекислим 1,0 г вносять у мірну колбу на 1 л і доводять до мітки дистильованою водою).

Хід визначення. Кожний із приготовлених розчинів розливають в окремі пробірки по 5 мл (всього для одного дослідження 4 пробірки), відповідно до номерів розчину. У кожну з пробірок вносять по 20 мкл капілярної крові, перемішують і через 10 хв визначають екстинцію кожної проби (E_1 , E_2 , E_3 , E_4) на спектрофотометрі за довжини хвилі 620 нм у кюветах з товщиною оптичного шару 10 мм проти контрольного розчину – дистильованої води.

Концентрацію геміглобіну виражають у відсотках відносно кількості гемоглобіну. Розрахунок проводять за формулою:

$$\text{MetHb, \%} = \frac{E_1 - E_2}{E_3 - E_4} \times 100,$$

де E_1-E_2 – різниця, що відповідає відносному умісту геміглобіну, що є у крові; E_3-E_4 – різниця оптичної щільності, що відповідає 100%-ній концентрації геміглобіну; 100 – перерахунок концентрації геміглобіну у відсотках.

Знаючи відсотковий уміст геміглобіну та концентрацію гемоглобіну в крові у г/л, можна розрахувати концентрацію геміглобіну в г/л за формулою:

$$MetHb, \text{ г / л} = \frac{Hb (\text{г / л}) \times MetHb (\%) }{100 \%}.$$

РОЗДІЛ 13

ДОСЛІДЖЕННЯ ГЕМОСТАЗУ

Система гемостазу розглядається як один із важливих компонентів пристосувальних реакцій організму, які забезпечують його цілісність і гомеостаз. Функціональною особливістю системи гемостазу є: по-перше, попередження і зупинка кровотечі шляхом підтримки структурної цілісності судинної стінки та швидкого локального тромбування судин у разі пошкоджень; по-друге, вона підтримує кров у рідкому, плинному стані та забезпечує достатній її об'єм у кровоносному руслі за постійного транскапілярного переходу тканинної рідини і плазми. Поряд з цим, вона бере участь у процесах запалення, регенерації, клітинного і гуморального імунітету. У зв'язку з цим доречним буде афоризм, що життя починається з функціонального (локального) внутрішньосудинного утворення тромбів у судинах пупкового канатика і закінчується тромбозом, але здебільшого патологічним дисемінованим.

Функціональний та біохімічний зв'язок з іншими фізіологічними системами – імунною, серцево-судинною, дихання тощо – у разі їх патології зумовлює зміни у системі гемостазу і навпаки.

Основними порушеннями функціонування системи гемостазу є кровотечі, тромбози, тромбоемболії, тромбофілії та ДВЗ-синдром. Перелік нозологічних форм, у патогенезі яких гемокоагуляційні зміни відіграють суттєву роль, може бути достатньо великим: всі види шоку; інфекції, особливо генералізовані; травматичні ушкодження; неоплазії, особливо гемобластози; деструктивні процеси в паренхіматозних органах; імунологічні реакції; акушерська і гінекологічна патологія; отруєння; гемолітичні анемії.

У плані клініко-лабораторної діагностики для практики ветеринарної медицини найбільш важливий ДВЗ-синдром, який розвивається за багатьох захворювань і критичних станів, є неспецифічним та універсальним (табл. 13.1). Дисеміноване внутрішньосудинне мікрозгортання крові (ДВЗ-синдром) – це особливий тип порушення гемостазу, коли за появи тромбіну в кровотоці утворення згустку переривається на стадії розчинного фібрину, а згортання фібрину відбувається на рівні капіляра.

Тобто, суть ДВЗ-синдрому полягає у прижиттєвому утворенні найдрібніших тромбоцитарних агрегантів і фібринових згустків у мікроциркуляторному руслі. У зв'язку з гіперактивацією гемостазу за цієї набутої коагулопатії відбувається підвищене споживання у біохімічних

реакціях факторів згортання, що поряд з утворенням мікротромбів призводить до гіпокоагуляції і відповідно до кровоточивості.

Таблиця 13.1

Причини ДВЗ-синдрому

Ендогенні	Екзогенні
<ul style="list-style-type: none"> – Вивільнення тканинного тромбoplastину за пошкодження тканин внаслідок механічної, термічної чи хімічної травми – Запальна вторинна альтерація – Колаген, що вивільняється в інтерстиції травмованих і оперованих тканин та в стані запалення – Пряма адренергічна стимуляція судинної стінки і гіперкатехоламія як елемент стресів різного генезу (травма, крововтрата, гіповолемія, оперативне втручання тощо) – Аутоімунний механізм розвитку хвороб як причина активації системи комплементу класичним шляхом – Системні патологічні зміни судинної стінки (аутоімунні, склеротичні, у зв'язку із злякисним клітинним ростом, внаслідок лейкозів тощо) – Патологія плаценти 	<ul style="list-style-type: none"> – Інфекційні агенти (бактерії, віруси, рикетсії) – Бактеріальні ендотоксини – Отрути комах і плазунів, які містять коагулази – Отруєння кислотами і лугами; – Патологічна активація клітин крові за гемотрансфузій – Неадекватне знеболювання як причина патогенної адренергічної стимуляції судинної стінки – Тривала некорегована гіповолемія і дегідратація – Лікарська ятрогенія внаслідок застосування антикоагулянтів, кортикостероїдів, антибіотиків, статевих гормонів

13.1. Короткі відомості про фізіологію системи гемостазу

Функціонування системи гемостазу базується на взаємодії і взаємодоповненні багатьох складових: клітин організму, гормонів, цитокінів, власне чинників згортання крові і фібринолізу з їх активаторами та інгібіторами.

Функціонування гемостазу поділяють на такі етапи: первинний, вторинний гемостаз і фібриноліз. Первинний (судинно-тромбоцитарний) гемостаз – утворення тромбоцитарного згустку в місці пошкодження ендотелію (триває 3–5 хв). Вторинний (коагуляційний) гемостаз – складається з двох фаз: 1) коагуляційної, коли провідна роль належить факторам згортання крові з утворенням фібринового згустку (триває 5–10 хв); 2) тромбоцитарно-коагуляційної, яка полягає в ущільненні

згустка за участі тромбостеніну тромбоцитів (триває 10–15 хв від часу його утворення). Фібриноліз – це лізис фібринового згустку. Він завершується відновленням структури і функцій судинної стінки у разі її пошкодження та/або рециркуляцією крові за тромбозу чи тромбоемболії.

Судинно-тромбоцитарний гемостаз. Ендотеліальні клітини, покриваючи внутрішню поверхню судин, забезпечують обмінні процеси між кров'ю і тканинами, оптимізують умови плинності крові, регулюючи тонус судин, запобігають внутрішньосудинному тромбоутворенню, беруть участь у гуморальних та імунних реакціях. Ендотеліоцити регулюють процеси адгезії та агрегації тромбоцитів і проникнення клітин крові (лейкоцитів) за межі кров'яного русла. Зовнішня поверхня ендотеліоцитів вкрита глікокаліксом і включає: інгібітор тромбіну – АТ III та гепарин; тромбомодулін, який у комплексі з тромбіном активує протеїн С; тканинний активатор плазміногену (t-PA); рецептори до тромбіну, колагену, фібрoneктину, фібриногену; L-селектин, P-селектин і E-селектин – посередники адгезії ендотеліоцитів із гранулоцитами і моноцитами; посередник зв'язування з інтегринами цитомембрани лімфоцитів. Ендотеліоцити синтезують дезагрегант простагліцилін, вазодилататор оксид азоту, вазоконстриктори ангіотензин II та ендотелін, низку гемостатично активних речовин АТ III, фактор Віллебранда, тканинний активатор плазміногену (t-PA) та його інгібітор (PAI). Таким чином, ендотеліоцити впливають на всі ланки гемостазу, забезпечуючи як дезагрегантний, так і антикоагулянтний та фібринолітичний потенціали організму.

Базальна мембрана є основою, на якій лежать ендотеліоцити. Вона складається з основної речовини сполучної тканини – кислих глікозаміногліканів (гіалуронова кислота, хондроїтину сульфат, гепарин та інші специфічні сульфополісахариди), їх комплексів із білками (протеоглікани), глікопротеїнів (фібрoneктин, фактор Віллебранда) і волокнистих структур (колагенові, ретикулінові й еластинові волокна). Оголені компоненти базальної мембрани, особливо волокнисті структури, є потужними активаторами як тромбоцитів, так і системи згортання крові. Звичайно, процеси відмирання і регенерації ендотелію відбуваються постійно. Тимчасові ж мікродефекти закриваються тромбоцитами. Пошкодження ендотеліоцитів викликає оголення базальної мембрани і виражений дисбаланс локального гемостазу з ініціацією тромбоцитів до адгезії (приклеювання) та агрегації (взаємосклеювання), а також згортання крові, що спрямоване на тимчасове прикриття пошкодження. Розлади функцій ендотеліоцитів, залежно від характеру, можуть призводити до розвитку як тромботичних, так і геморагічних ускладнень.

Тромбоцити (кров'яні пластинки) – це високоспеціалізовані без'ядерні клітини крові, що утворюються в кістковому мозку з мегакаріоцитів. Фізіологічними стимуляторами тромбоцитопоезу

виступають такі цитокіни, як тромбopoетин та інтерлейкін-11, а інгібіторами – інтерферони та фактор некрозу пухлин. Тривалість життя тромбоцитів складає 7–10 діб. Хоча їм належить виконання цілої низки функцій, однак гемостатичній належить провідна роль. Це забезпечується їх оптимальними розмірами (2–4 мкм), унікальною здатністю до адгезії, агрегації, синтезу і дегрануляції речовин, які беруть участь у реалізації та регуляції практично всіх ланок гемостазу. З α -гранул тромбоцити секретують: антигепариновий чинник, β -тромбоглобулін (інгібітор синтезу простацикліну ендотеліоцитами), інгібітор тканинного активатора плазміногену – PAI-1, фактор Віллебранда, акцелератор-глобулін (ФV плазми), ФXI, ФXIII, високомолекулярний кініноген, тромбоцитарний фактор росту (PDGF) – стимулятор проліферації ендотеліоцитів, гладких м'язів і фібробластів, фібронектин (закріплює тромб на пошкодженій поверхні). Водночас δ -гранули (щільні гранули) вивільняють АДФ, АТФ, Ca^{++} , Mg^{++} , серотонін, антиплазмін, адреналін, гістамін.

За здатністю впливати на адгезивну та агрегаційну спроможність тромбоцитів усі агенти поділяють на індуктори (колаген, тромбін, АДФ, серотонін, адреналін, вазопресин, тромбоксан A_2) та інгібітори (простациклін, простагландин D, аденозин, оксид азоту). У забезпеченні гемостатичних функцій тромбоцитів важливе значення належить похідним арахідонової кислоти циклічним простаноїдам (ейкозаноїдам) і зокрема тромбоксану A_2 (Tx A_2) та простацикліну.

У разі пошкодження ендотеліоцити виділяють тромбоцитаактивуючий чинник, що спричиняє адгезію тромбоцитів до оголеної базальної мембрани (колагену), яка реалізується рецепторно-опосередкованим шляхом через фактор Віллебранда, тромбоспондин, фібронектин. При цьому вони змінюють свою форму і агрегують, утворюючи «містки» між собою за допомогою фібриногену. Внаслідок секреції гранул тромбоцитів значно збільшується локальна концентрація проагрегантів, і агрегація стає незворотною. На цьому завершується формування первинного тромбоцитарного згустка.

Коагуляційний (вторинний) гемостаз. Згортання крові об'єднує низку послідовних ензиматичних реакцій, у яких беруть участь плазмові чинники зсідання, що призводить до утворення фібринового згустка (тромбу). Фактори згортання синтезуються і циркулюють у неактивній формі. Відповідно до міжнародної номенклатури їх пронумеровано римськими цифрами переважно за порядком їх відкриття (табл. 13.2). Активна форма чинників позначається через додавання до відповідної цифри літери «а». З номенклатури виключено ФVI (акцелерин), бо він фактично є ФVa – активною формою проакцелерину. ФIV найчастіше позначається як Ca^{++} , а фактор III – як тканинний чинник (фосфоліпиди). Останні є амфіфільними сполуками, одна частина молекул яких є

водорозчинною, а друга – гідрофобною. У воді молекули фосфоліпідів здатні спонтанно об'єднуватися в упорядковані комплекси, подібні до цитомембран. При цьому їх гідрофобна частина зорієнтована до середини, а гідрофільна – назовні, утворюючи матрицю для процесу коагуляції.

Більшість чинників згортання синтезуються в печінці і поділяються на вітамін К-залежні та вітамін К-незалежні. До вітамін К-залежних належать: II, VII, IX, X фактори, а також антикоагулянти: протеїн С та протеїн S. Їх характерною особливістю є наявність амінокислоти – γ -карбоксивалеріату, яка утворюється за участі активної форми вітаміну К, завдяки чому вони здатні утворювати комплекси з Ca^{++} і фосфоліпідами та піддаватися фізіологічній активації. За нестачі в організмі вітаміну К синтезуються фактори, які не є гамма-карбоксивалеріатом і мають знижені коагуляційні властивості. Фактори II, VII, IX, X, XI, XII, прекалікреїн та протеїн С є проферментами (сериновими протеїназами), які за специфічної активації перетворюються в активну форму.

Таблиця 13.2

Фактори згортання крові (за Ф. Шифманом, 2000)

Фактор	Назва	Синтез	T _{1/2}	Функція
I	Фібриноген	Гепатоцити	4–5 днів	Субстрат
II	Протромбін	Гепатоцити/ вітамін К	3 дні	Фермент
III	Тканинний фактор	ЕК, багато інших клітин	–	Рецептор/ кофактор
V	Проакцелерин (лабільний фактор)	Гепатоцити, ЕК, тромбоцити	12–15 год	Кофактор
VII	Проконвертин	Гепатоцити/ вітамін К	4–7 год	Фермент
VIII	Антигемофільний фактор	Синусоїди печінки	8–10 год	Кофактор
IX	Фактор Крістмаса (тромбопластин плазми)	Гепатоцити/ вітамін К	24 год	Фермент
X	Фактор Стюарта	Гепатоцити/ вітамін К	2 дні	Фермент
XI	Попередник плазмового тромбопластину	Гепатоцити	2–3 дні	Фермент
XII	Фактор Хагемана	Гепатоцити	1 день	Фермент
XIII	Фібриностабілізуювальний фактор	Гепатоцити/ тромбоцити	8 днів	Трансглутаміназа
–	Прекалікреїн, фактор Флетчера	Гепатоцити	–	Фермент
	Високомолекулярний кініноген (фактор Вільямса)	Гепатоцити	–	Кофактор

Загальноновизнаним є каскадно-комплексний процес згортання крові, який відбувається у три фази.

I фаза згортання. У цей період відбувається активація X-фактора, двома шляхами. Перший, внутрішній (внутрішньосудинний) ініціюється переважно контактом крові з негативно зарядженою штучною або біологічною поверхнею, зокрема з деякими компонентами мембрани (сульфатидами), які оголюються під час пошкоджень [XIIa → Xa]. Другий, зовнішній (тканинний) шлях ініціюється тканинним тромбoplastином знову ж таки до FXa.

Активація FX за «внутрішнім» шляхом (триває 4,5–6,5 хв) починається із збудження FXII, який з FXI, високомолекулярним кініногеном та прекалікρείном утворює своєрідний комплекс, що адсорбується на негативно зарядженій поверхні, де реалізується так звана «реакція контакту». При цьому відбувається локальна і потужна взаємоактивація цих чинників. Це призводить у присутності Ca⁺⁺ до активації FIX. Надалі FIXa, FVIIIa, тромбоцитарні фосфоліпіди і Ca⁺⁺ утворюють фермент-кофакторний комплекс (теназа), який активує FX. Активований FX (FXa) називають тромбокіназою.

Утворення тромбокінази за «зовнішнім» механізмом є короткотривалим (12–16 с) та ініціюється тканинним чинником. Останній є мембранним протеїном, багатими на який є субендотеліальні структури. Він присутній майже в усіх тканинах (але не в синовіальній рідині суглобів), еритроцитах та тромбоцитах. Моноцити після стимуляції ліпополісахаридами або інтерлейкіном-1 також можуть продукувати тканинний фактор. Його контакт з FVII призводить до утворення активного комплексу, який активує FX. Перша (I) фаза згортання закінчується формуванням протромбінази – комплексу FXa-FXIII-FVa-Ca⁺⁺FV (активується тромбіном). Цей комплекс є значно ефективнішим, порівняно з одним лише FXa, бо захищений від інгібування антитромбіном. Надалі процес згортання відбувається паралельно.

II фаза згортання. Протромбіназа призводить до перетворення протромбіну (FII) в активну форму – тромбін (FIIa). Тромбін – це фактично ключовий фермент системи згортання, і його функція не обмежується лише перетворенням фібриногену в фібрин. Він також активує чинники згортання крові V і VIII, фібриноліз та тромбоцити.

III фаза згортання. Процес утворення фібрину відбувається під дією тромбіну шляхом відщеплення від молекули фібриногену коротких пептидів. Фібриноген є високомолекулярним білком, що складається з поліпептидних ланцюгів 2α, 2β і 2γ. Спочатку від ланцюгів α від'єднуються фібринопептиди А, а від ланцюгів β – фібринопептиди В (розчинні фібрин-мономери – Is). Одночасно тромбін активує FXIII, який у присутності Ca⁺⁺ каталізує сполучення між собою фібрин-мономерів (через формування ковалентних зв'язків між ланцюгами γ) та утворення

нерозчинного фібрину-полімеру (Іі-гель) волокнисто-сітчастої структури – тромбу. Тривалість II і III фаз зсідання складає 2–5 с.

Після утворення фібринового згустку триває посткоагуляційна фаза (10–15 хв) – формування (консолідація) остаточного тромбу з його ретракцією за участю тромбостеніну тромбоцитів.

Інгібітори коагуляції. Надзвичайно важлива роль у пригніченні постійного тромбоутворення і регуляції процесу згортання крові належить природним інгібіторам коагуляції – антикоагулянтам, які можуть впливати практично на всі етапи тромбіногенезу. З усіх антикоагулянтів найбільше значення належить АТ III, який зв'язує тромбін у співвідношенні 1:1. Його ефективність потенціюється в присутності негативно заряджених глікозаміногліканів, таких як гепарансульфат, який знаходиться на поверхні ендотеліальних клітин. Суттєва роль в інактивації Va і VIII чинників належить протеїну С, що активується тромбіном, коли той зв'язується з тромбомодуліном на цитомембрані ендотеліоцитів. Протеїн С також пригнічує інгібітор активатора плазміногену (РАІ-1), чим посилює фібриноліз.

Фібриноліз. Функціонування системи згортання крові нерозривно пов'язане з системою фібринолізу (плазміну), основною функцією якої є розчинення фібрину і запобігання його надмірному утворенню. Процес фібринолізу також можна умовно розділити на два етапи.

1. *Активація плазміногену (P)* – його перехід з неактивної форми в активну – плазмін (Pa). Цей процес також умовно поділяють на два шляхи: «внутрішній» – внаслідок активації калікреїном, XIIa, XIa, які реалізують «реакцію контакту»; «зовнішній» – за ендогенної (t-РА, u-РА, протеази лізосом) або екзогенної (стрептокіназа, стафілокіназа) активації.

2. *Розчинення фібрину.* Плазмін розщеплює фібрин на окремі невеликі фрагменти – продукти деградації фібрину з різною молекулярною масою. Попри лізис фібриногену і фібрину плазмін здатний викликати протеоліз ФV, фактора Віллебранда, ФXI, ФXII, ФXIII, глікопротеїнів тромбоцитарної мембрани.

Фібриноліз пригнічується інгібіторами, які поділяються на антиплазміни та інгібітори активаторів плазміногену. Слід зазначити, що фактично системи згортання та фібринолізу є нерозривними ланками коагуляційного гомеостазу. Вони функціонують кооперативно, взаємодіючи та взаємодоповнюючи одна одну, що спрямоване не тільки на запобігання розвитку геморагічних і тромботичних ускладнень у нормі та патології, але й забезпечення практично всіх функцій організму: трофічних, компенсаторних, адаптаційних, регенераторних.

Література: [83, С. 219–256].

13.2. Лабораторний посуд та його підготовка до гемостазологічних досліджень

Для проведення гемостазологічних досліджень використовується наступний посуд: пробірки звичайні скляні (8×50, 16×160) та центрифужні, мірні колби, циліндри, стакани (50, 100, 250, 500 мл), чашки Петрі, скляні палички, поліетиленові пробірки з пробками та без них (5, 10, 15, 20 мл), мікропробірки типу Епендорф (1; 1,5; 2 мл), автоматичні піпетки зі змінним наконечником (0,01; 0,02; 0,05; 0,1; 0,2; 0,5; 1 мл).

Чистота лабораторного посуду та правильність його обробки визначають точність досліджень та їх відтворюваність. Скляні пробірки мають бути обов'язково силіконізовані. Силіконізований посуд у подальшому не може бути використаний як несиліконізований. Його повторно силіконізують після використання. Посуд необхідно відмивати від крові, плазми та реактивів спочатку в теплій проточній воді з додаванням 0,5% мийних засобів. Новий та використаний у дослідженнях посуд не рекомендується мити сумішшю сульфатної кислоти та двохромовоокислого калію, металічними щітками та йоржами. Для цього слід використовувати дерев'яні палички з намотаними на них ватою чи марлею. Після миття скляний посуд слід замочити на 12–24 год в розчині синтетичних мийних засобів, потім промити не менше 3–5 разів у проточній водопровідній воді та 4–5 разів – у дистильованій. Після цього поставити до сушильної шафи на 2–3 год за температури 100–120°C.

Силіконування посуду проводять обов'язково у витяжній шафі. Сухий та чистий посуд заповнюють 5 або 10% розчином дихлорметилсилану або трихлорметилсилану в толуолі на 10–15 хв. Зливають розчин та висушують посуд за температури 180–200° С. Силіконування проводять повторно після кожного використання посуду.

13.3. Забір крові та отримання плазми

Лише ретельне і суворе дотримання правил взяття крові та її підготовки для дослідження дає можливість правильно встановити зрушення гемокоагуляції. Для гемостазологічних досліджень використовується венозна кров. Кров з вени слід брати голкою з широким просвітом, краще без шприца у пробірку з антикоагулянтном (цитрат натрію 3,8%) з розрахунку 1:9. Голка має бути сухою та силіконізованою. Використовувати шприц для взяття крові необхідно у дрібних тварин та тварин у термінальному стані за зниження кров'яного тиску. Шприц має

бути силіконізованим або поліетиленовим та містити антикоагулянт (цитрат натрію 3,8%) із розрахунку 1:9. Необхідно максимально обмежити вплив на гемокоагуляцію наслідків накладання джгута та проколу вени. Тому після накладання джгута та проколу вени голкою перші 0,5–1 мл не можна використовувати для гемостазологічних досліджень. Для повного виключення впливу на гемокоагуляцію наслідків венозного застою після накладання джгута потрібно під час взяття перших порцій крові злегка його послабити на 2–3 с. Якщо кров витікає повільно (час взяття крові не має перевищувати 25–35 с), слід використовувати силіконізовані або поліетиленові пробірки та шприци з антикоагулянтом (цитрат натрію 3,8%) з розрахунку 1:9.

Незважаючи на наявність антикоагулянту у взятій крові, якщо були порушені правила її забору, утворюються згустки, іноді кров згортається повністю. Такі проби не можуть використовуватися для проведення досліджень. Для оцінювання якості взятої крові необхідно після отримання плазми вилити еритроцитарну суспензію та подивитися чи немає в ній ниток фібрину та згустків.

Для отримання плазми цитратну кров центрифугують у силіконізованих або поліетиленових пробірках відразу після забору в лабораторній центрифугі типу ОПн-3УХЛ4.2, ОПн-8УХЛ4.2 за 3000 об/хв, протягом 15 хв. Після центрифугування плазму відбирають за допомогою автоматичної піпетки об'ємом 1 мл та вміщують у мікропробірки. Дослідження плазми починають відразу. У разі потреби допускається зберігання плазми замороженою за -20°C .

Література: [83, С. 13–84, 85–174].

13.4. Визначення адгезивно-агрегаційної активності тромбоцитів (кількісний метод із використанням ФЕК за М.А. Howard)

1. Венозну кров змішують з 3,8% розчином 5-водного тринатрію цитрату в співвідношенні 9:1 і готують багату на тромбоцити плазму (БТП). Її отримують центрифугуванням крові за 1000 об/хв протягом 8–10 хв, бідну – за 3000 об/хв упродовж 15 хв. Контроль кількості тромбоцитів у БТП проводять підрахунком їх кількості у камері з сіткою Горяєва за допомогою фазово-контрастної мікроскопії.

2. Досліджувану БТП в кількості 1 мл вносять у кювету ФЕК з довжиною оптичного шляху 3 мм та вимірюють оптичну густину за довжини хвилі 500–560 нм (зелений світлофільтр) проти дистильованої води.

3. Переливають плазму з кювети у пробірку, прогрівають за температури 37° С та постійного перемішування (магнітна мішалка з підігрівом).

4. Через 1 хв вносять у пробірку розчин активатора в кількості: колаген та ристоцетин по 0,05 мл, АДФ – 0,1 мл і одночасно включають секундомір.

5. Через 1, 3, 6 та 10 хв інкубації вимірюють оптичну густину досліджуваної плазми.

6. Визначають оптичну густину досліджуваної бідної на тромбоцити плазми (БіТП).

7. Визначають сумарний індекс агрегації тромбоцитів (СІАТ) за формулою:

$$СІАТ = \frac{E_1 - E_2}{E_1 - E} \times 100\%,$$

де: E – оптична густина БіТП в одиницях оптичної густини; E_1 – оптична густина БТП до агрегації; E_2 – оптична густина БТП після повної агрегації (припиняється змінюватися оптична густина).

Розраховують швидкість агрегації тромбоцитів (ШАТ) за формулою:

$$ШАТ = \frac{E_1 - E_2}{t} \times 100\%,$$

де: E_1 – оптична густина БТП до агрегації; E_2 – оптична густина БТП після агрегації; t – час, за який відбулося максимальне зниження оптичної густини у хвиликах.

Розраховують індекс дезагрегації тромбоцитів (ІДТ) за формулою:

$$ІДТ = \frac{E_3 - E_2}{E_3} \times 100\%,$$

де: E_3 – максимальна оптична густина БТП, виміряна через 10 хв після агрегації; E_2 – оптична густина БТП після повної агрегації, яка визначається за стабільністю оптичної густини, в одиницях оптичної густини.

Оцінювання результатів аналізу. Зниження СІАТ спостерігається у випадку функціональної неповноцінності тромбоцитів уродженого чи набутого характеру, у тому числі за ДВЗ-синдрому. Підвищення СІАТ буває за патологічних станів запальної природи, що характеризуються схильністю до тромбоутворення.

У нормі у собак та свиней встановлено межі коливань сумарного індексу агрегації тромбоцитів:

Фізіологічні показники СІАТ у собак та свиней

	АДФ, %		Колаген, %		Ристоцетин, %	
	собаки	свині	собаки	свині	собаки	свині
min	41,4	55,4	56,4	71,3	11,6	0
max	96,8	88,3	97,7	87,7	50,0	0

Література: [83, С. 13–84].

13.5. Визначення концентрації фібриногену в плазмі крові (Беліцер В.О., Варецька Т.В., Веремеєнко К.М. та ін., 1997)

Принцип методу. Метод оснований на ферментативному перетворенні фібриногену в фібрин за допомогою тромбіну за наявності іонів кальцію та моноіодоцтової кислоти, яка попереджує стабілізацію фібрину фактором XIII. Наявність іонів кальцію сприяє швидкому та повному перетворенню фібриногену в фібрин, а завдяки моноіодоцтової кислоті еліміновано утримання згустком частини сироваткових білків та полегшено його розчинення.

Обладнання: термостат, спектрофотометр (СФ-46).

Реактиви та матеріали: фосфатний буфер /0,06М/ рН 7,0. Основний розчин – 190 мл 0,5 М K_2HPO_4 (ч.д.а) і 110 мл 0,5 н натрію гідроксиду (ч.д.а). Для отримання робочого розчину 20 мл основного буферного довести до 100 мл дистильованою водою; 0,15 М розчин натрію хлориду (ч.д.а); 0,04 М розчин моноіодоцтової кислоти. Готують на 0,06 М фосфатному буфері: 40 мг моноіодоцтової кислоти розчиняють у 5 мл буфера; тромбін (1000 од/мг). Розчин готують безпосередньо перед роботою – 10 мг тромбіну в 1 мл 0,15 М розчину натрію хлориду ставлять на 15–30 хв у холодильник, температура 2–4° С. Потім центрифугують 5 хв за 2000–3000 об/хв. Використовують прозорий розчин.

Хід визначення. До 0,2 мл плазми додають 1,6 мл 0,06 М фосфатного буфера. Суміш поміщають у термостат за 37° С. Через 1–2 хв додають у суміш 0,1 мл 0,04 М розчину моноіодоцтової кислоти. Через 3 хв додають 0,1 мл тромбіну. У разі використання препаратів тромбіну, що не містять кальцію, у пробу перед додаванням тромбіну вносять 0,1 мл 0,02 М хлориду кальцію. Добре перемішують паличкою та інкубують не менше 15 хв за 37° С.

Намотують згусток на паличку і промивають два рази водою і 0,15 М розчином натрію хлориду та просушують. Згусток розчиняють у

5 мл 1,5% розчину оцтової кислоти та визначають оптичну щільність за 2-х довжинах хвиль: 280 і 320 нм. Екстинція стійка. Контроль – 1,5% оцтова кислота.

Розрахунки проводять за формулою:

$$X = \frac{\Delta E \times 255}{15,067}$$

де X – концентрація фібриногену, г/л; ΔE – різниця величин екстинцій, отриманих при 280 і 320 нм; 255 – коефіцієнт для вираження в г/л кількості фібриногену під час аналізу, виконаного в 0,2 мл плазми, з урахуванням поправки для його знаходження за фактичним аналізом розчину фібрину; 15,067 – коефіцієнт екстинції для фібриногену в кислому середовищі за довжини хвилі 280 нм.

Діагностичне значення. Фібриноген – розчинний попередник полімерного фібрину. Фібриноген відомий як білок гострої фази. В організмі фібриноген синтезується, головним чином, у клітинах паренхіми печінки. Гіперфібриногенемія у тварин розвивається на фоні інтенсивних місцевих і загальних ознак хірургічної інфекції. Швидке збільшення концентрації фібриногену в разі запальних процесів переважно зумовлено прискоренням його біосинтезу. У клінічній практиці рівень фібриногену слугує для оцінювання гостроти запального процесу. Гіпофібриногенемія може відбуватися через накопичення у плазмі розчинного фібрину та розщеплення фібриногену плазміном. Гіпо- та афібриногенемія бувають уродженими й набутими. Їх виникнення є одним із свідчень розвитку коагулопатії споживання, неповноцінності первинного фібринового бар'єра і тяжких порушень функції печінки. У нормі його концентрація в плазмі крові собак – 2,13–3,29 г/л; свиней – 1,4–4,7; великої рогатої худоби – 2,35–5,26; коня – 2,5–4,5 г/л.

Література: [35, С. 53–55].

13.6. Визначення продуктів розщеплення фібриногену/фібрину (ПРФ) методом затримки полімеризації мономерного фібрину (Беліцер В.О., Варецька Т.В., Єна Я.М., 1987)

Принцип методу. Метод оснований на аналізі часу полімеризації препарату “мономерний фібрин” за наявності дослідної плазми. ПРФ є вторинними антикоагулянтами, вони гальмують утворення фібринового згустку. Ступінь подовження часу формування згустку прямо пропорційний концентрації ПРФ.

Обладнання: термостат, спектрофотометр (СФ-46).

Реактиви та матеріали: вихідний 0,05 М ТРІС-НСІ-буфер рН 7,5 (0,606 г тріс-оксиметиламінометану розчиняють у 25 мл дистильованої води, додають 40 мл 0,1 М хлоридної кислоти (ч.д.а) та 0,935 г натрію хлориду (ч.д.а) й доводять до 100 мл дистильованою водою); робочий буфер готують, розчиняючи у 85 мл ТРІС-НСІ-буферного розчину 4 мг соєвого інгібітору трипсину, і додають 0,83 мл 0,025 М розчину кальцію хлориду. Робочий буфер зберігають у холодильнику, використовують протягом 7–10 днів; розчин мономерного фібрину готують таким чином: згусток фібрину розчиняють у 0,02 М розчині оцтової кислоти за температури 5° С. Зберігають у холодильнику, використовують протягом 1–1,5 міс.; соєвий інгібітор трипсину фірми “Реанал” (Угорщина) розчиняють у вихідному 0,05 М ТРІС-НСІ-буфері; 0,025% розчин кальцію хлориду.

Хід визначення. У плазмі, що досліджується, визначають вміст фібриногену спектрофотометричним методом. Плазму розчиняють ТРІС-НСІ-буферним розчином так, щоб у зразку вміст фібриногену становив 1,5 г/л. Далі визначають час зсідання мономерного фібрину. Для цього в пробірку діаметром 14–16 мм, висотою 110–120 мм вносять 1,8 мл робочого буфера та 0,1 мл вихідного ТРІС-НСІ-буферного розчину і поміщають її в термостат за температури 37° С. Після нагрівання вносять 0,1 мл 0,5% розчину мономерного фібрину, який швидко додають мікропіпеткою або автоматичним дозатором. Проводять візуальне спостереження у термостаті і відмічають час появи перших видимих часток або згустку фібрину. Час зсідання мономерного фібрину становить 31–37 с, він є контролем.

Виконують таке саме вимірювання, але замість вихідного буферного розчину в пробу вносять 0,1 мл зразка розчиненої плазми та визначають час зсідання. У плазмі, що не містить ПРФ, час зсідання близький до контрольного. На підставі отриманих величин часу зсідання в контрольній пробі і зразках плазми розраховують гальмівний коефіцієнт за формулою:

$$\frac{t - t_0}{t_0},$$

де t_0 – час зсідання у контрольній пробі, с; t – час зсідання у дослідній пробі, с.

За гальмівним ефектом знаходять концентрацію ПРФ. Залежність гальмівного ефекту від концентрації ПРФ наступна:

Гальмівний ефект	Концентрація ПРФ (мкг/мл)
0,3	>10
0,8	>20
1,4	>30
>2	<40

Діагностичне значення. Продукти розщеплення фібриногену/фібрину – продукти плазмінового протеолізу фібриногену і/або фібрину, які з'являються в плазмі як за геморагій, так і тромбозів. Визначення ПРФ має велике значення для оцінювання фібринолізу і фібриногенолізу, ранньої діагностики змін фібринолітичної активності, станів ДВЗ-синдромів, диференціації первинного та вторинного фібринолізу. У клінічно здорових тварин ПРФ відсутні.

Література: [3, С. 51–57].

13.7. Визначення розчинного фібрину (РФ) шляхом осадження за допомогою фосфатного буфера (Варецька Т.В., Михайловська Л.І., Світальська Л.О., Єна Я.М., 1992)

Принцип методу. В основі методу лежить підвищена здатність РФ до висолювання. Фосфатним буфером осаджується лише фібрин, характер осаду залежить від його кількості і під час візуального спостереження можна кількісно оцінити результати аналізу.

Обладнання: центрифуга, спектрофотометр (СФ-46).

Реактиви та матеріали: 0,1 М фосфатний буфер рН 7,5, іонної сили 0,2, який вміщує ϵ -амінокапронову кислоту і натрію цитрат у концентрації 0,2 та 0,1%. Для приготування 100 мл буфера 1,36 г $\text{K}_2\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_7$ (ч.д.а) розчиняють у 70–80 мл дистильованої води, додають 9 мл 0,1 М NaOH (ч.д.а) і 0,38 г NaCl (ч.д.а), 0,2 г ϵ -амінокапронової кислоти і 0,1 г натрію цитрату, ретельно перемішують, доводять об'єм до 100 мл дистильованою водою і знову перемішують; 1М фосфатний буфер рН 7,5 (200 мл): 27,22 г $\text{K}_2\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_7$ (ч.д.а) розчиняють приблизно в 170 мл дистильованої води, додають 10,8 мл 14 М NaOH (ч.д.а), рН перевіряють на рН-метрі, доводять об'єм до 200 мл дистильованою водою, перемішують.

Хід визначення. У конічні центрифужні пробірки з 0,25 мл дослідної плазми додають 0,25 мл 0,1 М фосфатного буфера, ретельно перемішують. Додають 0,4 мл 1 М фосфатного буфера, перемішують і залишають на 30 хв при 22 °С. Результати оцінюють візуально: відсутність видимого помутніння – негативний результат (–), чітко виражене помутніння – позитивний (+), пластівцеподібна муть (++) , пластівці, нитки (+++), желеподібний осад (++++). Для кількісного оцінювання осад відділяють центрифугуванням, надосадову рідину зливають. Осад двічі промивають 0,15 М NaCl з наступним центрифугуванням. Після останнього центрифугування зливають надосадову рідину, пробірки перевертають на

фільтрувальний папір і дають стекти впродовж декількох хвилин. Осад розчиняють в 3 мл 1,5–2% розчину оцтової кислоти. Кількість білка визначають спектрофотометрично. Екстинкцію вимірюють за довжини хвилі 280 і 320 нм. Кількість РФ (мг/100 мл) визначають за формулою:

$$C = \frac{\Delta E}{\varepsilon} \times \frac{V^1}{V} \times \frac{1000}{K},$$

де K – коефіцієнт, який виражає відношення кількості білка в осаді до кількості РФ (2,9); V – об'єм дослідної плазми (0,5 мл); V^1 – об'єм спектрофотометричного розчину (3 мл); $\Delta E = E_{280} - E_{320}$; ε – коефіцієнт екстинкції фібриногену (фібрину) в кислому середовищі (15,06).

Коефіцієнт ($K=2,9$) в такому разі не вводиться, оскільки в осаді міститься лише фібрин. За кількісного оцінювання бажано збільшити об'єм дослідної плазми до 0,5 – 1 мл з відповідним збільшенням розчинів для отримання осаду. Кількість РФ у клінічно здорових собак становить 0–0,02 мг/100 мл; у великої рогатої худоби – 0–12,7 мг/100 мл; у свиней РФ відсутній.

Діагностичне значення. Багато захворювань супроводжуються активацією згортання крові, що призводить до генерації тромбіну, під дією якого з фібриногену утворюється мономерний фібрин. Останній може циркулювати в крові у мономерній формі, формі олігомерів або у вигляді комплексів з фібриногеном. Всі ці форми фібрину називають розчинним фібрином (РФ). Поява в крові РФ є показником активації згортання крові, а отже й показником можливого настання розсіяного внутрішньосудинного згортання або тромбозу. Своєчасне виявлення і кількісне визначення РФ необхідне як для ранньої діагностики ДВЗ-синдрому, так і контролю ефективності терапевтичних заходів.

Література: [70].

13.8. Визначення тромбінового часу (ТЧ) (за уніфікованим методом)

Принцип методу. Метод оснований на здатності тромбіну індукувати перетворення фібриногену в фібрин без участі інших факторів згортання крові. Тромбіновий час дозволяє оцінювати кінцевий етап згортання – перетворення фібриногену в фібрин з наступною його полімеризацією.

Обладнання: водяна баня.

Реактиви та матеріали: цитратна плазма крові; робочий розчин тромбіну (готується з сухого препарату тромбіну так, щоб його концентрація в розчині була 10 од/мл і 0,1 мл цього розчину викликав згортання 0,2 мл донорської плазми за 11–15 с).

Хід визначення. У скляну конічну пробірку мікропіпеткою вносять 0,2 мл плазми, що досліджується, інкубують 1 хв у водяній бані за 37° С та додають 0,1 мл робочого розчину тромбіну; візуально заміряють час зсідання плазми, помірно струшуючи пробірку у водяній бані.

Діагностичне значення. ТЧ може подовжуватися за гіпофібриногенемії, наявності в крові гепарину, ПРФ, інгібіторів тромбіну, самозбирання фібрину. У ході активації системи згортання ТЧ може скорочуватись.

Література: [77].

13.9. Визначення протромбінового часу (ПЧ) (за уніфікованим методом)

Принцип методу. Це функціональний тест, що моделює *in vitro* зовнішній шлях згортання крові. Цей час є результатом утворення комплексу тканинного фактора – тромбопластину з фактором VII і безпосередньої активації фактора X, таким чином минаючи внутрішній шлях згортання крові.

Обладнання: водяна баня, центрифуга.

Реактиви та матеріали: цитратна плазма крові; 0,025 М розчин CaCl₂; реагент тромбопластин.

Хід визначення. Реагент тромбопластин готують з розрахунку 10 мг тромбопластину на 1 мл дистильованої води, інкубують 30 хв за 37° С, центрифугують 5 хв за 3000 об/хв, використовують надосадову рідину. У скляну конічну пробірку вносять 0,1 мл реагента тромбопластину та 0,1 мл розчину кальцію хлориду, прогрівають 1 хв за 37° С, потім додають 0,1 мл плазми, що досліджується, та візуально заміряють час згортання плазми, помірно струшуючи пробірку у водяній бані. Оскільки результат визначення ПЧ залежить від активності тромбопластину, то вираховують протромбіновий індекс (ПІ). Це відношення ПЧ пулу нормальної плазми (с) до ПЧ дослідної плазми (с), виражене у відсотках.

Діагностичне значення. ПЧ є тестом, який дає можливість виявити наявність порушень системи згортання крові, всіх її факторів, виключаючи фактор XIII. Норма ПЧ, с: у собак 11,9–16,6; свиней – 15,3–32,2; великої рогатої худоби – 19,6–33,7. ПЧ дозволяє оцінювати зовнішній і “загальний” шлях згортання крові, а саме злиття внутрішнього та зовнішнього шляхів – на факторі X і перетворення протромбіну в тромбін. ПЧ подовжується (протромбіновий індекс – відношення ПЧ донорської плазми до ПЧ досліджуваної плазми –

зменшується) за дефіциту плазмових факторів II, V, VII, X; за наявності інгібіторів цих факторів або під час лікування антикоагулянтами прямої та непрямой дії, за хвороб печінки, дефіциту вітаміну K. Тест є найбільш чутливим до дефіциту факторів VII та X; він може також подовжуватися за вмісту фібриногену в плазмі крові менше 1 г/л. ПЧ і протромбіновий індекс (норма 90–105%) застосовуються для контролю лікування непрямыми антикоагулянтами.

Література: [77].

13.10. Визначення активності фактора XIII (за уніфікованим методом)

Принцип методу. Визначається час розчинення згустку плазми в розчині щавлевокислої сечовини після інкубації плазми з моноіодоцтовою кислотою, яка блокує активність фактора XIII. Час розчинення згустка залежить від активності фактора XIII досліджуваної плазми.

Реактиви та матеріали: 0,025 М розчин CaCl₂; Моноіодоцтова кислота 0,5%; щавлевокисла сечовина 0,12%.

Хід визначення. До 0,1 мл досліджуваної цитратної плазми додають 0,1 мл розчину моноіодоцтової кислоти і 0,2 мл розчину хлориду кальцію. Перемішують вміст пробірки струшуванням і залишають за кімнатної температури на 20 хв. До згустку, що утворився, додають 1 мл розчину щавлевокислої сечовини. Пробірку легко струшують (приблизно 1 раз на секунду) і визначають час повного розсмоктування згустка фібрину. Активність фактора XIII у досліджуваній плазмі визначають за формулою:

$$A_{\phi XIII} = A / B \times 100\%,$$

де *A* – час лізису згустку досліджуваної плазми; *B* – час лізису згустка нормальної плазми.

Діагностичне значення. Фактор ФХІІІ стабілізує структуру фібрину, каталізуючи утворення ізопептидних зв'язків між молекулами. Зменшення активності фактора XIII (фібриностабілізуючий фактор, фібриназа) спостерігається у хворих з його вродженим дефіцитом чи у зв'язку з використанням під час дисемінованого внутрішньосудинного згортання крові, за променевої хвороби, сепсису. У клінічно здорових собак його рівень становить 91,0–109,0%; свиней – 98,0–115,0; великої рогатої худоби – 94,0–116,0%.

Література: [77].

13.11. Визначення антитромбіну III у плазмі (за уніфікованим методом, набором Simko-LTD, Україна)

Принцип методу. Розведена цитратна плазма інкубується із стандартною кількістю тромбіну (частина тромбіну при цьому зв'язується з антитромбіном III), потім під час зсідання фібриногену визначається остаточна активність тромбіну.

Реагенти: 1) тромбін; 2) 0,15 М розчин NaCl; 3) фібриноген; 4) буфер, рН 7,6 (концентрований у 15 разів).

Підготовка до роботи

Підготовка робочого буферного розчину. Вміст флакона № 4 переносять у мірну посудину і доводять об'єм дистильованою водою до 150 мл. Зберігати до використання при +4 °С не більше 1 міс.

Підготовка плазми. Проба готується безпосередньо перед використанням. До 0,1 мл плазми додається 1,9 мл робочого буферного розчину. Стабільність розведеної плазми за +20° С не менше 4 год. Стабільність нерозведеної плазми: за +20° С – 10 год, +4° С – 24 год; – 10–20° С – 1 міс.

Підготовка розчину фібриногену. До вмісту флакона додають 5 мл дистильованої води, попередньо нагрітої до 37° С. Інтенсивно струшують флакон до утворення однорідної речовини. Допускається незначна кількість дрібних нерозчинних частинок. Розчин готують безпосередньо перед використанням і зберігають за кімнатної температури. Стабільність за +20° С – 2 год.

Підготовка розчину тромбіну. Вміст флакона № 1 розчиняють у 2 мл 0,15 М розчину NaCl. В отриманому маточному розчині активність тромбіну становить 50 од/мл. Із маточного розчину готують робочий розчин тромбіну з активністю 10 од/мл розчину (маточний розчин змішують з 0,15 М розчином NaCl у співвідношенні 1:4).

Тестують активність тромбіну: у пробірку з 0,2 мл цього розчину додають 0,1 мл буферного розчину і витримують суміш 2 хв за 37° С. Потім пробірку виймають із водяної бані, додають 0,45 мл розчину фібриногену (фібриноген не прогривають – див. 13.11. *Підготовка розчину фібриногену*) і секундоміром фіксують час утворення фібринового згустку. Пробірку струшують з періодичністю 1 раз за 1 с, нахилиючи її під кутом 90°.

Для набору серії 180104 час утворення згустку (контроль) має становити 12,5±0,5 с. У наборах різних серій він різний і знаходиться в межах 12 с.

Хід визначення. До 0,2 мл робочого розчину тромбіну додають 0,1 мл проби (плазми, розведеної в 20 разів). Суміш інкубують протягом 2 хв (точно!) за 37° С. Потім пробірку виймають з водяної бані, інтенсивно

струшують її декілька разів для рефракції утвореного згустку і додають 0,45 мл розчину фібриногену (*фібриноген не нагрівають*, температура кімнатна! – див. *Підготовка розчину фібриногену*) і одночасно вмикають секундомір. На фоні пучка світла настільної лампи фіксують час утворення фібринового згустку, який під час проведення тесту залежить від низки параметрів: діаметра пробірки, техніки і частоти струшування, температури. Для фіксації часу утворення фібринового згустку рекомендується нахилити пробірку під кутом 90° з частотою приблизно 1 раз у секунду. Оптимальний діаметр пробірки – 9 мм.

За попередньо побудованим калібрувальним графіком знаходять процентний уміст антитромбіну III.

У кожному флаконі розчину фібриногену перед використанням необхідно перевірити його згортальну здатність (див. *Тестування тромбіну*).

Побудова калібрувального графіка. Змішану цитратну плазму 10 здорових донорів розчиняють буфером в 40; 26,7; 20 і 16 разів, для чого в серію пробірок додають 0,05; 0,075; 0,1 і 0,125 мл плазми і доводять об'єм буфером до 2,0 мл за наступною схемою:

Розведення, разів	40	26,7	20	16
Об'єм плазми, мл	0,05	0,075	0,1	0,125
Об'єм робочого буферного розчину, мл	1,95	1,925	1,9	1,875

П р и м і т к а. Розведення у 20 разів дорівнює 100% активності антитромбіну III; у 40; 26,7 і 16 разів – 50, 75 і 125%.

У кожному із розведених зразків плазми визначають антитромбінову активність за часом зсідання фібрину (див. 13.11. *Хід визначення*). На міліметровому папері будують криву розведення, на осі ординат якої відкладають час згортання в секундах, а на осі абсцис – активність антитромбіну III у відсотках, залежно від приготовлених розведень. Результати визначень антитромбіну III у досліджуваній плазмі залежать від чіткості приготування розведень і побудови калібрувального графіка. Рівень АТIII 86–105% вважається нормальним.

Література: [83].

13.12. Визначення активності системи протеїну С плазми крові

Протизгортальна система протеїну С (Пр.С) включає в себе: тромбомодулін, протеїн С, протеїн S, тромбін як активатор протеїну С, інгібітор протеїну С. Кінцева дія системи Пр.С спрямована переважно на

інгібування факторів системи згортання крові – факторів VIII і Va, а також на інактивацію інгібітора тканинного активатора плазміногену – PAI-1.

Патологія у системі Пр.С виявляється здебільшого у вигляді його дефіцитів. Існують уроджені форми дефіциту, а також ті, що проявляються різноманітними тромбозами та набуті. Останні спостерігаються за патології печінки, гострих ДВЗ-синдромів, септичних станів, що суттєво погіршує перебіг основного захворювання і потребує медикаментозної та трансфузійної корекції.

Принцип методу. Активація ендogenous протеїну С відбувається під дією фракції отрути щитомордника (*Agkistrodon contortrix*), що подовжує час згортання плазми в тесті активованого часткового тромбопластинного часу (АЧТЧ).

Склад набору. 1) АЧТЧ-реагент; 2) АЧТЧ-реагент з активатором протеїну С; 3) плазма-калібратор; 4) 0,025 М розчин кальцію хлориду (5 мл).

Набір реактивів фірми “Ренам” (м. Москва).

Приготування реагентів системи протеїну С

1. АЧТЧ-реагент. У флакон 1 з АЧТЧ-реагентом внести 2 мл дистильованої води. Реагент готовий до проведення аналізу через 30 хв після розведення.

2. АЧТЧ-реагент з активатором протеїну С. У флакон 2 з АЧТЧ-реагентом з активатором внести 2 мл дистильованої води. Реагент готовий до проведення аналізу через 30 хв після розведення.

3. Розчин плазми-калібратора. У флакон 3 з плазмою-калібратором внести 1 мл дистильованої води, розчинити за обережного перемішування. Розчин готовий до проведення аналізу через 20 хв після розведення. У дослідженні активності Пр.С у тварин цей реагент не використовують, тому що для тварин окремих видів встановлено свій коефіцієнт, поданий нижче.

4. 0,025 М розчин кальцію хлориду – готовий реагент для проведення аналізу. Перед роботою прогріти за 37° С. Повторне прогрівання відкритого флакона не рекомендується.

Стабільність реагентів після розбавлення:

Реагенти	+2–8 °С	+18–22° С
АЧТЧ-реагент	7 діб	1 доба
АЧТЧ-реагент з активатором протеїну С	7 діб	1 доба

Отримання досліджуваної плазми для аналізу. Венозну кров беруть у пластикову чи скляну силіконізовану пробірку з 3,8% розчином цитрату натрію у співвідношенні 9:1 та центрифугують 15 хв за 3000 об/хв. Після центрифугування переносять плазму у пластикову пробірку. Термін зберігання досліджуваної плазми до аналізу за кімнатної температури – не більше 2 год, за +2–8° С – не більше 8 год. Допускається однократне заморожування плазми за температури – 20° С.

Проведення аналізу. Визначають час утворення згустку досліджуваної плазми у тесті АЧТЧ з активатором та без нього. Для цього в одній пробірці змішують 50 мкл досліджуваної плазми з АЧТЧ-реагентом з активованим Пр С, а в іншій – 50 мкл досліджуваної плазми з неактивованим АЧТЧ-реагентом та інкубують за 37° С протягом 3 хв. Після цього в обидві пробірки додають по 50 мкл 0,025 М розчину кальцію хлориду, попередньо прогрітого до 37° С та відмічають час утворення згустку.

Результати активності системи Пр.С прийнято виражати у вигляді нормалізованого відношення (НВ):

$$НВ = \frac{АЧТЧ\ актив}{АЧТЧ\ неактив} \times НВК,$$

де *НВК* – коефіцієнт нормалізованого відношення клінічно здорових тварин, який у собак становить 0,85, великої рогатої худоби – 0,83, свиней – 1,1.

Література: [83].

13.13. Визначення фібринолітичної активності плазми (метод фібринових пластин за Аструп)

Принцип методу полягає в нанесенні на стандартний шар фібрину еуглобулінового згустку плазми крові, який спричиняє його лізис внаслідок присутності в плазмі плазміну і тканинного активатора плазміногена.

Реактиви: 1) 0,3% розчин фібриногену в 0,85% розчині NaCl; 2) розчин бичачого тромбіну в 0,85% NaCl активністю 8–10 с (активність кожної серії комерційного препарату тромбіну вказана в інструкції); 3) медіналовий буфер рН 7,6.

Хід визначення: 1) приготування стандартних фібринових пластинок. У хімічному стаканчику обережно змішують (запобігаючи утворенню піни) 9 мл розчину фібриногену і 0,2 мл розчину тромбіну. Суміш одразу виливають в чашку Петрі із внутрішнім діаметром 10 см. Легкими нахилами чашки добиваються рівномірного розподілу рідини на її поверхні, після чого чашку ставлять на горизонтальну поверхню до повного зсідання фібриногена. Частина пластинок прогрівається за 85° С протягом 1 год для визначення плазмінової активності;

2) для отримання еуглобулінової фракції до 8 мл дистильованої води додають 0,15 мл 1% розчину оцтової кислоти і 0,5 мл досліджуваної плазми. Після 30 хв охолодження за 4° С еуглобуліни осаджують центрифугуванням за 1500 об/хв протягом 7 хв, надосадову рідину зливають, а пробірку осушують, перевертаючи її на фільтрувальний папір. Осад еуглобулінів розчиняють в 0,5 мл медіналового буфера рН 7,6;

3) нанесення матеріалу на фібринову пластинку. Для цього розчин еуглобулінів у об'ємі 0,03 мл наносять паралельно на поверхню прогрітої та непрогрітої пластинок. Чашки Петрі з фібриновими пластинами поміщають у термостат (37° С) на 24 год, після чого вимірюють два взаємно перпендикулярні діаметри кожної із зон лізису та проводять розрахунок їх площ за формулою:

$$S = \pi r^2,$$

де π – константа із значенням 3,14; r – радіус зон лізису;

4) оцінювання результатів. Величина площі зони лізису прямо пропорційна величині фібринолітичної активності дослідної проби. Причому, якщо лізувалась лише непрогріта пластинка, то в пробі міститься активатор плазміногена, якщо в однаковій мірі обидві пластинки (зони рівні) – то плазмін. Якщо зона лізису відмічається в обох пластинках, але на непрогрітій більша, ніж на прогрітій, то в пробі містяться обидві речовини, як плазмін, так і активатор плазміногена. При цьому зона лізису на прогрітій пластинці відповідає активності ферменту, на непрогрітій – сумарній активності ферменту та активатора проферменту. Активність останнього буде дорівнювати різниці між зонами лізису на непрогрітій і прогрітій пластинках.

Література: [9; 97].

РОЗДІЛ 14

ДОСЛІДЖЕННЯ МОЛОЗИВА*

14.1. Визначення відносної густини молозива

Густина – маса за 20° С, виражена в одиниці об'єму (кг/л).

Густина коров'ячого молока коливається від 1,027 до 1,032 (в окремих випадках – від 1,026 до 1,034), але для збірного молока в середньому вона вважається величиною сталою і становить 1,030.

Густина молозива високої якості коливається в межах від 1,050 до 1,060 кг/л і, за даними літератури, корелює з умістом у ньому імуноглобулінів. Вважається, що молозиво із густиною менше 1,050 кг/л не може забезпечити достатньо напруженого імунітету і, як наслідок, телята хворіють із симптомом діареї. Отже, молозиво низької густини не рекомендується використовувати для годівлі новонароджених телят, оскільки воно збіднене на колостральні імуноглобуліни.

Відносна густина молозива першого надою від клінічно здорових корів у літньо-осінній період коливається від 1,0654 до 1,0798 кг/л і в середньому становить $1,073 \pm 0,004$ кг/л. У зимово-весняний період відносна густина молозива першого надою майже на 7% менша – 1,0535–1,0744 кг/л ($1,068 \pm 0,003$) порівняно з молозивом літньо-осіннього періоду.

Для визначення густини молока (молозива) використовують прилад – ареометр (лактоденсиметр). Нижня частина приладу розширена – у ній знаходиться дріб для надання ареометру стійкого вертикального положення під час занурення його в молоко; у середній частині приладу знаходиться шкала з поділками, які показують дійсну густину молока (1,015; 1,030; 1,035 і т.д.); верхня частина ареометра закінчується шкалою термометра. Визначати густину молока можна лише за температури від 15 до 25° С з наступним перерахунком густини молока за 20° С. Густина молока слід визначати не раніше, як через 2 год після доїння: за цей час вивільняється частина газів, розчинених у свіжому молоці, жир із рідкого стану переходить у твердий. Густина тільки що видоєного молока нижча, ніж густина молока через кілька годин після доїння.

Перед дослідженням середні проби молока підігрівають до 30–40° С, перемішують і охолоджують до 20 ± 2 ° С.

Оскільки відомо, що густина молозива, особливо перших двох надоїв, значно вища, порівняно з молоком, перед дослідженням його слід

* Методи визначення вітамінів А і Е в молозиві наведені в розділі 11.

розвести у 2 рази дистильованою водою кімнатної температури (18–20° С).

Техніка визначення густини молозива

1) В циліндр по стінці наливають 200 мл добре перемішаного розбавленого вдвічі дистильованою водою молозива, після чого циліндр ставлять на рівну поверхню.

2) Чистий сухий ареометр повільно занурюють в циліндр з молозивом і залишають його в спокої на 1–2 хв. Ареометр не повинен торкатися стінок циліндра, оскільки це вплине на кінцевий результат. Між ареометром і стінками циліндра має бути відстань не менше 0,5 см.

3) Знімають два показники: один – за верхньою шкалою приладу, яка показує температуру молозива, другий – за нижньою (відносна густина). Температуру враховують з точністю до 0,5° С. Під час зняття показників очі дослідника мають бути на рівні меніска молока. Показник густини враховують за верхнім меніском молозива з точністю до половини найменшої поділки шкали. Якщо під час дослідження температура молозива 20° С, то фактична густина його відповідає знятому на ареометрі показнику. Якщо температура вища або нижча 20° С, то на кожний градус відхилення від 20° С використовують поправку $\pm 2^\circ$ ареометра. За температури нижче 20° С поправку беруть зі знаком мінус.

Приклад. Температура молозива згідно із шкалою ареометра – 16° С, густина – 1,0295 (або 29,5° А). Поправка на температуру: $20-16 = 4^\circ$; $4 \times 0,2 = 0,8$. Густина молозива з поправкою становить: $29,5 - 0,8 = 28,7^\circ$ А, або 1,0287 кг/л. Проте, оскільки молозиво перед дослідженням розбавляли вдвічі дистильованою водою, то: $1,0287 \times 2 = 1,0574$ кг/л.

Література: [47].

14.2. Визначення кислотності молозива

Титрована кислотність свіжого молока становить 16–18° Т й зумовлена кислотним характером казеїну, наявністю в ньому фосфорнокислих, лимоннокислих солей і розчиненої в молоці карбонатної кислоти. Через деякий час після доїння внаслідок розвитку мікроорганізмів, які зброджують молочний цукор, у молоці накопичується молочна кислота, внаслідок чого титрована кислотність такого молока підвищується.

Молозиво відрізняється від молока значно вищою кислотністю. За даними літератури, кислотність першого молозива має становити

50–60° T, що створює, на думку окремих авторів, у шлунково-кишковому каналі новонароджених телят несприятливе середовище для розвитку гнильної та умовно-патогенної мікрофлори.

Щодо впливу кислотності молозива на стан здоров'я новонароджених телят дані літератури суперечливі й неоднозначні. Так, багато авторів стверджують, що нормальна кислотність молозива становить майже 50° T, а загибель телят, які споживали молозиво кислотністю до 60° T, збільшувалася утричі. Інші ж, навпаки: телята, отримані від корів із високою кислотністю молозива (60° T), не хворіли з синдромом діареї, а якщо й хворіли, то досить пізно і перебіг хвороби був значно легшим, ніж у телят, яким випоювали молозиво з кислотністю до 50° T.

Встановлено, що найбільш цінним щодо захисту є молозиво клінічно здорових корів першого надою, оскільки висока кислотність його (50–56° T) створює у шлунково-кишковому каналі новонароджених телят несприятливе середовище для гнильної та умовно-патогенної мікрофлори. Свідченням цьому є низька захворюваність і практично відсутня летальність новонародженого молодняку, одержаного від таких корів (Безух В.М., 1998) [2].

Кислотність молозива залежить від структури раціону і корелює зі вмістом у ньому загального білка.

Література: [47].

Титриметричний метод визначення кислотності молозива Приготування 0,1 н. розчину NaOH із фіксаналу

Ампулу з фіксаналом промивають іззовні і споліскують дистильованою водою. У горло мірної колби на 1 л вставляють лійку, в отвір якої поміщають бойок наконечником вгору. Одним кінцем ампули ударяють у бойок. Не відхиляючи ампули від лійки, пробивають другим бойком протилежний її бік. Після цього багаторазово промивають ампулу дистильованою водою, вода має стекти в колбу. Розмішують вміст колби, доливають до мітки дистильованою водою і знову перемішують.

Техніка визначення

1. У колбу ємністю 100 мл відміряють 5 мл дослідного молозива і 20 мл дистильованої води. Воду додають для того, щоб чіткіше розгледіти рожевий відтінок під час титрування. У суміш додають 3 краплі 1% спиртового розчину фенолфталеїну й перемішують.

2. З бюретки краплями додають у колбу за постійного перемішування 0,1 н розчин натрію гідроксиду до появи слабо-рожевого забарвлення, яке не зникає протягом 1 хв.

3. Відраховують кількість мілілітрів лугу, витраченого на титрування 5 мл молозива.

4. Для визначення кислотності молозива в умовних градусах кількість мл лугу, витраченого на титрування 5 мл молозива, слід помножити на 20, тобто зробити перерахунок на 100 мл молозива.

Приклад. На титрування 5 мл молозива пішло 2,4 мл 0,1 н розчину NaOH. Тому $2,4 \times 20 = 48^\circ \text{T}$.

П р и м і т к а. В окремих випадках для титрування беруть більшу кількість молозива (залежно від густини – 10 чи 20 мл), проте перерахунок завжди проводять на 100 частин молозива.

Слід пам'ятати, що в разі розведення молока чи молозива водою кислотність їх зменшується внаслідок часткового гідролізу присутніх у них солей.

Література: [47; 60, С. 253–254].

14.3. Отримання сироватки молозива

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

Знежирене молозиво розводять у 2–4 рази дистильованою водою і додають до нього краплями 10% розчин оцтової кислоти до повного згортання казеїну. Отриману сироватку фільтрують через паперовий фільтр або знову центрифугують за 3000 об/хв протягом 5–10 хв для осадження казеїну.

14.4. Визначення загальної кількості імуноглобулінів у сироватці молозива

Принцип методу. У процесі взаємодії сироватки молозива, яка містить імуноглобуліни, із розчином натрію сульфату (цинку сульфату),

змінюється структура білкових молекул і розчин мутніє. Інтенсивність помутніння розчину пропорційна концентрації в ньому Ig.

Методика визначення. У дві пробірки вносять по 3,8 мл 18% розчину натрію сульфату і додають по 0,1 мл дослідної сироватки молозива. Вміст пробірок фотометрують на КФК-2 або КФК-3 за довжини хвилі 400 нм у кюветі з робочою товщиною 5 мм. Контролем є 18% розчин натрію сульфату (табл. 14.1).

Із отриманих результатів із двох пробірок визначають середній показник. Якщо оптична щільність розчину вища за 1,3–1,5, то сироватку молозива слід розвести ізотонічним розчином натрію хлориду у 2–3 рази і повторити вимірювання. Кінцеві результати множать на ступінь розведення молозива.

Таблиця 14.1

Визначення загальної кількості імуноглобулінів у сироватці молозива

Оптична густина	Вміст Ig, г/л	Оптична густина	Вміст Ig, г/л	Оптична густина	Вміст Ig, г/л
0,1	2,28	0,185	4,61	0,8	17,8
0,11	2,6	0,19	4,72	0,85	19,0
0,12	2,92	0,195	4,83	0,9	20,2
0,125	3,03	0,2	4,94	0,95	21,2
0,13	3,14	0,25	5,8	1,0	22,3
0,135	3,37	0,3	6,8	1,05	23,4
0,14	3,6	0,35	8,0	1,1	24,6
0,145	3,7	0,4	9,0	1,15	25,8
0,15	3,8	0,45	10,0	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	0,7	15,8	1,45	32,3
0,18	4,5	0,75	16,8	1,5	33,4

Імуноглобуліни молозива становлять основну частину білка, тому їх кількість у молозиві є основним критерієм його якості. Залежно від цього молозиво може бути високої, середньої і низької якості. За даними

літератури [2] молозиво високої якості містить не менше 60 г Ig в 1 л, середньої – 50–21 і низької – менше 21 г/л [2, 29].

За результатами досліджень вміст Ig у першому молозиві коливається в межах від 42,8 до 68,6 г/л і в 52,6% корів Ig більше 50 г/л, тобто кількості, яка вважається за оптимальну і молозиво за таким показником належить до якісного. Результати інших досліджень [2] не підтверджують ці дані, адже, як було встановлено, оптимальний вміст Ig у якісному молозиві має становити не менше 60 г/л.

Література: [2; 29; 60, С. 254–256].

14.5. Визначення вмісту загального білка у сироватці молозива

Вміст загального білка у сироватці молозива визначають за допомогою рефрактометра. Для цього спочатку слід перевірити нульову точку приладу, для чого 1–2 краплі дистильованої води наносять на поліровану поверхню вимірювальної призми. Межа світла й тіні має знаходитися на візирній лінії і проходити через позначку 1,3330 шкали приладу. Потім призму витирають і на неї наносять 1–2 краплі сироватки молозива (перед дослідженням молозиво розводять удвічі). Межа світла й тіні зміщується. Візирні лінії знову підводять під цю цифру на межу і знаходять рефрактометрі. Після цього дані множать на кратність розведення молозива і отримують вміст загального білка у сироватці молозива (г/л).

За результатами досліджень встановлено, що у 66% клінічно здорових корів вміст білка у першому молозиві має бути в межах 160–200 г/л, він тісно корелює з кислотністю молозива ($r = +0,73...+0,91$) та вмістом Ig – коефіцієнт кореляції між цими показниками у першому молозиві становить +0,7. Проте, незважаючи на таку корелятивну залежність між вмістом білка та Ig у молозиві, за високим рівнем білка у молозиві, а значить й Ig, не можна прогнозувати доброго здоров'я новонароджених телят, адже в такому разі важливі й інші фактори, зокрема своєчасність напування телят першим молозивом, ефективність абсорбції білків молозива у кишечнику телят тощо. Однак не викликає сумніву те, що високий вміст білка знаходиться у молозиві високої якості і є одним із факторів, який забезпечує оптимальний рівень неспецифічної резистентності телят.

Література: [4, С. 8–9].

14.6. Визначення в молозиві (молоці) кетонових тіл

Це дослідження проводять у пробах молозива після його знежирювання (згідно з п. 14.3).

Підвищену концентрацію кетонових тіл у молозиві (молоці) можна встановити спеціальними тест-смужками, за реакцією Лестраде, Ланге, в основі яких є реакція натрію нітропрусиду з ацетооцтовою кислотою й ацетоном у лужному середовищі з появою бузкового забарвлення. Тест-смужку чи реактив змочують молозивом (молоком) і через 30–40 с досліджують зміну кольору, її інтенсивність. Чим більш інтенсивний колір, тим більша концентрація кетонових тіл у дослідній пробі. *Чутливість методів з натрію нітропрусидом становить 10 мг/100 мл.* Така концентрація кетонових тіл у молозиві (молоці) може бути під час розвитку кетозу у тварин.

Кількісне визначення в молозиві (молоці) кетонових тіл, загального кальцію, неорганічного фосфору, магнію і сечовини виконують методами, що застосовують для їх визначення у крові та сечі.

Діагностичне значення. Встановлено, що вміст кетонових тіл у молозиві і молоці корів прямо залежить від їх вмісту в крові. При цьому концентрація кетонових тіл у крові і молоці (молозиві) подібна. Значне підвищення кетонових тіл у молозиві і молоці (більше 10–12 мг/100 мл) спостерігається за гострої стадії кетозу, яка зазвичай виникає у перші 30–60 днів лактації. У разі переходу гострої форми кетозу у хронічну кількість кетонових тіл наближається до верхньої межі норми (8 мг/100 мл). Тобто, показники вмісту кетонових тіл у молозиві і молоці можуть бути діагностичним тестом у разі кетозу корів.

Показники молозива клінічно здорових корів

Показник	Молоко	Надій молозива		
		1-й	2-й	3-й
Відносна густина, кг/л	1,026–1,034	1,065–1,080	1,041–1,076	1,038–1,046
Кислотність, °Т	16–18	50–56	–	–
Загальний білок, г/л *	–	140,0–223,0	95,8–205,3	66,4–108,6
Загальна кількість Ig, г/л*	–	59,0–85,6	43,8–78,2	22,8–49,2
Вітамін А, мг/л *	0,013–0,0135	3,0–6,0	3,7±0,4	3,1±0,43
Кетонові тіла, мг/100 мл	4–8	2–6	–	–

П р и м і т к а. * – у сироватці молозива.

Література: [60, С. 259–260].

РОЗДІЛ 15

ДОСЛІДЖЕННЯ СЕЧІ

Лікар повинен спостерігати, чи така ж сеча у хворого, як у здорового, і чим менше подібності, тим більш тяжка хвороба.

Гіппократ
(460–377 рр. до н. е.)

Сеча є кінцевим продуктом обміну речовин. За її складом можна визначати функціональний стан не лише нирок і сечовивідних шляхів, а й печінки, серця, підшлункової залози, ендокринних органів, шлунково-кишкового тракту та обміну речовин в організмі. Сечу доцільно досліджувати у тварин контрольної групи під час проведення диспансеризації, а також у хворих у разі встановлення діагнозу, вивчення глибини патології, прогнозування закінчення хвороби, контролю ефективності лікувальних заходів. З цією метою проводять фізичне, хімічне та мікроскопічне, а за необхідності – і бактеріологічне дослідження сечі.

Особливе значення має дослідження сечі у ході діагностування хвороб сечовидільної системи, серед яких виділяють хвороби нирок і сечових шляхів – ниркової миски, сечоводу, сечового міхура та уретри. Хвороби нирок поділяють на дві основні групи: 1) запальні процеси – нефрити (гломерулонефрит, інтерстиціальний нефрит, пієлонефрит, нефросклероз, абсцес нирок, пери- і паранефрит, піонефроз); 2) дистрофічні процеси (нефротичний синдром, гідронефроз).

У разі гломерулонефриту запальний процес охоплює судинну систему – мальпігієві клубочки та капсулу Шумлянського-Боумена, а інтерстиціального нефриту – міжканальцеву сполучну тканину і навколоклубочковий інтерстицій. Нефросклероз – це хронічне інтерстиціальне запалення нирок, яке характеризується склеротичним ураженням ниркових артеріол, атрофією ниркової паренхіми і заміною її сполучною тканиною.

Пієлонефрит – це неспецифічне інфекційно-запальне захворювання, за якого в патологічний процес втягуються ниркова миска (у корів відсутня), чашечка (у коней і собак відсутня) і паренхіма нирки з переважним ураженням інтерстиціальної тканини. Пієлонефрит може ускладнюватися різною патологією: у нирках утворюються *абсцеси*, а в разі їх злиття – *карбункули*; гнійний процес може переходити на фіброзну капсулу (*перинефрит*) або в приниркову клітковину (*паранефрит*), а його термінальною стадією є *піонефроз*, за якого нирка перетворюється у

велику тонкостінну порожнину або кілька порожнин, заповнених гнійним ексудатом, сечею і продуктами розпаду тканин.

Нефротичний синдром, або *нефроз* характеризується дистрофічними змінами нирок із переважним ураженням ниркових каналців і базальної мембрани клубочків, порушенням водно-сольового й білкового обміну. *Гідронефроз* – це розтягнення ниркових мисок і чашечок сечею, яке в подальшому супроводжується атрофією паренхіми нирок.

Серед хвороб сечових шляхів розрізняють такі: *уроцистит* – запалення слизової оболонки сечового міхура; *уролітіаз* – утворення і відкладання камінців у нирках, нирковій мисці, сечовому міхурі та уретрі; *хронічну гематурію великої рогатої худоби* – уроцистит, який характеризується кровотечею в порожнину сечового міхура з ерозій та виразок його слизової оболонки; *нейрогенну дисфункцію сечового міхура* (параліч, парез і спазм), *непрохідність* та *запалення уретри*.

Дослідженню сечі велике значення надавали медики всіх часів. У своїх “Афоризмах” Гіппократ (460–377 рр. до н. е.) писав: “Коли при лихоманці сечі виділяється мало, вона каламутна, зі згустками, то збільшення її кількості і прозорості свідчить про поліпшення”. На ілюстраціях у манускриптах, скульптурах та на картинах, починаючи з XII ст., лікар, як правило, зображувався зі спеціальною посудиною для дослідження сечі, яка називалася матулою. Матула виготовлялася із прозорого скла, мала форму сечового міхура, кругле дно. У той же час Ендрю Бурдл (1490–1549), лікар англійського короля Генріха VIII, радив “не покладатися на сечу як на єдиного свідка”, оскільки, на його думку, “умовивід, побудований тільки на оцінці аналізу сечі, такий же тендітний, як і посудина для її збирання”.

15.1. Одержання та зберігання сечі

Сечу одержують під час природного сечовиділення. Акт сечовиділення можна викликати масажем препуція у самців, а в самок – шкіри нижче соромітних губ. У великих тварин виконують, окрім того, масаж сечового міхура через пряму кишку, а в дрібних – через черевну стінку. За хвороб статевих органів, а також для бактеріологічних досліджень сечу одержують із сечового міхура катетером (протипоказанням для катетеризації є гнійне запалення сечовивідного каналу), а в собак і кішок – пункцією (цистоцентез). У хутрових звірів сечу збирають у підвішені під клітку чисті емальовані кювети, покриті сіткою або марлею.

Для дослідження беруть близько 200 мл сечі, найкраще брати пробу вранці. Одержання проб натще важливе тому, що за ніч нагромаджуються продукти метаболізму, які менше пов’язані з годівлею та іншими зовнішніми факторами. За необхідності досліджують сечу, зібрану

протягом доби чи іншого проміжку часу. Тоді її збирають у сечоприймальники, які кріплять до тварини.

Якщо дослідити сечу відразу після взяття неможливо, то її зберігають закритою протягом 1,5 год у холодильнику або в термосі з льодом. Використання консервувальних речовин небажане, але воно допускається, якщо сечу потрібно транспортувати з господарств у лабораторію. Із консервантів використовують тимол (один кристалик на 100–150 мл сечі), толуол (покривають тонким шаром поверхню сечі), хлороформ (1–2 краплі на 200 мл сечі), 40% формальдегід (дві краплі на 25 мл сечі). Для бактеріологічних досліджень сечу не консервують. У разі використання консервувальних речовин слід урахувати те, що хлороформ розчиняє жири й утруднює визначення вмісту цукру, а тимол і формальдегід – білка. Зберігання сечі протягом тривалого часу за кімнатної температури призводить до розвитку в пробах мікрофлори й грибів, що змінює величину рН, руйнуються лейкоцити та циліндри. За необхідності сечу можна зберігати замороженою. У процесі дослідження уробіліногену сечу оберігають від прямого сонячного світла.

15.2. Фізичні властивості сечі

Відразу після одержання сечі визначають її кількість (за необхідності – добову), колір, прозорість, консистенцію, запах, відносну густину, реакцію сечі або величину рН.

Кількість сечі або діурез є важливим показником видільної функції нирок і стану водного обміну. Коні виділяють за добу 3–10 л сечі, велика рогата худоба – 6–12 (максимально – 25 л), вівці і кози – 0,5–2, свині – 2–6 л, собаки, залежно від породи, – 0,05–2 л (20–40 мл сечі на 1 кг маси тіла), коти – 0,1–0,2 л (20–30 мл сечі на 1 кг маси). За патології ці показники можуть змінюватися. *Зменшення* добового діурезу називається *олігурією*. Виникає вона внаслідок зниження фільтрації або підвищення реабсорбції первинної сечі у нирках, буває двох видів – ниркова і позаниркова. *Ниркова олігурія* виникає за гострого і хронічного перебігу дифузного гломерулонефриту та нефротичного синдрому, а *позаниркова* – за серцево-судинної недостатності, зневоднення організму внаслідок гастроентериту, асцити та плевриту, збільшення секреції вазопресину і альдостерону, які посилюють реабсорбцію води і натрію в ниркових каналцях. Припинення сечовиділення – *анурія*.

Збільшення добової кількості виділеної сечі – *поліурія* – відмічається за надмірного згодовування соковитих кормів, введення рідини в організм, нефросклерозу, інколи – за хронічного перебігу гломерулонефриту, цукрового і нецукрового діабету, у період розсмоктування ексудату і

транссудату. У собак поліурія буває за синдрому Кушинга (гіперадренкортицизму), який характеризується посиленою продукцією кортизолу, внаслідок чого розвивається гіперглікемія, полідипсія і поліурія. Нецукровий діабет виникає у разі зменшення секреції вазопресину (АДГ) або за глибоких дистрофічних змін клітин ниркових каналців, що робить їх резистентними до дії вазопресину (*нефрогенний нецукровий діабет*).

Колір сечі. У коней свіжа сеча має колір від блідо- до буро-жовтого, у жуйних – від світло-жовтого до світло-коричневого. У свиней вона світло-жовта, у собак і котів – від світло-жовтого до жовтого кольору. Під час зберігання сеча може темніти. Колір сечі у здорових тварин залежить від умісту в ній солей і пігментів. У хворих тварин її забарвлення може змінюватися. Світлий колір із слабим блідо-жовтуватим відтінком буває за хронічної ниркової недостатності та цирозу нирок (нефросклерозу), оскільки вони втрачають властивість виділяти хромогени, а також за цукрового та нецукрового діабету (внаслідок поліурії).

Темно-жовтий колір сеча має через високу її концентрацію, що є наслідком сильного потовиділення, тривалої гарячки, серцевої декомпенсації. Забарвлення сечі від насиченого темно-жовтого до коричневого із зеленкуватим відтінком вказує на наявність у ній жовчних пігментів, які спостерігаються за механічної і паренхіматозної жовтяниці. Індиканурія, що є ознакою розвитку в організмі виразкових захворювань та гнильних процесів у шлунково-кишковому каналі або гангрені легень, змінює колір сечі на темно-коричневий. Криваво-червоною, червоно-коричневою, темно-коричневою сеча буває у разі домішування до неї крові (*гематурія*), гемоглобіну (*гемоглобінурія*) і міоглобіну (*міоглобінурія*). Слід ураховувати й те, що згодовування тваринам столових буряків також надає сечі червоного забарвлення.

За гематурії необхідно визначити джерело надходження крові. Якщо кров у сечі з'являється на початку сечовиділення, то це свідчить про ураження уретри. Наявність крові в кінцевих порціях сечі дає підстави підозрювати ураження сечового міхура, а якщо вся сеча забарвлена в червоний колір, то це є ознакою ураження нирок. Часто крові в сечі міститься мало (*мікрогематурія*), її домішки можна виявити лише мікроскопічним або біохімічним дослідженням.

Білою, непрозорою із сіруватим відтінком сеча буває від домішування гною за гнійного уроциститу та пієлонефриту. За ліпурії та виділення надмірної кількості фосфатів сеча набуває молочно-білого забарвлення.

Лікування тварин метиленовим синім надає сечі синього або синьо-зеленого забарвлення, введення в організм препаратів карболової кислоти змінює колір сечі на коричневий або чорний.

Прозорість сечі визначають, розглядаючи її в посудині з чистого і прозорого скла (циліндр, тонкостінна колба). За винятком однокопитих, свіжа

сеча у здорових тварин прозора, чиста і не містить осаду. Лужна сеча під час зберігання протягом кількох годин за кімнатної температури стає каламутною від утворення мукоїду – слизу сечовидільних шляхів і лужних фосфатів. За зберігання кислої сечі, внаслідок кристалізації уратів, утворюється червонуватий осад. У коней сеча мутнувата, оскільки в ній міститься кальцію гідрокарбонат. За зберігання сечі настає її аміачне зброджування з утворенням нерозчинного кальцію карбонату, який вкриває тоненькою плівкою поверхню сечі. У собак сеча стає каламутною внаслідок випадання в осад фосфатів і карбонатів, а за чуми м'ясоїдних – кальцію оксалату.

Втрата сечею прозорості (помутніння) спостерігається за наявності в ній великої кількості солей, кров'яних та епітеліальних клітин, бактерій або слизу. Опалесцентна сеча може виділятися у здорових тварин у разі поїдання ними великої кількості жирів (аліментарна ліпурія). Патологічну ліпурію реєструють за тяжкого перебігу цукрового діабету, отруєння фосфором, хілурії.

Консистенцію сечі визначають переливанням її зі склянки в склянку. У здорових тварин, крім однокопитих, сеча водяниста. У коней сеча слизиста від домішування муцину. За пієлонефриту, амілоїдного нефрозу, запалення сечового міхура, уретри і статевих органів консистенція сечі стає слизистою, в'язкою і драглеподібною, через зменшення діурезу – близькою до слизистої. Сеча водянистої консистенції з високим умістом білка піниться. Ще Гіппократ в "Афоризмах", описуючи пухирці на поверхні сечі, оцінював цю ознаку як свідчення ураження нирок і тривалої хвороби. Лише тепер стало відомо, що поява пухирців у сечі пов'язана з високим умістом у ній білка. Під час переливання сеча однокопитих розтягується у вигляді ниток. Водянистою консистенцією сечі в коней стає за поліурії.

Запах сечі у тварин кожного виду специфічний, зокрема у собак сеча має запах часнику. Внаслідок підвищення концентрації сеча набуває різкого запаху. Після зберігання за кімнатної температури внаслідок лужного бродіння в ній посилюється запах аміаку. Аміачний запах має також свіжовзята сеча через її застій і зброджування в сечовивідних шляхах, що виявляють у разі паралічу та парезу сечового міхура, уроциститу, непрохідності уретри. За розпаду пухлин і гангренозних процесів у сечовивідних шляхах та сечовому міхурі сеча набуває гнильного запаху. Виділення із сечею великої кількості кетонових тіл (*кетонурія*) надає пробі фруктового запаху, що спостерігається за кетозу в корів і овець, лістеріозу, цукрового діабету. За поліурії водяниста сеча майже не має запаху.

Відносна густина сечі залежить від концентрації розчинених у ній різних речовин і здатності нирок до концентрування та розведення сечі. Найбільше на густину сечі впливають концентрація в ній сечовини (пряма пропорційна залежність) і посилений діурез (зворотна залежність). Однак

за цукрового діабету, незважаючи на поліурію, сеча має високу відносну густину через уміст у ній цукру. Відносна густина є показником концентраційної здатності нирок.

Для визначення відносної густини у циліндр із сечею обережно опускають урометр так, щоб він вільно плавав, не торкаючись стінок циліндра. Показник густини визначають за нижнім меніском сечі.

Урометр складається з двох частин: перша – з мітками від 1,000 до 1,025, друга – від 1,025 до 1,050. Опустити в циліндр із сечею спочатку слід першу частину урометра. Якщо урометр спливає на поверхню, потрібно опустити в циліндр другу його частину і визначити відносну густину сечі. Якщо спливає на поверхню і друга частина урометра, сечу необхідно розвести удвічі дистильованою водою, визначити її густину, а цифри, що знаходяться після коми, помножити на кратність розведення.

Визначати густину сечі слід за тієї температури, яка вказана на урометрі. Якщо температура сечі вища від вказаної на урометрі (зазвичай, це 20° С), то на кожні 3° С до показання урометра *додають поправку 0,001*, якщо температура сечі нижча – то на кожні 3° С від показання урометра *віднімають поправку 0,001*.

У здорових тварин відносна густина сечі становить (г/мл, кг/л): у коней – 1,020–1,050; великої рогатої худоби – 1,015–1,045; овець і кіз – 1,010–1,040; свиней – 1,010–1,030 (у 80% свиноматок, за даними Костенко Л.О. – 1,010–1,020); собак – 1,020–1,050; котів – 1,020–1,050; у кролів – 1,010–1,035. Коливання цих показників залежить від складу раціону і кількості випитої води.

Підвищення відносної густини сечі спостерігають у разі обмеження споживання рідкого корму й води, важкої роботи з виділенням великої кількості поту, зневоднення організму (діарея, блювання, гарячка), за розвитку набряків і водянок, гострого гломерулонефриту, протеїнурії, глюкозурії.

Зниження відносної густини сечі відмічають внаслідок порушення реабсорбції води у ниркових каналцях, тобто порушення концентраційної функції нирок, зокрема за нефросклерозу, хронічної ниркової недостатності, зменшеної секреції антидіуретичного гормону, під час споживання великої кількості води, тривалого голодування і низької концентрації протеїну в раціоні. *Гіпостенурія* – це значне зниження відносної густини сечі з утриманням її на низькому рівні (1,001–1,005) внаслідок важких уражень нирок із втратою ними екс-креторної і концентраційної функцій.

Водневий показник (рН) сечі визначають одразу після одержання проб. Під час її зберігання величина рН збільшується. Водневий показник визначають індикаторними смужками або рН-метром. Нині випускають індикаторні смужки, які показують не лише якісну реакцію, а й допомагають визначати кількісний результат. У клінічно здорових тварин

реакція свіжої сечі становить: у великої і дрібної рогатої худоби – 7,5–8,5; у коней – 8,5–9,5 (у новонароджених телят і лошат сеча є слабокислою або нейтральною – 5,7–7,0); у свиней – 6,0–7,3; собак і котів – 5,0–6,5.

Реакція сечі залежить від виду тварин і характеру корму, який вони споживають. Корми рослинного походження містять більше лужних елементів, а тваринного – кислих, тому сеча травоядних тварин є слаболужною, м'ясоїдних – слабокислою, а всеїдних – близькою до нейтральної. Внаслідок зміни традиційного фізіологічного типу годівлі, характерного для тварин певного виду, реакція сечі змінюється. Так, під час згодовування травоядним тваринам кормів із високим умістом протеїну (зернових кормів) сеча стає кислою. Згодовування протягом деякого часу м'ясоїдним тваринам кормів рослинного походження (овочів, фруктів, крупів, картоплі) призводить до зміщення рН сечі в лужну сторону.

Реакцію сечі визначають лакмусовими смужками. Змочують у свіжій сечі синю та червону лакмусові смужки і спостерігають за зміною їх кольору. Якщо синя лакмусова смужка червоніє, а червона не змінює забарвлення – реакція сечі кисла; якщо червона лакмусова смужка синіє, а синя не змінює забарвлення, то реакція сечі – лужна. За нейтральної реакції сечі червона і синя лакмусові смужки не змінюють свого забарвлення.

Кисла реакція сечі у травоядних виникає внаслідок голодування, надлишку зернових концентратів та кормів, що містять багато цукру (цукровий і напівцукровий буряк, кукурудза в стадії молочно-воскової стиглості), а також під час захворювань, які перебігають із виникненням респіраторного або метаболічного ацидозу (пневмонії, діареї, кетоз, ацидоз рубця).

Лужна реакція сечі є наслідком алкалозу рубця, респіраторного або метаболічного алкалозу. Різко лужною реакція сечі буває за пієлонефриту, гнильного уроциститу. Внаслідок патології органів сечової системи розвивається аміачне зброджування сечі, через що утворюється амонію карбонат, який змінює реакцію сечі в лужний бік. Слаболужна реакція сечі у м'ясоїдних буває за частого блювання.

Тривале порушення нормальної реакції сечі є обережним для прогнозу, оскільки при цьому можуть утворюватися сечові камені: за кислої реакції – з цистину, уратів і сечової кислоти, а за лужної – з фосфатів. Оксалатні камені утворюються за будь-якої реакції сечі.

Література: [24, С. 4–10; 38, С. 325–346; 40, С. 169–174; 49, С. 6–19].

РОЗДІЛ 16

ХІМІЧНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ СЕЧІ

Хімічне дослідження сечі проводять з метою визначення вмісту білка, глюкози, кетонів, тіл, крові, міоглобіну, білірубіну, уробіліну, жовчних кислот, нітратів, індикану, сечовини, креатиніну. Для проведення якісного, напівкількісного та кількісного аналізів сечі існує багато методів. Використання універсальних індикаторних смужок дозволяє досліджувати хімічні показники безпосередньо в господарствах.

16.1. Визначення білка в сечі

У людини через ендотелій ниркових клубочків у первинну сечу фільтруються близько 5 г альбуміну, деяка кількість глікопротеїнів. Більшість їх (близько 99%) реабсорбується і розщеплюється у клітинах ниркових каналців. У результаті цього у здорової людини із сечею виділяється протягом доби 20–80 мг білка. Виділення більше 150 мг білка, у тому числі понад 30 мг альбуміну, є патологічним. Сеча здорових тварин містить дуже малу кількість білка (не більше 0,015 г/л). Поява білка в сечі у кількості, яку можна визначити, називають *протеїнурією*. Детальний аналіз протеїнурії відкриває перспективи в диференціальній діагностиці хвороб сечової системи і тому цілком правомірно одержав назву “біохімічна біопсія нирки”.

16.1.1. Якісні реакції на білок у сечі

Всі реакції на наявність білка в сечі ґрунтуються на осадженні його з розчину, внаслідок чого відбувається помутніння рідини. Сечу перед дослідженнями необхідно профільтрувати (інколи двічі) через паперовий фільтр, вона має бути свіжою і прозорою. Якщо реакція сечі лужна, то її обов’язково перед проведенням дослідження потрібно підкислити додаванням декількох крапель 10% розчину оцтової кислоти. У процесі дослідження лужної сечі в осад випадають фосфати.

У клінічній практиці найбільш поширене визначення білка в сечі кип’ятінням, пробами з азотною і сульфосаліциловою кислотами, а останнім часом – універсальними індикаторними смужками.

Проба кип’ятінням. У пробірку наливають 3–5 мл попередньо підкисленої (кількома краплями 10% розчину оцтової кислоти) до

слабокислої реакції прозорої сечі і нагрівають до кипіння (для точності результату ставлять 2–3 спарені проби). За наявності білка він згортається і випадає в осад. Залежно від кількості білка в сечі у пробірці утворюється легка опалесценція рідини, помутніння, випадання пластівців, утворення згустку. За відсутності помутніння не можна одразу робити висновок про негативну реакцію на білок у сечі, оскільки за значного підкислення сечі він не випадає в осад під час кип'ятіння. Для контролю необхідно до гарячої прозорої сечі додати рівний об'єм насиченого розчину натрію хлориду. За наявності білка в пробірці одразу утворюється характерне помутніння. *Чутливість проби становить 0,001 г/л, або 0,001 ‰.* (*‰ – pro mille – кількість грамів білка на 1000 мл сечі*).

Проба з азотною кислотою. На дно пробірки піпеткою вносять 1–2 мл 5% розчину азотної кислоти, приготовленого на 20–30% розчині натрію хлориду. Чистою піпеткою обережно нашаровують на кислоту 1–2 мл підкисленої і профільтрованої сечі. За наявності білка на межі двох рідин утворюється біле кільце. Якщо білок складає 0,033 г/л, то кільце утворюється через 2,5–3 хв. Чутливість проби – 0,033 г/л (0,0033%). За відсутності білка в сечі і неправильного нашарування на кислоту сечі на межі двох рідин утворюється темне кольорове кільце.

Проба з сульфосаліциловою кислотою. У пробірку наливають 2–3 мл підкисленої і профільтрованої сечі і краплями додають 20% розчин сульфосаліцилової кислоти (розчин кислоти зберігають у темноті). За наявності білка в сечі кожна крапля кислоти, що опускається на дно пробірки, утворює помутніння. За незначного струшування вся рідина в пробірці мутніє.

Під впливом сульфосаліцилової кислоти в осад випадають не лише білок, але й альбумози. Під час підігрівання альбумози розчиняються, а білковий осад залишається нерозчинним. *Чутливість проби становить 0,015 г/л (0,015 ‰, або 0,0015%).*

Проба з калієм залізоціаністим. У пробірку наливають 10 мл підкисленої сечі і обережно краплями додають 5% розчин калію залізоціаністого. За наявності у сечі білка від кожної краплі розчину утворюється виражений осад у вигляді пластівців.

16.1.2. Кількісне визначення білка в сечі

Кількісне визначення білка в сечі проводять лише після позитивних результатів якісних проб.

Визначення білка в сечі із 3% сульфосаліциловою кислотою.
Принцип методу. Інтенсивність помутніння у ході осадження білка сульфосаліциловою кислотою пропорційна його концентрації.

Обладнання. Фотоелектроколориметр (КФК-2, КФК-3), пробірки, піпетки на 1 і 2 мл.

Реактиви: 1) 3% розчин сульфосаліцилової кислоти; 2) стандартний розчин альбуміну (5 мг/мл).

Хід визначення. У пробірку вносять 0,5 мл профільтрованої сечі, додають 1,5 мл розчину сульфосаліцилової кислоти, перемішують. Через 5 хв вимірюють екстинцію проби за довжини хвилі 590–650 нм (оранжевий чи червоний світлофільтр) відносно контролю у кюветі товщиною робочого шару 5 мм. Контроль готують аналогічно, але замість розчину сульфосаліцилової кислоти використовують ізотонічний розчин NaCl.

Розрахунок умісту білка проводять за калібрувальним графіком, для побудови якого з концентрованого розчину альбуміну (5 мг/мл) готують наступні розведення (табл. 16.1).

Таблиця 16.1

Розведення розчину альбуміну

№ з/п	Альбумін (5 мг/мл)	Ізотонічний розчин натрію хлориду	Кінцева концентрація білка, мг/мл (г/л)
1	0,05	4,95	0,05
2	0,1	4,9	0,1
3	0,2	4,8	0,2
4	0,5	4,5	0,5
5	1,0	4,0	1,0

Кожний із одержаних розчинів обробляють, як і дослідні (0,5 мл розчину альбуміну + 1,5 мл розчину сульфосаліцилової кислоти). Вимірюють екстинцію і будують калібрувальний графік залежності екстинції від концентрації білка.

Лінійна залежність зберігається до 1 мг/мл. За більшої концентрації білка в сечі пробу необхідно розвести і провести повторне визначення, врахувавши кратність розведення сечі.

Метод з азотною кислотою (Робертса-Стольникова). *Принцип методу* ґрунтується на тому, що в разі проби з азотною кислотою біле кільце на межі її з сечею з'являється між 2,5 і 3-ма хвилинами за наявності 0,033 г/л білка. Якщо кільце утворюється раніше, то білка в такій сечі більше 0,033 г/л, і тому сечу розбавляють до тих пір, поки кільце не буде утворюватись у зазначений термін (між 2,5 і 3 хвилинами).

Хід визначення. Спочатку виконують пробу з азотною кислотою і нативною сечею. Якщо вміст білка в сечі перевищує 0,033 г/л, то біле кільце на межі двох рідин утворюється відразу. Тоді сечу слід розвести

дистильованою водою у 2, 4, 8, 10, 20, 30, 50, 100 і 200 разів і т.д., і з кожним розведенням виконати пробу з азотною кислотою. У тому розведенні, в якому кільце з'явиться між 2,5 і 3-ма хвилинами, вміст білка становить 0,033 г/л. Множенням 0,033 г/л на кратність розведення сечі знаходять його вміст у нативній сечі, який виражають кількістю грамів білка на 1 л сечі. Наприклад, кільце з'явилося у термін між 2,5 і 3 хвилинами у пробірці з розведенням сечі у 200 разів. Отже, $0,033 \text{ г/л} \times 200 = 6,6 \text{ г/л сечі}$.

Експрес-метод визначення білка в сечі діагностичними смужками. Проводиться за допомогою діагностичних смужок типу “Біоскан” (Росія), АльбуФАН, Penta-Phan (Ла-Хема, Чехія). Метод ґрунтується на зміні кольору кислотно-основного індикатора під впливом білків. Діагностичну смужку необхідно опустити в свіжу сечу і не пізніше 1 хв порівняти її забарвлення з відповідною кольоровою шкалою на тубусі. Результат виражається в г білка на 1 л сечі.

16.1.3. Діагностичне значення протеїнурії

Протеїнурія буває преренальною (переднирковою), ренальною (нирковою) і постренальною (післянирковою).

Передниркова (преренальна) протеїнурія зумовлена появою в плазмі крові підвищеної кількості білків, які фільтруються до каналців у кількості, що перевищує їхню реабсорбційну ємність. До такої патології належать гемоглобінурія (за гемолітичних синдромів) та міоглобінурія (внаслідок пошкоджень м'язів). Тривала преренальна протеїнурія спричинює пошкодження клубочків і розвиток нефротичного синдрому із значною втратою білка.

Ниркова (ренальна) протеїнурія буває функціонального або органічного походження, а залежно від місця ураження – клубочковою або каналцевою. Функціональна ниркова протеїнурія спостерігається в новонароджених тварин протягом перших 10-ти днів життя та в корів перед отеленням, характеризується короткочасним перебігом і не супроводжується клінічними симптомами. Функціональна протеїнурія може розвиватися за серцевої недостатності, гарячки та гіпертонії. *Органічна ниркова* протеїнурія виникає внаслідок структурних змін у нирках і спричинюється підвищеною проникністю ниркових клубочків (*клубочкова*) або пошкодженням каналців (*каналцева протеїнурія*).

Клубочкова протеїнурія зустрічається найчастіше і зумовлюється багатьма хворобами різної етіології. Характер протеїнурії залежить від пошкодження клубочків: за незначних пошкоджень виділяється білок з малою молекулярною масою (альбумін і трансферин). Прогресування

хвороби призводить до зростання протеїнурії внаслідок підвищення проникності клубочків, через які починають проходити білки з більшою молекулярною масою. За гострого гломерулонефриту в сечі виявляють від 0,1 до 1,5% білка.

Канальцева протеїнурія спричинюється порушенням реабсорбції білків у канальцях і характеризується зростаючим виділенням із сечею білків із малою молекулярною масою, які вільно проходять через стінку клубочків (β_2 -макроглобулін, лізоцим, α_1 -мікроглобулін та інші білки). За нефротичного синдрому протеїнурія становить 1–5%. Більш висока протеїнурія, порівняно з гломерулонефритом, пояснюється двома причинами: а) більшою кількістю крові, що фільтрується у клубочках за нефрозу, ніж за гломерулонефриту; б) під час ураження канальців підвищується реабсорбція води, внаслідок чого концентрація білка в сечі зростає. Канальцева протеїнурія часто поєднується з клубочковою.

За нефросклерозу протеїнурія незначна (0,1–0,2%). Це пояснюється прогресуючим зменшенням кількості функціонуючих клубочків і зниженням внаслідок цього фільтрації білка.

Післяниркова протеїнурія розвивається у разі захворювань сечового міхура, уретри та уролітіазу. Кількість білка в сечі при цьому не перевищує 1 г/л.

Ниркова протеїнурія від післяниркової відрізняється більшим умістом білка в сечі (у разі післяниркової він рідко перевищує 1 г/л), наявністю в осаді сечі циліндрів та іншими симптомами ураження нирок. Трапляються випадки одночасного ураження нирок і сечовивідних шляхів. Така протеїнурія називається *змішаною*.

Протеїнурія також діагностується під час захворювання статевих органів: у самок – у разі запалень матки і піхви, у самців – запалення передміхурової залози. Якщо білок до сечі домішується зі статевих органів, то протеїнурія є *несправжньою*.

Література: [6, С. 76–77; 12, С. 342–343; 24, С. 10–15; 38, С. 346–348; 40, С. 177–179; 49, С. 20–33; 60, С. 262–266; 81, С. 40–42].

16.2. Визначення вмісту глюкози в сечі

У сечі здорових тварин містяться сліди глюкози, які не виявляються хімічними реакціями, що застосовуються в лабораторіях, а тому сечу прийнято вважати вільною від глюкози та інших цукрів. Уміст глюкози слід визначати відразу після одержання сечі, оскільки під час зберігання проб за кімнатної температури під дією ферментів мікроорганізмів і грибків відбувається ферментативне зброджування вуглеводів. Серед усіх

цукрів сечі найбільш важливе значення має вміст глюкози, оскільки інші вуглеводи в ній містяться в незначній кількості.

Уміст глюкози досліджують якісними і кількісними пробами. Для експрес-аналізу використовують індикаторні смужки. Якісні проби ґрунтуються на відновлювальних властивостях глюкози. Це проби Бенедикта, Гайнеса, Ніляндера, Фелінга та ін. Кількісне визначення цукрів у сечі проводять методом зброджування в цукрометрах Ейнгорна, Ласара-Кона, Альтгаузена, ортотолуїдиновим та глюкозооксидазним методами.

16.2.1. Якісні реакції визначення глюкози в сечі

Проба Гайнеса. Принцип методу. Глюкоза у лужному середовищі окиснюється гідратом окису купруму $[\text{Cu}(\text{OH})_2]$, що утворюється з купруму сульфату. У ході нагрівання купруму гідроксид (блакитного кольору) відновлюється, утворюючи гідрат закису міді жовтого кольору $[\text{Cu}(\text{OH})]$, який може розпадатися з утворенням закису купруму (Cu_2O) червоного кольору. Чутливість проби – близько 0,03%.

Приготування реактиву Гайнеса. Розчиняють у 250 мл суміші, приготовленої з рівних об'ємів дистильованої води і чистого гліцерину 0,5 г купруму сульфату (CuSO_4). До отриманої рідини додають 100 мл розчину натрію гідроксиду (12,5 г NaOH + 100 мл дистильованої води). Реактив зберігають у посуді з темного скла.

Хід визначення. У пробірку наливають 1–2 мл реактиву Гайнеса і підігрівають до кипіння. На гарячий реактив піпеткою нашаровують 1–2 мл попередньо підлуженої і профільтрованої сечі. За наявності глюкози на межі двох рідин утворюється золотисте кільце, а весь реактив поступово мутніє.

Проба дуже чутлива і може бути використана для дослідження сечі домашніх тварин усіх видів.

Проба Ніляндера (проба на відновлення вісмуту). **Принцип методу.** За наявності глюкози в сечі, вісмуту нітрат (тривалентний вісмут) у процесі нагрівання спочатку відновлюється у вісмуту оксид коричневого кольору, а в подальшому – до металічного вісмуту (чорне забарвлення рідини).

Приготування реактиву Ніляндера. Змішують у ступці 2,0 г вісмуту нітрату з 4,0 г сегнетової солі і отриману суміш розчиняють у 100 мл 10% розчину натрію гідроксиду (NaOH). Розчин фільтрують. Реактив нестійкий під час зберігання.

Хід визначення. У пробірку наливають 3–5 мл профільтрованої сечі, додають 1–2 мл реактиву Ніляндера, обережно нагрівають суміш і кип'ятять протягом 3 хв, тримаючи над полум'ям верхню частину

пробірки. За наявності глюкози в сечі на початку кип'ятіння рідина поступово набуває темно-коричневого, а потім – чорного забарвлення. *Чутливість проби становить 0,05%.*

П р и м і т к а. За наявності білка і альбумоз у сечі кип'ятінням з вісмуту нітратом (III) у лужному середовищі відокремлюється сірка і утворюється вісмуту сульфат (III) з розвитком чорного забарвлення, так само, як і в реакції за наявності глюкози в сечі. Чорне забарвлення рідини в пробірці з відновленням вісмуту утворюється також за наявності в сечі деяких препаратів (саліцилова кислота, антипірін та ін.).

Проба з сегнетовою сіллю. Для аналізу беруть два реактиви – 5% розчин купрум сульфату (CuSO_4) і 20% – сегнетової солі в 4% розчині КОН (100 мл).

Хід визначення. У пробірку наливають 1,5 мл розчину купрум сульфату і 3 мл розчину сегнетової солі. Суміш реактивів обережно підігривають до кипіння і на гарячий реактив нашаровують 4,5 мл підігрітої сечі. За наявності глюкози у сечі рідина набуває жовтого забарвлення і настає її помутніння.

16.2.2. Кількісне визначення цукрів у сечі

Кількісне визначення цукрів у сечі проводять шляхом зброджування у цукрометрах Ейнгорна, Ласара-Кона, Альтгаузена, а також поляризаційним, орто-толуїдиновим і глюкозооксидазним (ферментативним) методами.

Визначення глюкози глюкозооксидазним методом. *Принцип методу.* Глюкоза у присутності глюкозооксидази окиснюється до глюконової кислоти і гідрогену, який у присутності пероксидази взаємодіє з фенолом і 4-амінофеназоном з утворенням хіноніміну червоно-фіолетового кольору, інтенсивність забарвлення якого прямо пропорційна концентрації глюкози в сечі.

Обладнання: фотоелектроколориметр, фотометр, спектрофотометр (довжина хвилі 500–546 нм), кювети з товщиною робочого шару 5 або 10 мм.

Реактиви: 1) розчини ферментів – пероксидаза 7500 U/л; 2) буферний розчин – фосфатний буфер (рН 7,4); 3) антикоагулянт – суха суміш 0,536 г натрію щавлевокислого і 3,4 г натрію хлориду; 4) стандартний розчин глюкози – 10,0 ммоль/л (1802 мг/л).

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.

Хід визначення. У дослідну пробірку піпеткою відбирають 0,02 мл сечі і додають 2,0 мл робочого розчину. Перемішують, витримують 20 хв за кімнатної температури (+ 18–25° С) або 12 хв за температури 37° С.

Контрольний розчин – 0,02 мл 0,85% розчину натрію хлориду і 2,0 мл робочого розчину (інкубація проводиться аналогічно дослідному зразку).

Визначають екстинцію дослідної проби відносно контролю за довжини хвилі 500–546 нм.

Результат визначають за формулою:

$$X \text{ (ммоль/л)} = 10 \times D_n \text{ (дослідна проба)} \times \text{коэф. розведення.}$$

Примітка. Сечу перед дослідженням розвести у 2–10 разів.

Визначення глюкози за колірною реакцією з ортотолуїдином.

Принцип методу. Глюкоза під час нагрівання з ортотолуїдином (*реактив токсичний!*) у розчині оцтової кислоти утворює сполуку, інтенсивність кольору якої пропорційна концентрації глюкози.

Обладнання: ФЕК-56 М, КФК-2 або КФК-3, водяна баня.

Реактиви: 1) 3% розчин трихлороцтової кислоти (ТХОК); 2) ортотолуїдиновий реактив: у 94 мл льодяної оцтової кислоти розчиняють 0,15 г тіосечовини і додають 6 мл ортотолуїдину. Реактив стійкий за зберігання в холодильнику; 3) 500 мг% стандартний розчин глюкози, приготовлений у 0,2% розчині бензойної кислоти.

Хід визначення. У пробірку вносять 1,8 мл 3% розчину ТХОК і додають до неї 0,2 мл свіжої або стабілізованої сечі. Центрифугують 15 хв за 1500 об/хв. У чисту пробірку відбирають 0,5 мл центрифугату і додають 4,5 мл ортотолуїдинового реактиву. Пробірки ставлять у киплячу водяну баню (вода має безперервно кипіти) точно на 8 хв, потім виймають їх, одразу охолоджують під проточною водою. Оптичну щільність вимірюють на фотоелектроколориметрі (ФЕК-56М, КФК-2, КФК-3) за довжини хвилі 590–650 нм (оранжевий або червоний світлофільтр) у кюветі з товщиною шару 1 см. Контроль: 0,5 мл ТХОК + 4,5 мл ортотолуїдинового реактиву.

Стандартна проба ставиться як і дослідна, але замість сечі беруть стандартний розчин глюкози з концентрацією 50–100 мг/100 мл.

Розрахунок проводять за формулою:

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

де C – концентрація глюкози у пробі, мг/100 мл крові; $C_{ст}$ – концентрація глюкози у стандарті; E_0 – оптична щільність дослідної проби; $E_{ст}$ – оптична щільність стандарту.

П р и м і т к а. Сечу перед дослідженням розвести у 2–10 разів.

Експрес-метод визначення кількості глюкози в сечі. Проводиться за допомогою діагностичних смужок ГлюкоФАН, Пента ФАН, НонаФАН (*La-Chema*, Чехія). Діагностичну смужку слід опустити у свіжу сечу і не пізніше, ніж через 1 хв порівняти її забарвлення з відповідною кольоровою шкалою на тубусі. Результат виражається в ммоль глюкози на 1 л сечі.

Діагностичне значення глюкозурії. Виділення глюкози із сечею називають *глюкозурією*. Рівень глюкози в крові, за якого починається глюкозурія, називається *нирковим порогом*. У моногастричних тварин (свині, коні) він становить 8–9 ммоль/л, жуйних – 5–6, людини – 10, собак – 10–11, у кішки – 12–16 ммоль/л. За ураження нирок канальці втрачають здатність до реабсорбції глюкози, тому величина порога знижується, і глюкоза починає виділятися із сечею за нормальної її концентрації в крові.

Глюкозурія буває фізіологічною і патологічною. *Фізіологічна глюкозурія* спостерігається під час поїдання тваринами великої кількості кормів, що містять цукор, після значного фізичного навантаження, у перед- і післяродовий періоди, за внутрішньовенного введення глюкози і гіпертонічного розчину натрію хлориду. Короткочасна фізіологічна глюкозурія є наслідком збудження симпатичного відділу автономної нервової системи, що, очевидно, супроводжується посиленням розпадом глікогену в печінці.

Патологічна глюкозурія виникає за ураження центральної нервової системи (*неінсулярна*), інсулярного апарату підшлункової залози та інших залоз внутрішньої секреції (*ендокринна*), а також за ураження нирок (*ренальна*).

Неінсулярна глюкозурія розвивається внаслідок уражень центральної нервової системи (сказ, чума собак, лістеріоз, менінгоенцефаліт, травми і пухлини мозку) та деяких отруєнь. Серед *ендокринних* глюкозурій виділяють глюкозурії, спричинені недостатньою секрецією інсуліну (діабетична), гіперфункцією надниркових залоз (мозкової речовини і рідше – кори), гіпофіза та щитоподібної залози. До цієї ж групи належить печінкова глюкозурія, яка спричинюється порушенням глікогеносинтезувальної функції печінки.

Ренальна глюкозурія зумовлена зниженням реабсорбції глюкози в ниркових канальцях ("*ренальний діабет*") і може спостерігатися у разі хвороб нирок (гломерулонефриту, нефротичного синдрому, нефросклерозу). У таких випадках рівень глюкози в крові нормальний або навіть дещо знижений. Зниження реабсорбції глюкози в канальцях

виникає внаслідок зменшення активності ферментів, які забезпечують цей процес (гексокінази і глюкозо-6-фосфатази).

За маститів і закупорювання дійок у тварин може розвиватися *лактозурія* – внаслідок зворотного надходження молочного цукру з молока в кров і сечу. Лактозурію від глюкозурії відрізняють постановкою зброджувальної проби. Галактоза в сечі (*галактозурія*) з'являється під час уражень печінки, м'язової дистрофії та панкреатиту. Поява інших цукрів у сечі спостерігається досить рідко.

Література: [6, С. 264–276; 12, С. 344–345; 24, С. 15–19; 38, С. 348–349; 40, С. 180–182; 49, С. 33–37; 60, С. 117–119; 271–272].

16.3. Визначення кетонових тіл у сечі

До кетонових тіл належать ацетон, бета-оксимасляна та ацетооцтова кислоти. У здорових тварин сеча містить незначну кількість кетонових тіл, які не визначаються якісними реакціями (проба Лестраде дозволяє виявити кетонові тіла в сечі від 1,7 ммоль/л і вище). Використання індикаторних смужок, виготовлених спеціально для тварин кожного виду, допомагає виявляти посилене виділення кетонових тіл, концентрація яких є трохи вищою за верхню межу норми. Нині випускають смужки, за допомогою яких визначають приблизну концентрацію кетонових тіл у сечі, а точну їх кількість досліджують у спеціальних дистиляційних апаратах.

Проба Лестраде. Принцип методу. Натрію нітропрусид під час взаємодії з ацетоном сечі у лужному середовищі утворює комплексну сполуку, що забарвлюється у вишнево-червоний колір.

Приготування реактиву. Змішують 1,0 г натрію нітропрусиду ($Na_2[Fe(CN)_5NO]$) з 20,0 г амонію сульфату $[(NH_4)_2SO_4]$ і 20,0 г натрію карбонату (Na_2CO_3) безводного. Реактив зберігають у флаконі зі скла темного кольору.

Хід визначення. На предметне скло насипають 0,1–0,2 г реактиву Лестраде (набирають на кінець скальпеля) і додають 2–3 краплі сечі. У разі позитивної реакції утворюється рожеве або червоно-фіолетове забарвлення.

Проба Ротера. Принцип методу такий же, як і проби Лестраде.

Реактиви: 1) амонію сульфат $(NH_4)_2SO_4$ у порошок; 2) аміак концентрований; 3) 5% свіжоприготовлений розчин натрію нітро-прусиду ($Na_2[Fe(CN)_5NO]$).

Хід визначення. У пробірку наливають 5–8 мл сечі і насичують її амонію сульфатом. Додавають 2 або 3 краплі концентрованого аміаку і 5

крапель розчину натрію нітропрусиду, перемішують. Утворюється темно-червоне або фіолетове забарвлення.

Проба Росса. Приготування реактиву Росса. Змішують 1,0 г натрію нітропрусиду з 99 г амонію сульфату.

Хід визначення. У пробірку насипають 1,0 г реактиву Росса, наливають піпеткою 5 мл сечі, додають 1 кристалик NaOH і перемішують. Результати реакції читають через 5 хв за температури не менше 18° С. За наявності кетонових тіл у сечі вміст пробірки забарвлюється у червоно-фіолетовий колір.

Експрес-метод визначення кількості кетонових тіл. Нині випускають діагностичні індикаторні смужки, за допомогою яких визначають приблизну концентрацію кетонових тіл у сечі: “Кето-тест” (Росія), Кето ФАН і Діа ФАН (*La-Chema*, Чехія), *Penta* ФАН. Діагностичну смужку опускають у сечу і протягом 1 хв порівнюють колір із стандартом, який нанесений на тубус. В основі тесту лежить реакція Легала. Проба більш чутлива до ацето-оцтової кислоти, ніж до ацетону, і не чутлива до β-гідроксимасляної кислоти. Кольорова шкала на етикетці відображає концентрацію ацето-оцтової кислоти в сечі. Ця проба дозволяє виявити кетонові тіла у сечі від 1,5 до 15 ммоль/л.

Діагностичне значення кетонурії. У здорових коней уміст кетонових тіл у сечі становить 0,06–0,66 ммоль/л, у корів – 0,6–1,5, овець – 0,59–1,46 ммоль/л. Збільшення вмісту кетонових тіл у сечі називається *кетонурією*. Зумовлена вона недостатнім забезпеченням жуйних тварин енергією, легкотравними вуглеводами у поєднанні з високим умістом у раціонах білків і жирів та під час згодовування кормів, які містять кетогенні речовини (масляну кислоту). Кетонурія є також наслідком тривалого голодування або виснаження тварин. Діагностують кетонурію у разі кетозу, цукрового діабету (кетоацидоз). Визначення кетонових тіл у сечі є високоінформативним і раннім тестом під час діагностики прихованої форми кетозу корів та овець.

Література: [24, С. 20–21; 38, С. 349–350; 60, С. 272–273].

16.4. Визначення білірубину в сечі

У сечі здорових тварин білірубін звичайними методами лабораторного дослідження не визначається. У разі патології у сечі може міститися лише кон'югований (зв'язаний, прямий) білірубін. Некон'югований (вільний, непрямий) білірубін не розчиняється у воді і не проходить через ниркові клубочки, тому в сечі його не виявляють. Уміст білірубину в сечі визначають якісними і кількісними реакціями та індикаторними

смужками. З якісних реакцій застосовують проби Розіна, Фуше, Франка, які ґрунтуються на окисненні білірубіну в білівердин, що надає пробі зеленуватого забарвлення. Для великої рогатої худоби інформативною є проба Франка (з розчином метиленового синього). Кількість білірубіну в сечі досліджують уніфікованим методом Ієндрашика, Клегорна і Графа.

Проба Розіна. *Принцип методу* ґрунтується на властивості білірубіну окиснюватися в білівердин у присутності речовин-окиснювачів (йод, азотна і трихлороцтова кислоти).

Реактиви: 1) розчин Люголя (1 г йоду і 2 г калію йодиду розчиняють у 300 мл дистильованої води); або 2) 1% спиртовий розчин йоду.

Хід визначення. До 4–5 мл сечі нашаровують розчин Люголя чи 1% спиртовий розчин йоду. За наявності в сечі білірубіну на межі двох рідин утворюється зелене кільце.

Проба Фуше. *Принцип методу* ґрунтується на окисненні білірубіну феруму хлоридом у білівердин після осадження барію хлоридом.

Реактиви: 1) 15% розчин барію хлориду; 2) реактив Фуше (100 мл 25% розчину трихлороцтової кислоти + 10 мл 10% розчину феруму півторахлорного).

Хід визначення. До 10–12 мл досліджуваної сечі додають 5–6 мл 15% розчину барію хлориду, перемішують (барію хлорид осаджує білірубін). Уміст пробірки фільтрують. На витягнутий з лійки фільтр (попередньо його розправляють на сухому фільтрувальному папері) наносять 2–3 краплі реактиву Фуше. За наявності в сечі білірубіну на фільтрі з'являється зелено-синє чи блакитне забарвлення. Ця проба є однією з найбільш чутливих і застосовується у випадках, коли отримані неясні чи сумнівні результати з іншими реактивами.

Експрес-метод визначення білірубіну в сечі. Використовують індикаторні смужки ГексаФАН, Гепта-, Окта-, Нона- ФАН СГ, Дека-ФАН АСКО, Дека-ФАН Лейко, Ікто-ФАН (*La-Chema*, Чехія). На визначення білірубіну не впливає рН сечі, проте її слід оберігати від дії прямого сонячного проміння, оскільки це призводить до заниження показників або отримання негативного результату.

Діагностичне значення білірубінурії. У здорових тварин білірубін у сечі якісними пробами не виявляється. Виділення білірубіну із сечею називають *білірубінурією*. Наявність його в сечі свідчить про глибокі порушення в гепатобіліарній системі, коли кількість кон'югованого білірубіну в крові перевищує рівень ниркового порога. За білірубінурії сеча темніє, набуває жовто-зеленого відтінку, піниться.

Дослідження білірубіну в сечі має важливе значення для диференційної діагностики жовтяниць. Білірубінурія спостерігається за тяжких уражень печінки (гепатит, гепатодистрофія, цироз) та жовчовивідних

шляхів (жовчнокам'яна хвороба, ехінококоз, новоутворення), що супроводжуються розвитком паренхіматозної і механічної жовтяниці. Причиною білірубінурії за паренхіматозної жовтяниці є проникнення кон'югованого білірубіну в кров унаслідок руйнування і некрозу гепатоцитів. За непрохідності жовчних шляхів (механічна жовтяниця) у них виникає застій жовчі, у результаті чого пошкоджуються жовчні капіляри, через які кон'югований білірубін проникає в кров'яне русло, а з кров'ю заноситься в нирки і виділяється із сечею. За гемолітичної жовтяниці білірубінурія відсутня, оскільки у крові нагромаджується лише некон'югований (вільний, непроведений через печінку) білірубін, який не розчиняється у воді і не може виділитися нирками із сечею. Таким чином, білірубінурія властива лише механічній і паренхіматозній жовтяницям (табл. 16.2).

Таблиця 16.2

Диференціація жовтяниць за результатами дослідження сечі

Показник	Жовтяниці		
	гемолітична	паренхіматозна	механічна
Білірубінурія	–	+	+
Уробіліногенурія	+	+	–

Література: [12, С. 345–346; 24, С. 21–23; 38, С. 350–352; 40, С. 184–187; 60, С. 266–267; 81, С. 51–52].

16.5. Визначення уробіліногену і уробіліну та жовчних кислот у сечі

Для якісного визначення уробіліну в сечі існує декілька проб: Флоренса-Комарицина, Богомолова, Шлізінгера. Виявляють уробілінурію також індикаторними смужками відразу після сечовиділення, коли уробіліноген окиснюється в уробілін. Мінімальна кількість уробіліногену в сечі, яку можна виявити індикаторними смужками, становить 17 мкмоль/л (1 мг/100 мл), максимальна – 203 мкмоль/л.

Проба Флоренса-Комарицина. Принцип методу. Для визначення уробілінових тіл у сечі з неї попередньо видаляють білірубін і гемоглобін (за наявності). Для цього до 8 мл досліджуваної сечі додають 2 мл 10% розчину кальцію хлориду (чи барію хлориду) і кілька крапель концентрованого розчину аміаку до лужної реакції. Отриману суміш фільтрують і у фільтраті визначають уробілін. З хлоридною кислотою уробілін утворює сполуку, забарвлену в червоний колір.

Реактиви: 1) концентрована сульфатна (сірчана) кислота; 2) етиловий спирт; 3) концентрована хлоридна (соляна) кислота.

Хід визначення. До 8–10 мл сечі додають декілька крапель концентрованої сульфатної кислоти (для підкиснення), збовтують і додають 1–2 мл етилового або сірчаноокислого ефіру. Пробірку щільно закривають корком і обережно змішують рідини. В іншу пробірку вносять 2–3 мл концентрованої хлоридної кислоти. З першої пробірки піпеткою відбирають ефірну витяжку і нашаровують її на хлоридну кислоту в другій пробірці. На межі двох рідин у присутності уробіліну утвориться рожеве або червонувато-коричневе кільце, інтенсивність забарвлення якого пропорційна вмісту уробіліну в сечі.

Проба Богомолова. Принцип методу. Уробілін із купрум сульфатом утворює сполуку червоно-рожевого кольору.

Реактив: 1) 10% розчин купрум сульфату; 2) хлороформ; 3) хлоридна кислота.

Хід визначення. До 8–10 мл профільтрованої сечі додають 10 крапель 10% розчину купрум сульфату. Якщо після внесення розчину $CuSO_4$ з'являється помутніння внаслідок утворення купрум гідроксиду, додають кілька крапель хлоридної кислоти до просвітління розчину. Через 5 хв добавляють 1–1,5 мл хлороформу. Утворення після перемішування розчину рожево-червоного забарвлення осаду свідчить про уробілінурію.

Діагностичне значення уробіліногенурії. Уробіліноген є похідним проведеного через печінку білірубіну й утворюється в позапечінкових жовчних шляхах і кишечнику з білірубіну під впливом ферментів мікроорганізмів. У кишечнику частина його всмоктується в кров і через ворітну вену надходить у печінку, де повністю руйнується. Таким чином, у здорових тварин уробіліноген не виділяється із сечею.

Основна кількість білірубіну й уробіліногену в кишечнику перетворюється в стеркобіліноген, який майже повністю виділяється з калом. На повітрі стеркобіліноген окиснюється в стеркобілін. Лише незначна кількість його всмоктується в систему каудальної порожнистої вени і виводиться з сечею, але ця кількість настільки мала, що не виявляється якісними методами.

Уробіліноген і стеркобіліноген часто об'єднують в одну групу – уробіліногенових тіл, які на повітрі окиснюються і перетворюються в уробілінові тіла. Підвищення кількості уробіліногенових тіл у сечі, коли вони виявляються за допомогою якісних реакцій, називається *уробіліногенурією*.

Уробіліногенурія є показником паренхіматозної або гемолітичної жовтяниці (див. табл. 16.2). За ураження печінки (паренхіматозна жовтяниця) уробіліноген не повністю руйнується гепатоцитами, заноситься

кров'ю в нирки і виділяється з сечею. Відразу після виділення уробіліноген під дією кисню перетворюється в уробілін.

Збільшення кількості уробіліну в сечі називають *уробілінурією*. Уробіліногенурія спостерігається не лише за паренхіматозної жовтяниці, а й за гемолітичної, коли утворюється велика кількість уробіліногену, який, очевидно, не встигає розщеплюватися в печінці. Окрім того, у кишечнику утворюється багато стеркобіліногену, який, обминаючи печінку, потрапляє в нирки й виводиться із сечею. Виділення стеркобіліногену із сечею спостерігається також у разі кишкових захворювань (ентероколіти, завороти, інвагінація), коли він із товстих кишок всмоктується у кров і надходить у нирки.

Відсутність уробіліногену в сечі за збільшення вмісту білірубину в крові і сечі свідчить про наявність в організмі механічної жовтяниці. Після усунення механічної перешкоди в жовчному протоці виникає уробілінурія, яка є сприятливим показником.

Визначення вмісту жовчних кислот у сечі. Наявність жовчних кислот у сечі визначають за допомогою проб, які знижують її поверхневий натяг. До них належать проба Гай-Крафта з порошком сірки та проба з метиленовим синім. Збільшення вмісту жовчних кислот у сечі спостерігається за паренхіматозної і механічної жовтяниць, коли розвивається синдром холемії.

Проба Гай-Крафта. На поверхню сечі в пробірку насипають щіпку сірчаного цвіту в порошок. Якщо сірчаний цвіт не тоне, значить жовчні кислоти відсутні. Швидке занурення сірчаного цвіту на дно пробірки вказує на вміст у сечі більше 0,01% жовчних кислот.

Проба з метиленовим синім. В одну пробірку наливають дистильовану воду, у другу – сечу. Додають по 1 краплі 0,2% розчину метиленового синього. У разі позитивної реакції у пробірці з сечею з'являється зелене забарвлення.

Література: [24, С. 23–25; 38, С. 351–352; 49, С. 40–44; 60, С. 267–268; 81, С. 46–53].

16.6. Визначення вмісту крові і кров'яних пігментів у сечі

У сечі можуть виявлятися кров і кров'яні пігменти (гемоглобін, метгемоглобін, гемосидерин, сульфогемоглобін), а також білок м'язів – міоглобін. У здорових тварин мікроскопією осаду сечі можна виявити лише поодинокі еритроцити. Наявність крові в сечі називають *гематурією*. Візуально домішки крові в сечі (*макрогематурію*) можна виявити за вмісту

в 1 мкл 25 тис. еритроцитів. Сеча в такому випадку набуває червоного кольору і в ній утворюється осад згустку крові.

Якщо кров не змінює колір сечі і її виявляють лише за допомогою хімічних реакцій чи мікроскопії осаду, то це свідчить про розвиток *мікрогематурії*. Якісне визначення крові та її пігментів проводять за допомогою бензидинової проби та реакції з гваяковим настоєм. Індикаторними смужками можна також визначити кількість крові та її пігментів у сечі, а більш точно концентрацію гемоглобіну визначають геміглобінціанідним методом.

16.6.1. Якісні реакції на кров

Бензидинова проба. *Принцип методу.* В основі проби лежить здатність пігментів крові забирати кисень (кисень) від його носіїв і легко передавати його бензидину, який у результаті реакції окиснюється (гемоглобін руйнує гідрогену пероксид, а кисень, що вивільняється, окиснює бензидин).

Приготування реактиву. Невелику кількість бензидину (набирають на кінчик скальпеля) розчиняють у 0,5 мл льодяної оцтової кислоти і до суміші додають 5 мл 3% розчину гідрогену пероксиду. Реактив готується перед використанням.

Хід визначення. У пробірку наливають 1–2 мл реактиву і обережно піпеткою нашаровують 1–2 мл сечі. За наявності в сечі пігментів крові на межі рідин утворюється смарагдово-зелене кільце, а рідина у пробірці поступово набуває зеленого, а згодом – синього забарвлення. *Проба дуже чутлива.*

Проба Колло (з лужним розчином фенолфталеїну). *Приготування лужного розчину фенолфталеїну.* Розчиняють 2,0 г фенолфталеїну у 100 мл 20% розчину КОН або NaOH. Розчин кип'ятять і за постійного перемішування додають 10,0 г металічного цинку (порошок). Кип'ятіння продовжують до повного знебарвлення розчину. Після охолодження розчин зберігають у флаконі з темного скла.

Хід визначення. У пробірку набирають 1–2 мл сечі, додають 1–2 мл 2% спиртового розчину оцтової кислоти і 2–3 краплі гідрогену пероксиду. До цієї суміші додають 5–10 крапель лужного розчину фенолфталеїну. За наявності у сечі крові рідина у пробірці набуває малинового забарвлення. *Реакція специфічна і дуже чутлива.*

Гваякова проба. *Принцип методу.* Проба ґрунтується на здатності пігментів крові від'єднувати кисень у його носіїв і передавати гваяковій смолі, що легко окиснюється з утворенням білого кільця на межі двох рідин.

Приготування реактиву. 10 крапель 0,5% спиртового розчину гваякової смоли, приготовленого на 90° етиловому спирті, змішують із 10 краплями озонованої терпентинової олії або 5–6 краплями гідрогену пероксиду.

Хід визначення. У пробірку набирають 1–2 мл підкисленої і профільтрованої сечі і обережно нашаровують приготовлену суміш. За наявності у сечі крові на межі двох рідин утворюється біле кільце, яке поступово забарвлюється у темно-синій колір. Під час струшування вся суміш забарвлюється у синій колір.

Визначення міоглобіну в сечі. *Принцип методу* полягає в осадженні міоглобіну амонію сульфатом і властивості міоглобіну набувати червоно-коричневого забарвлення.

Реактив – амонію сульфат кристалічний.

Хід визначення. У 5 мл сечі розчиняють 2,8 г амонію сульфату, суміш фільтрують. Якщо фільтрат набуває червоно-коричневого забарвлення, це означає, що в сечі є міоглобін, а якщо фільтрат не змінює забарвлення, то в сечі – гемоглобін.

Сеча здорових тварин не містить міоглобіну. Наявність міоглобіну в сечі спостерігається за паралітичної міоглобінурії і травм м'язів.

16.6.2. Визначення вмісту гемоглобіну в сечі

Кількість гемоглобіну в сечі визначається геміглобінціанідним та колориметричним (за Салі) методами і експрес-набором Penta-Phan (*La-Chema*, Чехія).

Визначення вмісту гемоглобіну в сечі методом Салі. *Принцип методу.* Гемоглобін у крові в розчині хлоридної (соляної) кислоти перетворюється в солянокислий гематин, який порівнюється з гематином визначеної концентрації, взятої як стандарт.

Обладнання: гемометр Салі, очні піпетки, скляні палички, капіляр на 20 мкл.

Реактив – 0,1 н розчин хлоридної кислоти.

Хід визначення. У середню пробірку (до мітки 2) піпеткою наливають 0,1 н розчин HCl. Капіляром набирають 20 мкл (0,02 мл) сечі, кінчик його витирають ватою і сечу обережно видувають на дно пробірки, а верхнім шаром кислоти промивають капіляр. Обережно перемішують і залишають на 5 хв. Внаслідок гемолізу еритроцитів гемоглобін перетворюється в солянокислий гематин коричневого кольору. У пробірку добавляють краплями дистильовану воду, перемішуючи вміст пробірки скляною паличкою до тих пір, поки колір у ній не порівняється з кольором стандартів. Кількість гемоглобіну у

грамах на 100 мл визначають за нижнім меніском рідини. У міжнародній системі (SI) кількість гемоглобіну визначають у грамах на 1 літр, тому одержаний результат необхідно помножити на 10.

Визначення вмісту гемоглобіну гемігلوبінціанідним методом.

Принцип методу. Гемоглобін, взаємодіючи з калієм ферумоціанистим (червона кров'яна сіль) окиснюється у метгемоглобін, що утворює з ацетонціангідрином кольоровий гемігلوبінціанід, інтенсивність забарвлення якого пропорційна концентрації гемоглобіну.

Обладнання: фотоелектроколориметр, піпетки мірні на 0,02 мл і 5 мл; пробірки; колби мірні на 250 мл та 1 л.

Реактиви: ацетонціангідрин (2 ампули по 0,5 мл – 0,47 г); суміш реактивів (2 флакони по 1,2 г), у тому числі калій ферумоціанистий – 0,2 г, натрій двовуглекислий – 1,0 г; стандартний розчин геміглобінціаніду (зберігається у холодильнику за +4° С).

Хід визначення. До 5 мл робочого розчину в пробірку додають 0,02 мл сечі і перемішують. Через 10 хв записують показники фотоелектроколориметра за довжини хвилі 540 нм (зелений світлофільтр) у кюветі шириною оптичного шару 10 мм відносно контрольної проби (робочий розчин або дистильована вода). За формулою або калібрувальним графіком визначають уміст гемоглобіну в сечі (г/100 мл або г/л):

$$Hb_{(г/100мл)} = \frac{E_{дп}}{E_{см}} \times 59,75 \times 251 \times 0,001,$$

де $E_{дп}$ – екстинція дослідної проби; $E_{см}$ – екстинція стандартного розчину; 59,75 – концентрація геміглобінціаніду в стандартному розчині; 251 – розведення сечі; 0,001 – коефіцієнт для перерахунку мг/100 мл у г/100 мл.

Діагностичне значення визначення пігментів крові. Кров у сечі є давно відомим симптомом. Ще Гіппократ стверджував, що цей симптом є свідченням ураження нирок або сечового міхура. У зв'язку з цим виникає необхідність диференціації причин гематурії.

Ниркову та позаниркову гематурію диференціюють, передусім, так званою “пробою трьох склянок”. Під час кровотечі з уретри кров виявляють лише на початку сечовиділення (перша посудина), за ураження сечового міхура – у кінці його (третя посудина), а за ураження нирок – у всіх трьох посудинах. Крім того, безсумнівний доказ ниркового походження гематурії – наявність в осаді сечі еритроцитарних циліндрів, які є зліпками каналців. Звертають також увагу на співвідношення кількості еритроцитів і білка в сечі. Якщо еритроцитів у сечі міститься мало (10–20 в полі зору), а білка – понад 1 г/л, то гематурія є нирковою. І навпаки, значна кількість еритроцитів у сечі (50–100 і більше в полі зору) у поєднанні з відсутністю еритроцитарних циліндрів і кількістю білка менше 1 г/л є показником позаниркової гематурії.

Гематурія буває *справжньою*, якщо вона виникає в результаті ураження органів сечової системи, і *несправжньою*, коли є наслідком домішування крові із статевих органів. Справжня гематурія буває *нирковою*, *позанирковою* та *змішаною*. *Ниркова* гематурія спостерігається у разі гострого гломерулонефриту, загострення хронічного перебігу гломерулонефриту, за сибірки, чуми свиней, тяжкого перебігу С- і К-гіповітамінозів, деяких інтоксикацій, через застій у нирці хворих із недостатністю серця, за злоякісної пухлини і травм нирок.

Позаниркова гематурія виникає під час запалення й травм сечовивідних шляхів і сечового міхура, сечокам'яної хвороби, гострого пієліту, злоякісних пухлин сечового міхура, хронічної гематурії великої рогатої худоби, яка є, по суті, хронічним запаленням сечового міхура. Це захворювання характеризується кровотечею в порожнину міхура з ерозій, виразок або папіломатозних утворень на його слизовій оболонці.

Виділення із сечею гемоглобіну називають *гемоглобінурією*. Вона буває первинною і вторинною. Первинна гемоглобінурія є наслідком масового гемолізу еритроцитів у кров'яному руслі, коли гемоглобін, що звільняється, не встигає повністю перетворитися в білірубін. Вторинна гемоглобінурія зумовлена виходом гемоглобіну з еритроцитів уже в сечі у процесі розпаду. Первинна гемоглобінурія є важливим симптомом гемолітичної хвороби поросят, післяпологової гемоглобінурії корів, пароксизмальної гемоглобінурії телят, лептоспірозу, кровопаразитарних хвороб (бабезіоз, нуталіоз, піроплазмідоз) та деяких інтоксикацій. Сеча за гемоглобінурії набуває буро-червоного кольору.

Виділення міоглобіну (*міоглобінурія*) зумовлює червоний або темно-коричневий колір сечі. Міоглобінурія спостерігається під час травм м'язів, міопатозу та паралітичної міоглобінурії коней.

Література: [24, С. 26–30; 38, С. 352–354; 60, С. 269–270; 81, С. 48–50].

16.7. Визначення продуктів залишкового азоту в сечі

16.7.1. Визначення залишкового азоту в сечі колориметричним методом із реактивом Неслера

Принцип методу. Метод складається з двох етапів: а) спалювання органічних речовин сечі концентрованою сульфатною кислотою (азот у вигляді аміаку зв'язується нею з утворенням амонію сульфату);

б) колориметричного визначення кількості аміаку, зв'язаного реактивом Неслера; у процесі взаємодії його з амонію сульфатом інтенсивність бурувато-жовтого забарвлення залежить від кількості аміаку й, відповідно, азоту в сечі.

Обладнання. Електроплитка з азбестовою сіткою, КФК, колби К'ельдаля, мірні циліндри на 25 мл.

Реактиви: 1) концентрована сульфатна (сірчана) кислота; 2) пероксид гідрогену; 3) реактив Неслера; 4) стандартний розчин амонію сульфату.

Хід визначення. 1. *Окиснення за методом К'ельдаля.* У колбу К'ельдаля вносять 1 мл розведеної в 10 разів сечі, додають 1 мл концентрованої сульфатної кислоти. Паралельно готують контрольну пробу з дистильованою водою. Обидві колби 40 хв кип'ятять під витяжкою на азбестовій сітці, потім додають по 1–2 краплі пероксиду гідрогену і продовжують спалювання до знебарвлювання вмісту колб. Після охолодження в колби додають по 3 мл дистильованої води і їх вміст зливають у мірні циліндри. Колби два рази змивають дистильованою водою (по 3 мл), збираючи змиви у відповідні мірні циліндри. Потім об'єм рідини в мірних циліндрах доводять до 10 мл і ретельно перемішують скляною паличкою. Так отримують мінералізовану сечу, розведену в 100 разів.

2. *Колориметрування.* Піпеткою із кожного мірного циліндра відбирають по 1 мл мінералізату і переносять у два інших мірних циліндри об'ємом 25 мл, додають по 13 мл дистильованої води та 1 мл реактиву Неслера. У дослідній пробі з'являється жовто-оранжеве забарвлення, оптична щільність якого визначається на КФК за довжини хвилі 430–460 нм у кюветі з робочою товщиною 10 мм проти контрольної проби.

3. *Побудова калібрувальної кривої.* Із основного стандартного розчину амонію сульфату готують серію робочих розчинів з умістом 0,01 мг; 0,02; 0,04; 0,08; 0,12; 0,16 і 0,20 мг азоту в 1 мл. До 1 мл кожного стандартного розчину в мірному циліндрі на 25 мл додають по 13 мл дистильованої води та по 1 мл реактиву Неслера і колориметрують. За показниками оптичної щільності стандартних робочих розчинів будують калібрувальну криву. Знайдений показник залишкового азоту сечі множать на 100 (ступінь розведення сечі).

Вміст загального азоту в добовій сечі (г) розраховують за формулою:

$$X = \frac{C \times B \times D}{1000},$$

де C – вміст азоту в 1 мл розведеної сечі; B – розведення сечі (в 100 разів); D – добовий діурез; 1000 – коефіцієнт перерахунку в грами (із мг).

Діагностичне значення. Амінокислоти, які не використані для синтезу білка й утворені внаслідок його розпаду в організмі, піддаються

гідролізу з утворенням аміаку, вуглекислого газу і води. Частина аміаку виділяється з сечею у вигляді солей амонію, він також використовується для синтезу сечовини в печінці, яка є основним кінцевим продуктом обміну простих білків. Кінцевим продуктом розпаду складних білків – нуклеопротейнів, крім сечовини, є сечова кислота.

Залишковий азот – це сума азотовмісних речовин сечі (азоту сечовини, сечової кислоти, креатину, креатиніну, амінокислот, амонійних солей та ін.). Відомо, що 100 г білка містить 16 г азоту. Знаючи кількість азоту в сечі, можна розрахувати кількість використаного білка в організмі. 80–90% азоту, який виділяється з організму, складає азот сечовини. Зміни в кількісному і якісному складі азоту сечі дають можливість робити висновки про стан білкового обміну в організмі, функціональний стан печінки, нирок, де утворюються азотисті речовини сечі. Зменшення кількості загального залишкового азоту в сечі, а також окремих його складових (сечовина, креатинін) свідчить про порушення фільтраційної здатності базальної мембрани гломерулярних капілярів, що спостерігається за нефротичного та гепаторенального синдромів у високопродуктивних корів, а також у телят, хворих на колібактеріоз. При цьому кількість залишкового азоту в крові зростає.

Література: [24, С. 30–32].

16.7.2. Визначення сечовини в сечі (за колірною реакцією з діацетилмонооксимом)

Принцип методу. Діацетилмонооксим у кислому середовищі гідролізується до діацетилу, який, реагуючи з сечовиною, утворює комплекс червоно-рожевого забарвлення, що має максимальне поглинання за довжини хвилі 520 нм.

Обладнання: КФК-2, КФК-3, водяна баня, піпетки на 0,2; 1 і 5 мл.

Реактиви: 1) кислий реагент – 100 мл – 0,06% розчин H_3PO_4 ; 10% розчин H_2SO_4 ; 0,003% $FeCl_3$; 2) кольоровий реагент – 50 мл – 0,17% розчин діацетилмонооксиму (ДАМО); 0,04% розчин тіосемікарбазиду; 3) стандарт сечовини (16,65 ммоль/л) – 2 мл.

Використовують набір реактивів НВФ “Simko-Ltd”, м. Львів.

Хід визначення. Перед дослідженням сечу розводять дистильованою водою у співвідношенні 1:10. До 0,02 мл розведеної сечі додають 1 мл кольорового реагенту (№ 2) і 2 мл кислого реагенту (№ 1). Пробірки щільно закривають гумовими корками, які обгорнуті алюмінієвою фольгою, та інкубують точно 10 хв у киплячій водянній бані. Потім пробірки швидко охолоджують під струменем холодної води і не пізніше 10 хв визначають

оптичну густину досліджуваних зразків і стандарту за довжини хвилі 490–540 нм (максимальне поглинання 520 нм) проти контролю. Аналогічно обробляють 0,02 мл стандарту сечовини і контроль – 0,02 мл дистильованої води. Розрахунок проводять за формулою:

$$\text{Сечовина (ммоль/л)} = 16,65 \times 10 \times \frac{E_{\text{дп}}}{E_{\text{ст}}},$$

де $E_{\text{дп}}$ – екстинція дослідної проби; $E_{\text{ст}}$ – екстинція стандартного розчину; 16,65 – концентрація сечовини в стандартному розчині, ммоль/л; 10 – коефіцієнт розведення сечі.

П р и м і т к и: 1. Об'єми досліджуваних проб і реагентів можна пропорційно зменшувати чи збільшувати. Наприклад: до 0,01 мл розведеної сечі (10 мкл) додають 0,5 мл кольорового реагенту (№ 2) і 1 мл кислого реагенту (№ 1). Обробляють, як написано вище (див. хід визначення). Як альтернативний варіант перед проведенням дослідів можна змішати 1 об'єм кольорового реагенту (№ 2) з 2 об'ємами кислого реагенту (№ 1) 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. Приготування реактивів наведено в посібниках:
а) Клиническая лабораторная диагностика в ветеринарии : справочное изд. / [И.П. Кондрахин, Н.В. Курилов, А.Г. Малахов и др.]. – М. : Агропромиздат, 1985. – С. 75–76; б) Методы ветеринарной клинической лабораторной диагностики: Справочник / [И.П.Кондрахин, А.В. Архипов, В.И. Левченко и др.]. ; под ред. проф. И.П. Кондрахина. – М. : КолосС, 2004. – С. 100–101.

Стабільність досліджуваних проб. Сечовина в дослідних пробах зберігається до 8 год за кімнатної температури, до 72 год – за 2–8° С, до 6 міс. – у замороженому стані.

Література: [24, С. 32–33; 60, С. 100–101].

16.7.3. Визначення сечовини в сечі (за методом Марш)

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

Обладнання: КФК, водяна баня, центрифуга, піпетки на 0,2; 1 і 2 мл.

Реактиви: 1) 10% розчин трихлороцтової кислоти (ТХОК), ч; 2) 2,5% розчин діацетилмонооксиму, чда (готують змішуванням 0,25 г реактиву і 9,75 мл дистильованої води); 3) 0,25% розчин тіосемикарбазиду, чда (0,25 г реактиву розчиняють у дистильованій воді і доводять водою до 100 мл); 4) основний розчин феруму хлориду готують розчиненням 5 г феруму хлориду (хч, чда) в 100 мл дистильованої води, потім додають 1 мл концентрованої сульфатної кислоти; 5) робочий розчин феруму хлориду: 1 мл основного розчину феруму хлориду доводять до 100 мл дистильованою водою, додають 8 мл концентрованої сульфатної і 1 мл 85% розчину ортофосфатної кислот (хч, чда). Зберігають у темному місці до 2-х тижнів; 6) колірний реактив (до 30 мл робочого розчину феруму хлориду додають 20 мл дистильованої води, 1 мл 2,5% розчину діацетилмонооксиму і 0,25 мл розчину тіосемикарбазиду). Колірний 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. Сечу фільтрують, потім готують розведення 1:25 або 1:50. У центрифужну пробірку вносять 0,8 мл дистильованої води, 0,2 мл розведеної сечі і 1 мл трихлороцтової кислоти, перемішують і через 10–20 хв центрифугують 15–20 хв рf 3000 об/хв. У пробірку відбирають 0,5 мл надосадової рідини і додають 5 мл колірного реактиву. Пробірку закривають корком, обгорнутим фольгою, витримують у киплячій водяній бані точно 20 хв і охолоджують 2–3 хв струменем води з крана. Не пізніше ніж через 15 хв вимірюють екстинцію проби на КФК за довжини хвилі 500–600 нм відносно контролю у кюветі з 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:

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

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

Результат множать на ступінь розведення.

Діагностичне значення. У сечі здорових високопродуктивних корів міститься 170–220 ммоль/л сечовини, у телят 20-денного віку – від 144 до 328, 30-денного – 78–260 ммоль/л [18], у коней – 25,0–600,0 ммоль/л [28]. Уміст сечовини в сечі залежить від складу і кількості спожитого тваринами корму, є важливим діагностичним тестом функції печінки, де вона синтезується, і нирок, через які вона виводиться. Найчастіше зустрічається зменшення вмісту сечовини, що свідчить про ураження нирок. У разі гострої ниркової 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. За хронічного перебігу гломерулонефриту та в азотемічній стадії нефротичного синдрому вміст сечовини в сироватці крові підвищується до 13–15 ммоль/л, а в термінальній стадії хронічної ниркової недостатності – до 30–35 ммоль/л. Кількість азоту сечовини у фракції залишкового азоту збільшується до 90%. Об'єктивно оцінити здатність нирок до екскреції сечовини можна за допомогою визначення фактора концентрації сечовини (ФКС), який вираховується відношенням кількості виділеної нирками сечовини до її вмісту у сироватці крові:

$$\text{ФКС} = \text{Сечовина сечі, ммоль/л} : \text{сечовина крові, ммоль/л.}$$

У клінічно здорових високопродуктивних корів протягом перших трьох місяців після отелення ФКС знаходиться у межах 31,0–90,0, тоді як за нефротичного синдрому цей коефіцієнт знижується у 95–100% тварин до 6–35,7 (19,4±3,6) у глибокотільних і 7,5–53 (25,6±2,6) – у дійних корів. У процесі розвитку гепаторенального синдрому виведення сечовини нирками у глибокотільних корів зменшується на 25%, а у дійних – на 27,5%, при цьому фактор концентрації сечовини вірогідно знижується у корів обох фізіологічних груп (23,1±2,4 у сухостійних, 26,7±2,1 – у дійних). Ці зміни є об'єктивним показником порушення екскреторної функції нирок. У телят, хворих на колібактеріоз, здатність нирок екскретувати сечовину на 3-й день хвороби зменшується до 6–13 ммоль/л, тоді як у міру видужання ФКС поступово зростає і досягає рівня здорових телят (Вовкотруб Н.В., 2005) [18].

Література: [18; 24, С. 33–35; 28].

16.7.4. Визначення креатиніну в сечі (за колірною реакцією Яффе)

Креатинін є кінцевим продуктом розщеплення креатину, який відіграє важливу роль в енергетичному обміні м'язової тканини. Креатин починає синтезуватися в нирках, а закінчується в печінці, звідки він надходить у м'язову тканину і мозок. Тут він фосфорилується й перетворюється в креатинфосфат – сполуку, яка багата на макроергічні зв'язки і є джерелом енергії, необхідної для скорочення м'язів.

Принцип методу. Креатинін у лужному середовищі реагує з пікриновою кислотою з утворенням сполуки оранжево-червоного кольору, що має максимум поглинання за довжини хвилі 510 нм. Інтенсивність забарвлення пропорційна концентрації креатиніну.

Обладнання: фотоелектроколориметр, водяна баня.

Реактиви (склад набору): 1) реагент 1 (10% розчин NaOH) – 105 мл; 2) реагент 2 (насичений розчин пікринової кислоти) – 105 мл; 3) реагент 3 (креатинін, 440 мкмоль/л) – 5 мл.

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

Хід визначення. Сечу розводять дистильованою водою в 10 разів. Змішуванням одного об'єму реагенту 1 з одним об'ємом реагенту 2 готують робочий реактив (зберігає стабільність не менше 4 год за кімнатної температури). До 0,1 мл розведеної сечі додають 2 мл робочого реактиву. Перемішують, інкубують протягом 15 хв у водяній бані за температури 37° С. Аналогічно обробляють 0,1 мл реагенту № 3 (креатинін-еталон з концентрацією 440 мкмоль/л) та 0,1 мл дистильованої води (контроль).

Щодо контролю відразу визначають оптичну густину креатинін-еталона і досліджуваних проб за довжини хвилі 490–510 нм. Стабільність кінцевої реакції зберігається не більше 30 хв.

Розрахунок проводять за формулою:

$$\text{Креатинін (мкмоль/л)} = \frac{E_{np}}{E_{em}} \times 5 \times 10 \times 88,6,$$

де E_{np} – екстинція досліджуваної проби (розведеної в 10 разів сечі); E_{em} – екстинція креатинін-еталона (реагент № 3); 5 – концентрація креатиніну в реагенті № 3, виражена мг/100 мл; 10 – фактор розведення сечі перед аналізом; 88,6 – коефіцієнт перерахунку мг/100 мл в мкмоль/л.

Приклад: Поглинання досліджуваної проби – 0,275.

Поглинання креатинін-еталона – 0,279.

Вміст креатиніну в досліджуваній пробі буде:

$$0,275 : 0,279 \times 5 \times 10 \times 88,6 = 4366,5 \text{ мкмоль/л.}$$

Кліренс креатиніну розраховують за формулою:

$$\text{Кліренс (мл/хв)} = \frac{\text{Креатинін сечі (мг/дл)} \times \text{об'єм сечі (мл/хв)}}{\text{Креатинін сироватки (мг/дл)}}.$$

Приклад. Концентрація креатиніну в сечі = $0,275 : 0,279 \times 5 \times 10 = 49,3$ мг/дл.

Концентрація креатиніну сироватки = 124 мкмоль/л або 1,4 мг/дл.

Об'єм сечі (мл/хв) = $1900 \text{ мл} : 1440 \text{ хв} = 1,32$ мл/хв..

Кліренс креатиніну = $49,3 \times 1,32 : 1,4 = 46,48$ мл/хв.

П р и м і т к а. 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.

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 метиленовою групою, глюкоза, стабілізатори, що присутні у комерційних сироватках, деякі ліки та інші речовини завищують результати.

Стабільність досліджуваних зразків. Креатинін зберігається в сечі протягом тижня за 0–8° С або до 3 міс. – у замороженому стані. Добову сечу стабілізують додаванням 15 г борної кислоти.

Діагностичне значення. Визначення креатиніну широко використовують у клінічній практиці як показник кліренсу нирок, який вказує на кількість плазми або сироватки крові, що за одиницю часу повністю очищається від введеної речовини. Вміст креатиніну в сироватці крові збільшується, а в сечі знижується внаслідок порушення фільтраційної функції нирок, оскільки креатинін, що фільтрується у первинну сечу, не реабсорбується у каналцях і повністю екскретується з сечею. Креатинінемія спостерігається за гострої ниркової недостатності, м'язових дистрофій, колік.

Концентрація креатиніну в сечі клінічно здорових високопродуктивних глибокотільних корів становить 5,5–14,0 ммоль/л (в середньому $10,8 \pm 1,5$), у дійних – 9,2–13,7 ммоль/л ($11,4 \pm 0,6$) [18], у коней – 7,4–35,8 ммоль/л [28].

За нефротичного синдрому вміст креатиніну в сечі зменшується у 87,5–95% корів; у глибокотільних – до $7,4 \pm 0,9$; дійних – до $4,4 \pm 0,5$ ммоль/л. У корів з ознаками гепаторенального синдрому концентрація креатиніну в сечі становить 5,0–6,0 ммоль/л.

Відношення між кількістю креатиніну в сечі і крові – *концентраційний індекс (КІ)* креатиніну – характеризує концентраційну функцію нирок:

$$KI = \text{Креатинін у сечі (мкмоль/л)} : \text{креатинін у крові (мкмоль/л)}.$$

У людей концентраційний індекс перевищує 60. Величина його у сухостійних корів, хворих на жирову гепатодистрофію, зменшується до $27,6 \pm 3,0$ (13,6–45,4) проти $66,2 \pm 9,9$ (36,0–90,0) – у клінічно здорових. У дійних корів цей показник ще менший і становить $23,4 \pm 2,0$ (6,4–48,7)

проти $72,7 \pm 5,9$ ($51,0-99,7$) – у клінічно здорових. Про порушення концентраційної функції нирок за нефротичного синдрому свідчить вірогідне зниження концентраційного індексу креатиніну (КІ) майже удвічі у сухостійних корів і в 3 рази – у корів у період ранньої лактації порівняно з клінічно здоровими. У телят, хворих на колібактеріоз, клубочкова фільтрація в нирках зазнає значних змін, на що вказує зниження КІ до $25,8 \pm 5,6$ порівняно з $58,4 \pm 14,4$ – у клінічно здорових (Вовкотруб Н.В., 2005) [18].

Література: [18; 24, С. 35–37; 25, С. 23–24; 28].

16.7.5. Визначення індикану в сечі

Індикан утворюється в організмі внаслідок гнильних процесів у кишечнику і розпаду білків тканин організму. З амінокислоти триптофану під впливом ферментів гнильних бактерій утворюється *індол*, який надходить у печінку й окиснюється в індоксил, а потім знешкоджується внаслідок утворення з активованою сульфатною кислотою парної сполуки – індоксилсульфатної кислоти. Утворена сполука виводиться із сечею у вигляді калійної солі, яка й називається *індиканом*.

У клінічній практиці індикан у сечі визначають якісними пробами Обермайєра і Яффе, які ґрунтуються на перетворенні індикану під дією кислоти в індоксил, що окиснюється з утворенням синього або червоного індиго. Кількість індикану в сечі визначають за колірною реакцією Розе.

Проба Яффе. Принцип методу. Внаслідок дії на сечу концентрованої сульфатної кислоти індоксилсульфатна кислота гідролізується в індоксил, який у разі додавання хлороформу і розчину калію перманганату окиснюється в синє індиго. Інтенсивність забарвлення хлороформу синім індиго залежить від концентрації індикану в сечі.

Реактиви: 1) концентрована сульфатна кислота; 2) хлороформ; 3) 2% розчин калію перманганату; 4) гіпосульфїт кристалічний.

Хід визначення. До 8–10 мл сечі додають рівний об'єм концентрованої сульфатної кислоти, 1–2 мл хлороформу і 1–2 краплі 2% розчину калію перманганату. Пробірку щільно закривають корком і перемішують, перевертаючи її. У присутності індикану хлороформ забарвлюється в блакитний, синій або рожевий кольори. За наявності в сечі йодистих солей також утворюється рожеве забарвлення, яке зникає після додавання кристаліка гіпосульфїту, що використовується для диференціювання індикану від йодидів. Інтенсивність забарвлення оцінюють у плюсах: різко позитивна реакція (++++) має фіолетове

забарвлення; позитивна (+++) – різко-синє і синє (++); слабопозитивна (+) – блідо-синє.

Проба Обермайєра. *Принцип методу.* Аналогічний пробі Яффе.

Реактиви: 1) суміш із 0,2–0,4 г феруму хлориду і 100 мл концентрованої хлоридної кислоти (реактив нестійкий); 2) хлороформ.

Хід визначення. До 10 мл сечі додають однакову кількість реактиву 1 і через 5 хв – 1–2 мл хлороформу. Пробірку закривають корком і перемішують кілька разів. Синє забарвлення хлороформу вказує на наявність у сечі індикану.

Діагностичне значення індиканурії. Кінь за добу виділяє із сечею від 0,78 до 2,0 г індикану, собаки – від 10 до 43 мг (Синьов А.В.). Збільшення його кількості в сечі, за якої якісні проби стають позитивними, називають *індиканурією*. Індиканурія за патології має кишкове або тканинне походження. Кишкова індиканурія виникає внаслідок атонії, непрохідності та запальних процесів у кишечнику, особливо за інтенсивного розвитку в ньому гнильної мікрофлори, що спричиняє гниття білків корму. Значне збільшення вмісту індикану в сечі є ознакою розвитку гнильних процесів у кишковому каналі або перитоніту. Тканинна індиканурія спостерігається під час розпаду пухлин, травматичного перикардиту, гангрені легень, великих абсцесів та септичного стану. На відміну від кишкової індиканурії, за тканинної, окрім індикану, в сечі виявляють альбумози.

Література: [24, С. 38–39; 49, С. 44–46; 60, С. 270–271; 81, С. 50].

16.8. Визначення макроелементів у сечі

16.8.1. Визначення хлоридів у сечі (за Фольгардом)

Принцип методу. Натрію хлорид сечі осаджується розчином срібла (аргентуму) нітрату у вигляді нерозчинного аргентуму хлориду. Частку аргентуму нітрату, яка не вступила в реакцію з хлоридами сечі, визначають титруванням розчином амонію роданіду. Інтенсивне червоне забарвлення, яке утворюється в результаті взаємодії сульфатнокислого оксиду заліза з амонію роданідом, свідчить про закінчення реакції.

Обладнання: бюретки, пробірки, піпетки, колби.

Реактиви: 1) титрований 0,1 н розчин аргентуму нітрату (16,994 г на 1 л дистильованої води); 2) титрований 0,1 н розчин амонію роданіду: 8 г амонію роданіду розчиняють у 900 мл дистильованої води, потім цим розчином титрують із бюретки суміш (складається із 20 мл титрованого

розчину аргентуму нітрату і 5 мл розчину залізо-аміачного галуу), підкислену азотною кислотою до знебарвлення. Титрування проводиться до появи слабого червоного забарвлення всієї рідини. На осадження 20 мл титрованого розчину аргентуму нітрату необхідно використати 20 мл амонію роданіду. Якщо кінцева реакція настає раніше, то розчин амонію роданіду доливають дистильованою водою до потрібної концентрації і титрують знову; 3) насичений розчин галуу ферумаміачного; 4) розведена нітратна (азотна) кислота (щільність 1,2).

Хід визначення. У мірну колбу на 100 мл наливають 10 мл досліджуваної сечі, яку попередньо підкислюють 2–5-ма краплями нітратної кислоти, додають 2 мл розчину галуу ферумаміачного. Сеча коней набуває червоно-бурого забарвлення, для зменшення інтенсивності якого необхідно додавати 10–15 крапель розчину калію марганцевокислого. Якщо забарвлення не змінюється, то сечу підігрівають на водяній бані.

Для осадження всього хлору у вигляді нерозчинного аргентуму хлориду до безбарвної сечі додають 15–20 мл титрованого розчину аргентуму нітрату і доливають дистильованою водою до 100 мл. Уміст закритої колби струшують і після 5-хвилинного відстоювання фільтрують через сухий фільтр до прозорого фільтрату. Титрують 50 мл такого амонію фільтрату роданідом до легкого червонуватого забарвлення.

Розрахунок. Наприклад, на титрування 50 мл фільтрату використано 6 мл розчину амонію роданіду. Тоді на титрування фільтрату, який містить всю кількість взятої на аналіз сечі, потрібно було б 12 мл. Оскільки 1 мл амонію роданіду відповідає 1 мл титрованого розчину аргентуму нітрату, то із 20 мл доданого до сечі розчину аргентуму тільки 12 мл вступили в реакцію з амонієм роданідом, а інші 8 мл розчину аргентуму витрачено на зв'язування натрію хлориду. Таким чином, уміст натрію хлориду буде становити:

$$X = \frac{0,1 \times 8 \times 100}{10} = 8 \%$$

На відміну від сечі коней, сечу собак обробляють дещо по-іншому. Підкислені 20 мл сечі розводять 60 мл дистильованої води і додають 5–8 г вільного від хлору цинкового пилу, 1,5 мл розведеної сульфатної кислоти (1:5), після чого нагрівають протягом 60 хв на водяній бані. Гарячу рідину фільтрують із повторним промиванням киплячою водою і, підкисливши фільтрат хлоридною кислотою, визначають у сечі вміст натрію хлориду.

Література: [24, С. 39–40].

16.8.2. Визначення хлоридів у сечі наборами реактивів

Принцип методу. В основі методу лежать наступні реакції: хлоридний іон витісняє роданідний аніон ртуті. Роданідні іони, які вивільнюються, утворюють з іонами феруму кольоровий комплекс, що максимально поглинає світло за довжини хвилі 480–510 нм, інтенсивність забарвлення якого прямо пропорційна концентрації хлоридних іонів у пробі.

Обладнання. Фотоелектроколориметр (КФК-2, КФК-3) або спектрофотометр; пробірки; піпетки на 0,1 і 5 мл.

Реактиви: 1) реагент № 1 – 1 флакон; 2) реагент № 2 – 50 мл; 3) 0,1 М (100 ммоль/л) розчин NaCl – 1 мл.

*Використовують набір фірми “Simko-Ltd”.**

Приготування робочого розчину хлориду-реагенту. Вміст флакона з реагентом № 1 розчиняють за інтенсивного перемішування у 80 мл гарячої дистильованої води (70–90° С). Одержаний розчин охолоджують до кімнатної температури і до нього додають реагент № 2 (50 мл), перемішують. За необхідності – профільтрувати. Після цього доводять дистильованою водою до кінцевого об'єму 150 мл. Реактив зберігають за кімнатної температури (18–25° С) у посуді з темного скла. Реактив має бути блідо-жовтого забарвлення, прозорий. За наявності незначного осаду реактив фільтрують. Реактив не придатний для використання, якщо він мутніє або змінюється його забарвлення на червоно-коричневе.

Хід визначення. Визначення хлоридів у сечі проводять за схемою (табл. 16.3).

Таблиця 16.3

Схема визначення хлоридів у сечі

Реактив, мл	Проба	Стандарт	Контроль
Хлорид-реагент	3,0	3,0	3,0
Сеча	0,02	–	–
0,1 М розчин NaCl	–	0,02	–
Дистильована вода	–	–	0,02

Перемішати і через 5 хв визначити оптичну щільність проб та стандарту щодо контролю за довжини хвилі 480–510 нм у кюветі на 1 см

- П р и м і т к и:**
1. Використовують тільки “негемолізовану” сечу.
 2. Реакція в діапазоні 80–120 ммоль/л.
 3. Проби сечі з концентрацією вище 120 ммоль/л розводять дистильованою водою у 2 рази і знову проводять визначення. Результат множать на 2.
 - 4*. Приготування реактивів наведено в: Young D.S., Pestaner L.C., Gibberman V. *Clinical Chematologi.* – 1975. – V. 21. – P. 277.

Кількість хлоридів у сечі розраховують за формулою:

$$\text{Хлориди (ммоль/л)} = \frac{E_{np}}{E_{cm}} \times 100,$$

де E_{np} – екстинція проби; E_{cm} – екстинція стандарту; 100 – концентрація NaCl у стандартному розчині (ммоль/л).

Діагностичне значення. У нормі, за Френером, за добу виділяється із сечею натрію хлориду: в коней – 25–35 г, собак – 0,25–5 г, в інших домашніх тварин – 0,6–0,9%. Із організму велика кількість хлоридів виділяється з сечею у вигляді натрію хлориду. Виділена кількість цієї речовини залежить від різних причин: вмісту його в кормах, воді, видільної здатності нирок, різних захворювань, які супроводжуються лихоманкою, розвитком запальних набряків і накопиченням у порожнинах ексудатів. Кількісне визначення хлоридів у сечі має велике значення у разі отруєнь тварин кухонною сіллю.

Література: [24, С. 40–41; інструкція до набору реактивів].

16.8.3. Визначення кальцію в сечі

Принцип методу. Іони кальцію в лужному середовищі реагують з о-крезолфталеїнкомплексоном з утворенням кольорового комплексу. Інтенсивність фіолетового кольору комплексу пропорційна концентрації кальцію в дослідній пробі.

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

Реактиви: 1) хромоген (о-крезолфталеїнкомплексон – $0,12 \pm 0,01$ ммоль/л; 8-оксихінолін – $16,0 \pm 0,16$ ммоль/л; хлоридна (соляна) кислота – $60,0 \pm 6,00$ ммоль/л) – 1 флакон ($120,0 \pm 4,0$) мл; 2) буфер (моноетаноламін – $0,8 \pm 0,08$ моль/л) – 1 флакон ($120,0 \pm 4,0$) мл; 3) калібрувальний розчин кальцію ($2,5 \pm 0,05$ ммоль/л) – 1 флакон ($5,0 \pm 0,5$ мл).

Використовують набір реактивів ТОВ НВП “Філісіт-Діагно-стика”.

Хід визначення. Визначення кальцію в сечі проводиться за схемою (табл. 16.4).

Схема визначення кальцію в сечі

Реактив, мл	Дослідна проба	Контроль	Стандартна проба
Хромоген	2,5	2,5	2,5
Сеча	0,05	–	–
Стандартний розчин	–	–	0,05
Буфер	2,5	2,5	2,5

Перемішують, витримують 10 хв за кімнатної температури. Визначають оптичну щільність (не пізніше 30 хв) дослідної і стандартної проб щодо контролю за довжини хвилі 550–590 нм у кюветі з товщиною робочого шару 0,5 або 1 см

- П р и м і т к и:**
- Об'єми досліджуваних зразків та реагентів можна пропорційно зменшувати або збільшувати.
 - Якщо концентрація кальцію у сечі перевищує 4 ммоль/л, її розводять дистильованою водою у співвідношенні 1:1, а отриманий результат множать на 2.
 - Кювети і посуд, що використовують під час аналізу, мають бути чистими, спеціально підготовленими (поміщають на кілька годин у хлоридну кислоту, після чого ретельно промивають і сушать).

Уміст кальцію в сечі визначають за формулою:

$$\text{Кальцій (ммоль/л)} = \frac{E_{np}}{E_{cm}} \times 2,5,$$

де E_{np} – екстинція дослідної проби; E_{cm} – екстинція стандартної проби; 2,5 – коефіцієнт перерахунку в ммоль/л.

Для розрахунку концентрації кальцію у добовій сечі отримане вище значення (ммоль/л) множать на об'єм добової сечі, виражений у літрах, і отримують кількість кальцію (ммоль/добу).

Діагностичне значення визначення кальцію в сечі. Збільшується кількість кальцію в сечі за ниркової гіперкальціурії, уролітіазу, спадкових аномалій нирок, надлишку кальцію та оксалатів у раціоні, гіперкальціємічних остеопатій, гіперпаратиреозидизму.

Література: [24, С. 42–43].

16.9. Визначення ферментів у сечі

Ферментурія – підвищена екскреція з сечею ферментів. У кінцевій сечі міститься до 40 різних ферментів. У фізіологічних умовах із плазми в сечу через клубочковий фільтр екскретуються лише ті ферменти, молекулярна маса яких не перевищує 70 кілодальтон (лізоцим, урокіназа, амілаза, ліпаза), а ферменти з вищою молекулярною масою, наприклад аланінамінопептидаза (ААП), ЛДГ, виявляються в сечі тільки за підвищеної проникності базальної мембрани капілярів клубочків. За незміненої каналцевої реабсорбції такі низькомолекулярні ферменти, як лізоцим, урокіназа повністю реабсорбуються, тому їхня екскреція з сечею є одним із критеріїв тубулярних уражень.

Основне джерело ферментів у сечі – клітини каналцевого епітелію, які під час злушення потрапляють у просвіт каналців, де руйнуються і виділяють ферменти, що містяться в них. Частина ферментів реабсорбується, частина руйнується, інші екскретуються з сечею. Тому ступінь ферментурії може бути зумовлений як ураженням клубочкового фільтра (надходження ферментів з крові), так і пошкодженням каналцевого епітелію (дистрофія, некробіоз). На активність ферментів впливають також довготривалість зберігання, величина рН сечі, температура та ін. За бактеріурії слід враховувати можливість потрапляння в сечу мікробних ферментів. Ферментативна активність клітин епітелію сечових шляхів є незначною.

Констатація певного виду ферментурії є надзвичайно важливим діагностичним тестом для уточнення характеру і місця ураження нирок, визначення прогнозу захворювання. Слід відмітити, що, на відміну від ферментів сечі, активність ферментів крові за захворювань нирок практично не змінюється і не є інформативним тестом їх ураження.

Ферментурія слабо корелює з протеїнурією, тому порушення процесу гломерулярної фільтрації не є основною причиною гіперферментурії.

Залежно від глибини ураження в сечу виділяються ферменти, що мають різну внутрішньоклітинну локалізацію. За незначного ураження клітин зростає активність ензимів, пов'язаних із щітковою каймою (нейтральна α -глюкозидаза, гамма-глутамілтранспептидаза, лужна фосфатаза); за значного пошкодження зростає активність цитоплазматичних (ЛДГ, малатдегідрогеназа) та лізосомальних (N-ацетил- β -D-глюкозамінідаза, арилсульфатаза, β -глюкуронідаза, холінестераза) ферментів. Значне зростання активності мітохондріальних ензимів зумовлено некрозом клітин, що підтверджується у процесі морфологічного дослідження ниркової тканини.

Гамма-глутамілтранспептидаза (ГГТП), або гамма-глутамілтрансфераза (ГГТ) містяться майже у всіх органах, найбільша активність відмічається у тканині нирок, де фермент розташований переважно в клітинах проксимальних звивистих каналців та в низхідній частині петлі Генле. Незважаючи на високу активність ензиму в нирках, визначення активності ГГТП у сироватці крові проводять переважно для діагностики захворювань печінки та жовчного міхура. Активність ГГТП в сечі корелює з активністю патологічного процесу в нирках, оскільки цей фермент локалізується в щіткоподібній каймі лише у 67% випадків, а в інших пов'язаний з мембраною ендоплазматичного ретикулума.

Лужна фосфатаза (ЛФ) широко розповсюджена у тканинах людини і тварини. Фермент розташований на клітинній мембрані, де бере участь у транспорті фосфату в клітину. Розрізняють 5 тканинно-специфічних ізоферментів лужної фосфатази: плацентарний, кістковий, печінковий, кишковий і нирковий. У нирці ЛФ розміщена в кірковому шарі і досить міцно зафіксована на матриксі мембран щіткоподібної кайми нефротелію. Визначення ЛФ у сечі використовують як тест на пошкодження цитомембран, у першу чергу, кіркових структур нирки.

Найчутливішим тестом є визначення в сечі ізоензимів (4-та і 5-та фракції) лактатдегідрогенази (ЛДГ), яка міститься в цитоплазмі клітин. У нирковій тканині активність ЛДГ практично рівномірно розподіляється між кірковим та мозковим шарами нирок. Як правило, активність ЛДГ у сироватці крові за гострих та хронічних захворювань нирок не виходить за межі норми, а зростання активності ферменту в сечі констатовано практично за всіх відомих уражень нирок: гострий та хронічний гломерулонефрит, гострий та хронічний пієлонефрит, сечокам'яна хвороба, медикаментозне ураження нирок, діабетична нефропатія, рак сечового міхура, карцинома нирки. Встановлено, що визначення ізоензимів ЛДГ і підрахунок клітинних елементів в сечі є важливими маркерами ураження нирок у доповненні до визначення білка в сечі, який є, в основному, показником клубочкових пошкоджень.

Література: [12, С. 215–228; 329–330; 24, С. 43–45].

16.9.1. Визначення активності гамма-глутамілтранспептидази в сечі

Принцип методу. Гамма-глутамілтранспептидаза (ГГТП) каталізує реакцію перенесення L-γ-глутамінового залишку із хромогенного субстрату на гліцилгліцин. При цьому звільняється p-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-γ-глутаміл-п-нітроаніліду – 200 мг; 2) буферна суміш (гліцилгліцин – 1,26 г, ТРІС – 1,21; г) – 2,47 г; 3) стандартний розчин п-нітроаніліну (5 ммоль/л) – 3,0 мл; 4) 10% розчин оцтової кислоти.

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

Приготування робочих розчинів

1. *Буферний розчин*, рН 8,1. Вміст флакона 2 розчиняють у 70–80 мл дистильованої води у мірній колбі на 100 мл і доливають водою до мітки. Розчин стабільний за умови зберігання в холодильнику.

2. *Субстратно-буферний розчин.* Із флакона 1 відбирають 40 мг субстрату і розчиняють у 18 мл дистильованої води на киплячій водяній бані, додають 17 мл буферного розчину. Розчин стабільний за 15–25° С протягом 10 год. Похибка методу становить ± 7%.

Хід визначення. У пробірку вносять 0,5 мл субстратно-буферного розчину, нагрітого до температури +37° С, і додають 0,05 мл сечі. Вміст перемішують та інкубують у водяній бані точно 15 хв. У пробірку додають 3 мл 10% розчину оцтової кислоти і перемішують. Контрольну пробу готують аналогічно, але сечу додають після інкубації. Вимірюють екстинцію дослідної проби проти контрольної за 400–420 нм у кюветі з товщиною робочого шару 1 см.

Активність гамма-глутамілтранспептидази визначають за калібрувальним графіком, для побудови якого зі стандартного розчину п-нітроаніліну (вміст ампули) готують розведення (табл. 16.5).

Таблиця 16.5

Розведення п-нітроаніліну

№ пробірки	Стандартний розчин п-нітроаніліну	Дистильована вода, мл	Активність ферменту	
			нмоль/схл	мкмоль/гхмл
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 0,05 мл одержаних розчинів, додають по 3,5 мл 10% розчину оцтової кислоти, перемішують і колориметрують

відносно дистильованої води в умовах, аналогічних дослідній пробі. Будують графік залежності щільності розчину від активності ферменту. Лінійність калібрувального графіка зберігається до активності 5000 нмоль/схл.

- П р и м і т к и:
1. За 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 за зберігання консервованої сечі за +4°C і протягом 3 міс. за –20° С.
 3. У разі використання кювети з робочим об'ємом більше 1 см кількість робочого розчину необхідно пропорційно збільшити.

Діагностичне значення. 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. Зростання активності ГГТП у сироватці крові свідчить про патологічні процеси в гепатобіліарній системі, а підвищення його активності в сечі – про ураження нирок. Активність ГГТП в коней становить 0,0–0,63 мккат/л ($0,23 \pm 0,02$), в сечі у корів періоду ранньої лактації коливається в межах від 0,12 до 0,9 мккат/л ($0,32 \pm 0,14$ мккат/л), що майже не відрізняється від показника у глибокотільних корів. У хворих на нефротичний синдром корів активність ензиму в сечі збільшується у 2,6 рази, а в дійних корів – удвічі порівняно з клінічно здоровими, що свідчить про порушення структури проксимальних ниркових каналців. У сечі одноденних телят активність ГГТП становить $0,12 \pm 0,02$ мккат/л (0,08–0,20), у подальшому активність її зростає майже удвічі, що вказує на підвищення інтенсивності всіх обмінних процесів, які перебігають у нирковій тканині саме у цей період. У 30-денних телят активність ензиму в 2 рази менша порівняно з одноденними ($0,06 \pm 0,01$). У телят, хворих на колибактеріоз, активність ГГТП в сечі у перший день хвороби зростає у 2 рази, порівняно з клінічно здоровими, що свідчить про розвиток дистрофічних змін не лише в клубочках, а й у каналцях.

Література: [24, С. 45–47; настанова до набору реактивів].

16.9.2. Визначення α -амілази за методом Каравея

Принцип методу. Метод ґрунтується на визначенні залишку нерозщепленого α -амілазою крохмалю. Концентрацію крохмалю визначають за кольоровою реакцією з йодом. Активність α -амілази пропорційна зменшенню інтенсивності забарвлення при 640 нм.

Обладнання: фотоелектроколориметр (КФК-2, КФК-3) або спектрофотометр; водяна баня; піпетки.

Реактиви: 1) концентрований субстратно-буферний розчин – 10 мл (0,5% розчин крохмалю, розчинений в 0,25 М тріс-НСІ буфері, рН 7,1); 2) концентрований розчин йоду – 1 мл (0,1 М); 3) концентрований стоп-розчин – 10 мл (4 Н НСІ, ч).

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. Концентрований розчин стійкий у темному місці. Робочий розчин 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 розведенням концентрованого розчину в 40 разів (10 мл концентрованого розчину + 390 мл дистильованої води і перемішують). Розчин стійкий.

Відбір проб. Використовують профільтровану сечу, яку за активності понад 140 мг/(схл) необхідно розвести ізотонічним розчином натрію хлориду в 2–100 разів. Під час розрахунку активності амілази враховують ступінь розведення.

Хід визначення. Визначення α -амілази проводять згідно зі схемою (табл. 16.6).

Таблиця 16.6

Схема визначення α -амілази

Розчини, мл	Дослідна проба	Контрольна проба
Субстратно-буферний розчин	0,5	0,5
Витримують на водяній бані за +37° С протягом 5 хв		
Сеча	0,01	–
Витримують точно 7,5 хв на водяній бані за 37° С		
Стоп-розчин	4,0	4,0
Розчин йоду	0,5	0,5
Сеча	–	0,01

Вимірюють поглинання дослідної і контрольної проб за 640 нм проти дистильованої води (можна використовувати довжину хвиль 630–690 нм або червоний світлофільтр; кювета з шириною робочого шару 1 см).

Активність α -амілази розраховують за формулою:

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

де E_1 – поглинання контрольної проби; E_2 – поглинання дослідної проби; 44,4 – коефіцієнт перерахунку на 1 с інкубації і 1 л сечі.

Перерахунок. 1 мг/(с×л) = 3,6 мг/(год×мл); 1 мг/(год×мл) = 0,278 мг/(с×л).

Діагностичне значення. Альфа-амілаза (α -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 (≈ 48000) сприяє фільтрації ферменту через ниркові клубочки і виділенню із сечею. Ензим складається з 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 за пошкодження слинних та підшлункової залоз. Значна та швидка гіперамілаземія і гіперамілазурія розвиваються за гострого паротиту та гострого панкреатиту. Меншою мірою зростання активності альфа-амілази реєструється у разі виразок шлунка, хімостазу, дистрофії печінки, гепатиту, жовчнокам'яної хвороби. За патології нирок активність ферменту може зростати у крові, а в сечі – знижується. Гіперамілаземію зумовлюють деякі лікарські препарати (кортикостероїди, саліцилати, тетрациклін, фуросемід, гістамін).

Література: [24, С. 47–48; 39, С. 139–140].

16.9.3. Визначення активності лужної фосфатази в сечі

Принцип визначення. Метод базується на визначенні кількості фенолу, що вивільняється в ході гідролізу 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 – 100 мл; 2) реагент № 1 – 1 флакон; 3) субстрат – 2 флакони; 4) фенол-стандарт (30 ммоль/л) – 1 флакон.

Використовують набір реактивів НВФ “Simko Ltd”, м. Львів.

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

Приготування субстратно-буферного розчину. Вміст флакона з субстратом розчиняють у 120 мл робочого буферного розчину. Зберігають за + 4° С.

Приготування розчину окисника. Вміст флакона з реагентом № 1 розчиняють за нагрівання до 40–50° С у 640 мл дистильованої води. Зберігають у темному посуді за кімнатної температури.

Приготування фенол-стандарту (5 ммоль/л). Одержують розведенням концентрованого розчину фенолу (30 ммоль/л) у 6 разів: 3 мл вихідного розчину + 15 мл дистильованої води. Зберігають за + 4° С.

Хід визначення. Дослідження проводять на фотоколориметрі або спектрофотометрі (довжина хвилі 510 нм) у кюветі з товщиною оптичного шару 10 мм згідно зі схемою, поданою в табл. 16.7.

Таблиця 16.7

Схема проведення визначення лужної фосфатази

Розчини, мл	Проба	Контроль	Стандарт
Субстратно-буферний розчин	0,8	0,8	0,8
Преінкубують 5 хв на водяній бані за 37° С			
Сеча	0,05	–	–
Перемішують та інкубують точно 10 хв на водяній бані за 37° С			
Розчин окисника	2,0	2,0	2,0
Сеча	–	0,05	–
Фенол-стандарт	–	–	0,05
Перемішують і через 5 хв визначають оптичну щільність проби проти контролю			

Активність лужної фосфатази визначають за формулою:

$$\text{Лужна фосфатаза (нмоль/(с \times л))} = \frac{E_{\text{дн}}}{E_{\text{см}}} \times 600,$$

де $E_{\text{дн}}$ – екстинція дослідної проби; $E_{\text{см}}$ – екстинція стандарту; 600 – коефіцієнт переведення часу інкубації в секунди (10×60).

П р и м і т к а. Якщо активність лужної фосфатази в досліджуваній сечі перевищує 5000 нмоль/(с×л), її розводять ізотонічним розчином у 2–5 разів і повторно проводять визначення. Одержаний результат множать на коефіцієнт розведення.

Діагностичне значення. Лужна фосфатаза (ЛФ) активує розщеплення фосфороорганічних сполук. Фермент розміщується в клітинах у зв'язаному з плазматичними мембранами стані. ЛФ складається з різних ізоферментів, які локалізуються переважно в епітелії жовчовивідних шляхів, плазматичних мембранах гепатоцитів і нейронів, кістках, кишечнику, плаценті, нирках.

Література: [24, С. 49–50].

РОЗДІЛ 17

ОСОБЛИВОСТІ ОДЕРЖАННЯ І ДОСЛІДЖЕННЯ СЕЧІ В КОНЕЙ

У коней одержати сечу масажем шкіри промежини неможливо, оскільки при цьому здебільшого настає закриття сфінктера сечового міхура. Тому для відбору сечі в них застосовують кілька методів, найчастіше – природне її виділення. На жаль, цей метод непридатний для масового відбору сечі під час диспансеризації, тому що потребує дуже багато часу (інколи 5–8 год для відбору 3–4-х проб сечі) і може бути ефективним у разі взяття сечі лише у хворих коней. Численні спостереження показують, що акт сечовиділення в коней можна викликати штучно. Для цього тварин після прогулянки заводять у конюшню, особливо в холодну пору року або після інтенсивної роботи та тренінгу; можна перетрушувати в деннику солому в присутності коня або завести свіжу підстилку.

Слід зазначити, що в деяких коней, особливо у жеребців і меринів, присутність людини затримує акт сечовиділення. Тому підходити із посудом для відбору сечі необхідно обережно і тільки після початку акту сечовиділення. Спокійним тваринам можна надіти спеціальні сечозбиральні мішки.

Взяття сечі в кобил краще проводити катетером, ефективність катетеризації становить 70–85%. Найбільш складно брати сечу в коней до дворічного віку. У підсисних лошат (до 5-місячного віку) сечовидільний отвір дуже малий, і сфінктер сечового міхура за найменшого подразнення інтенсивно скорочується, що ускладнює проходження катетера в сечовий міхур і виділення сечі. У старшому віці (після 6 міс.) ця процедура небезпечна для фахівців, тому катетеризацію можна провести лише у флегматичних тварин. У жеребців катетеризацію проводити досить складно і здебільшого небезпечно для здоров'я як людини, так і тварини.

Після одержання сечі визначають її фізичні властивості: колір, прозорість, консистенцію, відносну густину та реакцію. За неможливості відразу провести дослідження, сечу зберігають у холодильнику. Заморожування сечі або зберігання її за кімнатної температури негативно впливає на результати.

Свіжа сеча в коней буває різного забарвлення. У лошат першого місяця життя вона – від лимонно-жовтого до жовтого кольору. У лошат місячного віку колір змінюється від жовтого до жовто-коричневого. Цей процес триває три–чотири місяці. Надалі колір сечі, незалежно від віку, коливається від молочно-жовтого до жовто-коричневого, інколи – до коричневого. Слід зазначити, що через кілька хвилин після взяття сеча

починає розділятися на дві фракції (надосадова рідина і осад), кожна з яких має свій колір. Зокрема, верхня частина (супернатант) є завжди темнішою (вона жовто-коричневого або коричневого кольору), а нижня (осад) – біло-лимонно-світло-коричневого забарвлення. За тривалого зберігання (на кінець першої доби) сеча змінює забарвлення внаслідок окиснення фенолів і в нижній частині набуває темно-коричневого кольору. Верхня частина надосадової рідини завжди світліша. За кімнатної температури цей процес відбувається протягом кількох годин, але ці зміни не впливають на показники сечі. У неплідних кобил сеча має колір від блідо- до буро-жовтого, а в жеребних колір її залежить від терміну вагітності. У більшості кобил із малим терміном жеребності (1–3 міс.) колір сечі біло-жовтий і лише у третини – від гірчичного до коричневого (зрідка). В останні місяці жеребності сеча значно темніша – від жовто-коричневого до коричневого кольору (Жила І.А., 2004).

На відміну від тварин інших видів, у здорових дорослих коней сеча непрозора, оскільки в ній міститься багато солей кальцію. У деяких тварин перші порції сечі можуть бути прозорими, але в кінці сечовиділення вона стає зовсім мутною. Через наявність великої кількості слизу, помутніння може бути у вигляді циліндра, але під час перемішування або стояння сеча стає рівномірно мутною. За нефротичного синдрому сеча в коней стає більш прозорою або зовсім прозорою завдяки кислій реакції, що сприяє розчиненню солей. У лошат до місячного віку сеча прозора, надалі вона теж мутніє і в шестимісячному віці не відрізняється від сечі дорослих тварин.

Консистенція сечі в дорослих коней – слизиста (від домішування муцину, який утворюється в ниркових мисках та сечовому міхурі). Інколи вона драглеподібна і розтягується у вигляді ниток. У лошат першого місяця життя консистенція її водяниста, надалі вона стає гущішою, а після однорічного віку – тягучою. Водянистою сеча в коней буває за поліурії та нефротичного синдрому.

Відносна густина сечі становить (кг/л): у лошат перших трьох місяців життя – 1,001–1,025; трьох–шести – 1,010–1,035; 6–12-місячних – 1,020–1,040; у дорослих – 1,020–1,055 (у 60% – 1,035–1,055). Найвищу відносну густина сечі (1,043–1,053) мають кобили в перші 1–2 міс. після пологів (Жила І.А., 2002).

Сеча дорослих коней має лужну реакцію, величина рН коливається від 8,5 до 9,5. У молодняку вона є або нейтральною, або слабкислою (рН 5–7).

Фізичне дослідження сечі дає, в основному, загальне уявлення про стан ренальної системи, але недостатньо відображає зміни інших систем організму. Тому цінним є хімічне дослідження сечі. Одним із хімічних тестів оцінювання стану ниркового фільтра є визначення вмісту білка в

сечі. У коней, порівняно з іншими тваринами, існують певні відмінності в її дослідженні. У ході визначення білка сечу коней слід попередньо витримати (близько двох годин) за кімнатної температури, потім зняти верхній шар і профільтрувати його. Після цього сеча придатна для дослідження.

Серед якісних проб на білок найбільш показовою є проба з кип'ятінням. Інші проби (із сульфосаліциловою та азотною кислотами) не придатні для дослідження білка в сечі коней. Зокрема, під час застосування проби з 20% сульфосаліциловою кислотою помутніння сечі взагалі може не статися (згідно з методикою, наявність білка в сечі дає помутніння). Сеча стає ще більш тягучою або навіть драглеподібною.

У процесі дослідження сечі методом Робертса-Стольникова (проба з нітратною кислотою), за будь-якого розведення її, в усіх пробах утворюються зеленувато-коричневі кільця (згідно з методикою, за наявності білка в сечі на межі двох рідин має утворитися біле кільце). Зміна забарвлення кільця і поява його навіть після розведення у 30–40 разів пов'язана з наявністю в сечі коней білірубину та індикану, які дають відповідно зелене та фіолетове забарвлення за таких же умов. Отже, ця проба не придатна для визначення вмісту білка в сечі коней. Найбільш точним є кількісний метод із 3% сульфосаліциловою кислотою, набором реактивів фірми „*Simko-Ltd*” (Жила І.А., 2002). Визначати вміст білка в сечі коней індикаторними смужками недоцільно, оскільки цей метод дає хибні позитивні результати. Тому невелику кількість білка в сечі (до 1 г/л) можна вважати негативним результатом. Проте за кислої або нейтральної реакції сечі (лошата або хворі дорослі коні) індикаторні смужки показують вірогідні результати. У нормі в сечі коней сліди білка (0,2–0,5 г/л) завжди присутні (майже у 90–95% тварин). У лошат до тримісячного віку білок у сечі відсутній.

У ході визначення вмісту **глюкози** в сечі краще використовувати пробу Гайнеса та індикаторні смужки. Перед постановкою проби Гайнеса із сечі необхідно видалити білок, наявність якого зумовлює позитивну реакцію на глюкозу. Для цього підкислену сечу нагрівають до кипіння, потім охолоджують і фільтрують. Під час нагрівання білки згортаються й утворюються пластівці або помутніння, які осідають на фільтрувальному папері. Фільтрат при цьому стає прозорим і набуває водянистої консистенції. Проба Гайнеса дає ідентичні результати з індикаторними смужками, проте використання останніх не потребує попередньої підготовки сечі для дослідження, що робить їх застосування більш практичним та економічним.

Для визначення в сечі коней умісту **кетонових тіл** застосовують загальноприйняті методи або індикаторні смужки. У коней, на відміну від

тварин інших видів, навіть у разі тяжких захворювань кетонів тіла в сечі виявляються рідко.

У ході визначення *білірубіну* в сечі застосовують пробу Фуше, що ґрунтується на окисненні білірубіну в білівердин, який надає пробі зеленувато-синього забарвлення. Використовують також індикаторні смужки. Обов'язковим під час визначення білірубіну є недопущення потрапляння сонячного світла на біоматеріал, під дією якого він руйнується. Сечу обов'язково потрібно підкислювати 10–30% розчином оцтової кислоти. За даними І.А.Жили (2002), у сечі 80–90% дорослих коней є сліди білірубіну, що оцінюється в один плюс під час визначення індикаторними смужками. У лошат білірубіну в сечі міститься ще менше, і виявляється він у 30–40% тварин.

Під час визначення *уробіліногену* в сечі найбільш показовими є проба Флоренса (з ефірною витяжкою) та індикаторні смужки, які дають позитивну реакцію у 84% випадків. Проба Богомолова є непридатною для визначення цього пігменту в сечі коней, оскільки за додавання до неї купруму сульфату утворюються коричневі пластівці і реакція далі припиняється.

Уміст *гемоглобіну* в сечі коней визначають за допомогою індикаторних смужок та пробою з амідопірином. Визначати рівень гемоглобіну необхідно протягом першої години після відбору сечі, тому що на повітрі він окиснюється до метгемоглобіну і виявити його потім неможливо. У клінічно здорових коней, незалежно від віку, гемоглобін у сечі відсутній.

Індикан у сечі коней визначають якісною пробою Обермайера. Ця реакція пов'язана з перетворенням індикану в індоксил трихлорним ферумом з утворенням індиголігнону, який має рожево-фіолетовий колір. У 50–60% дорослих коней у сечі міститься незначна кількість індикану. В середньому за добу із сечею виділяється 0,78–2,0 г індикану. Індиканурія є важливим показником під час діагностики кишкової непрохідності.

Література: [25; 28; 38, С. 354–358].

РОЗДІЛ 18

ДОСЛІДЖЕННЯ ОСАДУ СЕЧІ

Краще досліджувати свіжу сечу (не пізніше 4 год після її одержання). З метою збереження організованих компонентів осаду, особливо в теплу пору року, сечу консервують 40%-ним розчином формальдегіду. Перед початком мікроскопічного дослідження осаду визначають водневий показник (рН) сечі.

Для осадження речовин, які містяться в сечі, її центрифугують за 1500–2000 об/хв протягом 7–10 хв, або відстоюють у конічній колбі. Після центрифугування надосадову рідину зливають або відбирають піпеткою. Осад змішують з невеликою кількістю надосадової рідини, набирають у пастерівську піпетку і краплю наносять на предметне скло, накривають покривним склом, запобігаючи утворенню пухирців повітря. За відстоювання сечі в конічному посуді одержують нещільний осад, який піпеткою беруть для дослідження.

Консервування осаду сечі. Розчиняють 4 г желатину у 12 мл гарячої дистильованої води, додають 14 мл гліцеролу і 0,2 мл фенолу. Суміш перемішують, розливають у чашки Петрі і використовують за необхідності. Для приготування препарату шматочок суміші підігрівають на предметному склі. Після розчинення суміш змішують із осадом, накривають покривним склом і розглядають під мікроскопом.

За підозри наявності новоутворень у нирках та сечових шляхах сечу після збирання осаду виливають у чашку Петрі і вивчають на темному фоні з метою виявлення ниток, згустків, жмутиків та інших елементів. У разі виявлення їх за допомогою шпателя й голки переносять на предметне скло, накривають покривним скельцем і розглядають під малим збільшенням мікроскопа (8×15). За наявності в нативному препараті елементів новоутворень покривне скло знімають, а препарат висушують на повітрі і фарбують протягом 8–10 хв за методом Паппенгейма.

В осаді є клітини (еритроцити, лейкоцити, епітелій, циліндри, гриби, бактерії), які належать до *організованих* компонентів сечі. Кристали та амфорні утворення належать до *неорганізованого* осаду.

18.1. Організовані компоненти осаду сечі

Еритроцити в сечі здорових тварин відсутні або зустрічаються досить рідко – до двох у полі зору мікроскопа. У свіжій сечі еритроцити насичені гемоглобіном і незмінні, дископодібної форми та жовто-

зеленого кольору. За тривалого зберігання сечі вони втрачають значну частину гемоглобіну і мають вигляд набряклих світлих двоконтурних дисків. Такі ж еритроцити зустрічаються і в сечі з підвищеною лужністю та низькою відносною щільністю, а в кислій сечі вони зморщені й нагадують ягоди шовковиці.

Збільшення кількості еритроцитів у сечі називають *еритроцитурією*. Виражена еритроцитурія, яка може перейти в гематурію, спостерігається за гострого нефриту, сечокам'яної хвороби, пієлонефриту та пухлин нирок. У разі хронічного нефриту еритроцитурія виражена слабо, проте має велике діагностичне значення, оскільки інші зміни сечі можуть не виявлятися.

Під час ниркової кровотечі еритроцити в осаді сечі утворюють так звані “кров'яні циліндри”. Поява в сечі під мікроскопом великої кількості еритроцитів може вказувати на кровотечу із сечового міхура чи уретри.

Лейкоцити в сечі здорових тварин можуть бути відсутні або їх там міститься мало – до двох у полі зору мікроскопа. Вони в 1,5–2 рази більші за розміром, ніж еритроцити, і мають вигляд сірих овальних або зернистих клітин. У лужній сечі лейкоцити набрякають і стають прозорими.

Збільшення кількості лейкоцитів у сечі називається *лейкоцитурією*. Вона спостерігається, як правило, за гострих запальних процесів у сечовій системі (уроцистити, пієліти, уретриту). За гострого гломерулонефриту лейкоцитурія виникає рідше, кількість лейкоцитів у сечі невелика (15–20 у полі зору мікроскопа), а за хронічного вони можуть бути відсутні (рис. 18.1).

Наявність великої кількості лейкоцитів у сечі (50–100 і більше в полі зору мікроскопа), що зумовлює її гнійний характер, називається *піурією*. Вона найчастіше виникає за гнійного пієлонефриту та уроцистити. Ниркова піурія буває лише за гнійного нефриту, коли гнійник розкривається у сечовивідні шляхи. *Справжню* лейкоцитурію слід відрізнити від *несправжньої*, яка може з'являтися за ендометриту, вагініту та простатиту внаслідок запалення статевих органів.

Епітеліальні клітини в сечі здорових тварин зустрічаються рідко. Поодинокі клітини потрапляють у сечу з ниркових каналців та мисок, сечовивідних шляхів і статевих органів. За патології органів сечовидільної системи відбувається посилене злушення епітелію і домішування його до сечі. В осаді розрізняють *плескати*, *циліндричні (хвостати)* і *круглі* епітеліальні клітини.

Плескати епітеліальні клітини мають великі розміри, нерівні краї і добре виражену зернистість цитоплазми, а *циліндричні* – витягнутої форми тільця з чітким ядром та зернистою цитоплазмою.

Епітеліальні клітини з нирок, сечовивідних проток, сечового міхура і статевих органів подібні між собою, тому під час аналізу осаду сечі слід враховувати інші симптоми уражень органів сечовидільної системи. Клітини

ниркового епітелію мають полігональну або овальну форму, кругле велике ядро в центрі та добре виражену зернистість цитоплазми (рис. 18.1). Злуцнення великої кількості ниркового епітелію супроводжується значною протеїнурією, глюкозурією, лейкоцитурією і циліндрурією.

Епітелій сечовивідних шляхів відрізняється зовнішнім виглядом. Так, клітини поверхневих шарів великі, мають овальну або полігональну форму та невелике ядро, яке розташоване здебільшого ексцентрично, і слабко виражену зернистість цитоплазми. Клітини середніх шарів видовженої форми (так звані хвостаті клітини), а глибоких шарів – найчастіше грушоподібної форми з ядром у розширеній частині.

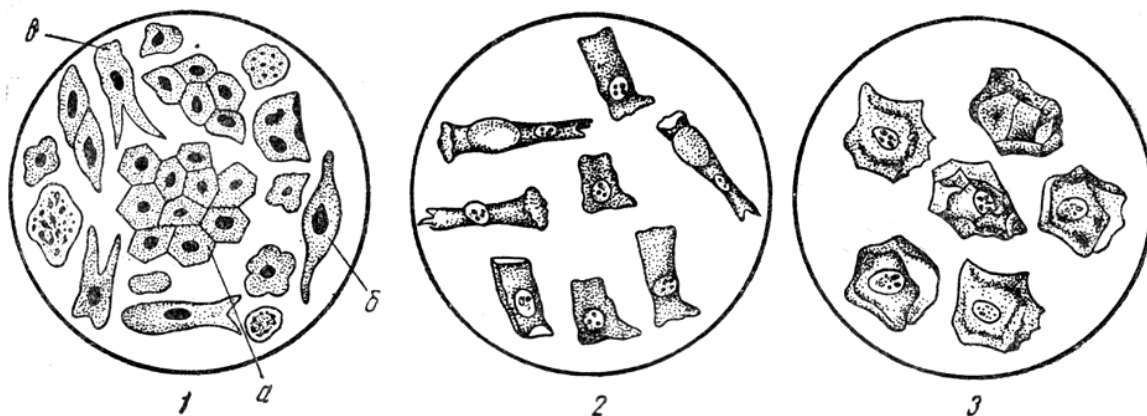


Рис. 18.1. Епітеліальні клітини:

1 – із нирок і сечових шляхів (а – епітелій із нирок; б – епітелій із сечових шляхів); 2 – із ниркової миски; 3 – із сечового міхура
(за М.П. Рухлядевим)

Епітеліальні клітини піхви – великих розмірів, багатокутні, з ядром у центрі. Вони потрапляють у сечу під час вагітності.

Циліндри – це зліпки з ниркових каналців, які утворилися з білка та клітинних елементів. Наявність у сечі циліндрів називають *циліндрурією*. Циліндри зберігаються лише в кислій сечі, у лужній – швидко розпадаються і розчиняються під час зберігання.

Розрізняють *справжні* і *несправжні* циліндри. До справжніх належать *гіалінові*, *епітеліальні*, *зернисті*, *воскоподібні*, *еритроцитарні*, *гемоглобінові* та *лейкоцитарні* циліндри (рис. 18. 2).

Гіалінові циліндри виявляють у сечі за хвороб нирок (нефриту, нефрозу, пієлонефриту), рідше – у разі фізіологічної протеїнурії, переохолодження, після фізичного навантаження. Вони майже прозорі, мають зігнуту, скручену форму і закруглені кінці. За гемоглобінурії гіалінові циліндри набувають червоного кольору, білірубінурії – жовтого, а під час наклеювання на циліндри сечокихлих солей і зруйнованих клітин вони стають сірими.

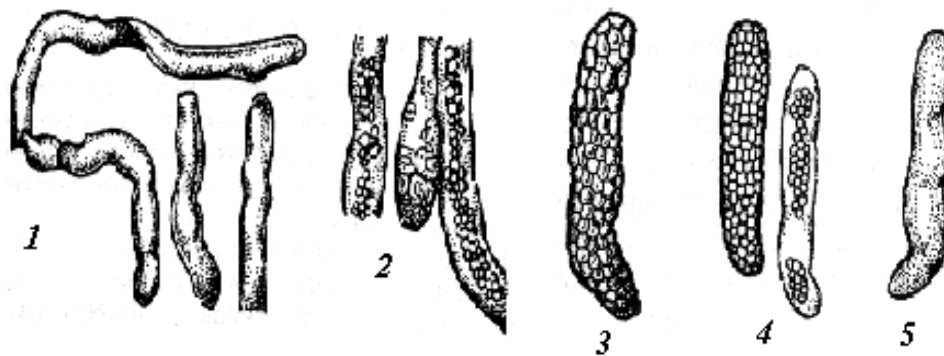


Рис. 18.2. Циліндри осаду сечі:

1 – гіалінові; 2 – жирові; 3 – епітеліальні;
4 – еритроцитарні; 5 – зернисті.

Епітеліальні циліндри – це пластини канальцевого епітелію, що прилипли до гіалінових циліндрів. Епітеліальні циліндри з'являються в сечі за гострого нефрозу і гломерулонефриту, рідше – за їх хронічного перебігу.

Зернисті циліндри утворюються внаслідок розпаду епітелію ниркових канальців. Поверхня їх покрита дрібною зернистістю. За жирового переродження нирок структура циліндрів містить жирові включення, білкового – зерна білкового розпаду. Наявність зернових циліндрів у сечі є ознакою тяжких дистрофічних змін епітелію канальців.

Воскоподібні циліндри мають чіткі контури і жовтуватий відтінок. На їхній поверхні часто бувають тріщини. Зустрічаються такі циліндри за хронічного перебігу нефротичного синдрому, рідше – за гострого, а також за отруєння мінеральними отрутами.

Еритроцитарні циліндри утворюються в канальцях нирок і є наслідком ниркових кровотеч. Під мікроскопом вони мають зеленувато-жовте забарвлення. Коли гематурія перебігає одночасно з протеїнурією, еритроцити нашаровуються на гіалінові циліндри. Під час кровотечі в сечовому міхурі чи місці сеча над осадом майже прозора, а осад складається із кров'яних згустків різної величини.

Гемоглобінові циліндри утворюються з гемоглобіну в ниркових канальцях. Вони мають зернисту форму і жовто-коричневий колір. Гемоглобінові циліндри подібні до кристалів сечокислового амонію, якщо останні мають подовжену форму. Розрізняють їх додаванням лужного розчину до осаду сечі, від якого сечокислий амоній розчиняється.

Лейкоцитарні циліндри виникають унаслідок налипання лейкоцитів на нитки слизу. Виявляють їх під час захворювань, що перебігають із значною лейкоцитурією (за гострого перебігу нефриту, піелонефриту та уроциститу).

Жирові циліндри являють собою краплі жиру, які прилипли до ниток слизу чи фібрину. Для диференціації їх використовують фарбування осаду суданом-III. Вони розчиняються в ефірі, нерозчинні у кислотах і лугах. Жирові циліндри виявляють за жирового переродження нирок.

Бактеріальні циліндри виявляють за бактеріоурії. Поверхня їх вкрита бактеріями, серед яких є рухомі форми. Бактеріоурія часто виникає внаслідок нагромадження в сечі *Esherichia coli*, *Corynebacterium renale*, *Leptospira*.

Несправжні циліндри подібні до справжніх, але утворені з солей сечокислового амонію, уратів.

Циліндроїди – це нитки слизу. Вони подібні до гіалінових циліндрів, проте, на відміну від них, циліндроїди довгі і мають поперечну штрихуватість та розчиняються оцтовою кислотою. Циліндроїди виявляють у разі запальних процесів сечовивідних шляхів.

18.2. Неорганізовані компоненти осаду сечі

Це – кристали солей і кислот. Залежно від реакції сечі, утворюються різні сполуки солей. За *кислої* реакції у ній з'являються кристали сечової, гіпурової кислот, сечокислі солі (урати), кальцію і калію сульфати, кальцію оксалату. У разі *лужної* реакції сечі випадають солі кальцію оксалату, кальцію карбонату, нейтрального фосфорнокислого магнію, кислого сечокислового амонію, фосфорнокислої аміакмагнезії (трипельфосфат). Останніх двох солей у свіжій сечі здорових коней і жуйних не виявляють. Вони утворюються у процесі аміачного бродіння сечі або гнильного розкладення її в нирковій мисці чи сечовому міхурі. Нейтральна сеча може містити неорганізований осад кислої і лужної сечі. Зміни в годівлі або ж захворювання впливають на зміни не лише рН сечі, а й складу осадів. Деякі неорганізовані осадки виявляються лише за патології.

У здорових тварин в осаді сечі виявляють такі неорганізовані кристали: у коней і великої рогатої худоби – кальцію карбонат, кальцію оксалат, кальцію сульфат, гіпурову кислоту; у свиней – кальцію оксалат і трипельфосфат; у собак – кальцію оксалат, сечову кислоту та трипельфосфат (рис. 18.3).

Осади лужної сечі. *Кальцію карбонат* ($CaCO_3$) кристалізується у вигляді жовтих кульок різного розміру із радіальною штрихуватістю, що чітко видно за середнього збільшення світлового мікроскопа. Рідше вони мають форму точильних каменів, колб, пісочних годинників, зрізаних призм. Під час додавання хлоридної або оцтової кислот кристали кальцію карбонату розчиняються з утворенням бульбашок вуглекислого газу.

Кристали кальцію карбонату в кислій сечі відсутні, а їхня поява у хворих тварин, в яких у нормі сеча кислої реакції, є хорошим прогностичним показником.

Кальцію фосфат $[(Ca_3PO_4)_2]$ кристалізується у вигляді тонких клиноподібних призм, голок, зібраних у пучки, розеток, які розчиняються у хлоридній і оцтовій кислотах, нерозчинні в лугах. Багато їх виявляють в осаді сечі за остеодистрофії.

Гіпурова кислота є складовою сечі майже всіх видів тварин, проте найчастіше зустрічається в лужній сечі, кристалізується у вигляді довгих ромбічних призм, зібраних у пучки, розетки, інколи – у вигляді віяла, волоті. Кристали цієї кислоти розчиняються аміаком та спиртом, нерозчинні у хлоридній і оцтовій кислотах (рис. 18. 3).

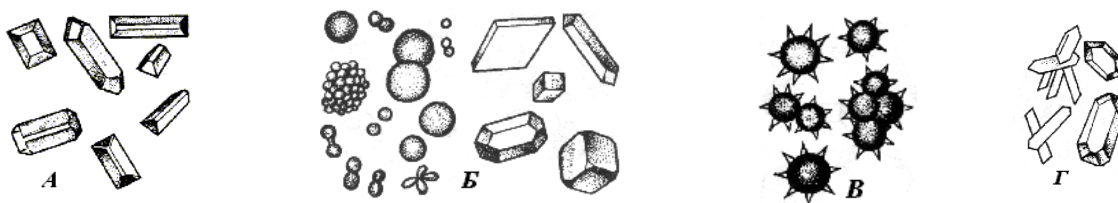


Рис.18.3. Неорганізовані осадки лужної сечі:

А – трипельфосфат; Б – кальцію карбонат; В – сечокислений амоній;
Г – гіпурова кислота

Трипельфосфат (фосфорнокисла аміак-магнезія); $[MgNH_4PO_4 \cdot H_2O]$ найчастіше має вигляд багатокутних зрізаних призм, рідше – сніжинок, пір'їн, листя папороті, ножиць. Кристали цієї солі розчиняються у хлоридній та оцтовій кислотах, нерозчинні в лугах і гарячій воді. Виявляють їх у свіжій сечі за уроциститу, пієліту та пієлонефриту.

Сечокислений амоній (амонію біурат); $[C_5H_3(NH_4)_2N_4O_3]$ кристалізується у вигляді буро-жовтих кульок із колочками на поверхні, які своїм зовнішнім виглядом нагадують плоди дурману або морські міни. Кристали розчиняються у хлоридній і оцтовій кислотах. У свіжій сечі сечокислений амоній виявляють у разі уроциститу, пієліту та пієлонефриту. Особливо багато їх міститься в осаді гнильної сечі.

Кальцію і магнію фосфати виявляються в сечі у вигляді білого або сіро-білого щільного осаду, який добре розчиняється у 3% розчині оцтової кислоти. Значну кількість їх часто виявляють у сечі, взятій для дослідження невдовзі після прийняття твариною великої кількості корму (особливо в м'ясо- і всеїдних тварин). У цих випадках сеча стає каламутною. Після центрифугування або відстоювання її виникає білий або сіро-білий щільний осад,

Осади кислої сечі. *Кальцію оксалат $(CaC_2O_4 \cdot 3H_2O)$* кристалізується у вигляді правильних октаєдрів – восьмикутників, грані яких заломлюють

світло. Своїм зовнішнім виглядом вони нагадують поштові конверти, мають різні розміри, але найчастіше – малі (помітні лише за середнього збільшення світлового мікроскопа). Інколи вони мають вигляд пісочних годинників, гир або дисків (рис. 18.4). Кристали кальцію оксалату розчиняються у хлоридній і не розчиняються в оцтовій кислотах. З них часто утворюються сечові камені.

Кальцію сульфат (*ginc*; $CaSO_4$) кристалізується у вигляді довгих тонких призм, зібраних у пасма або розетки. Велику кількість їх виявляють у сечі тварин, яким давали глауберову сіль, а також за катару кишок. Кристали кальцію оксалату не розчиняються в кислотах та аміаком, але розчиняються в концентрованому розчині питної соди.

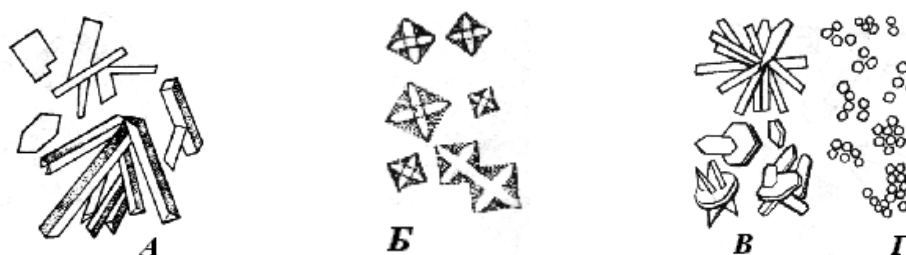


Рис. 18.4. Неорганізовані осадки кислої сечі:

А – кальцію сульфат; Б – кальцію оксалат; В – сечова кислота;
Г – урати

Кристали сечової кислоти ($C_5H_4N_4O_3$) – великі, жовто-бурого кольору, найчастіше мають вигляд ромбічних пластинок, дисків, сніжинок, хрестів або гребінців. Вони розчиняються в лугах, нерозчинні у воді та кислотах. Велику кількість їх виявляють у разі захворювань нирок та деяких інфекційних хвороб.

Урати (солі сечової кислоти, здебільшого – калію і натрію) кристалізуються у вигляді малих кульок, зібраних у купки. Під час нагрівання сечі вони розчиняються, а за охолодження знову випадають в осад; розчиняються в лугах. Під дією хлоридної та оцтової кислот урати утворюють кристали сечової кислоти. Зростання вмісту їх у сечі є ознакою посиленого розпаду білків в організмі. Осад з уратів за рахунок пігментів сечі нерідко забарвлюється в рожевий колір.

До *неорганізованих осадків* сечі, які виявляють *лише за патології*, належать амінокислоти (лейцин, тирозин, цистин), холестерол, білірубін, гемоглобін та індиго.

Лейцин кристалізується у вигляді жовтих кульок із концентричною та променистою штрихуватістю. Зовнішнім виглядом кристали нагадують поперечний розпил старого дерева, розчиняються в кислотах і лугах, за дії спирту й ефіру випадають в осад. Лейцин виявляють у разі захворювань печінки, отруєнь та порушень обміну речовин.

Тирозин кристалізується у вигляді жовтих або жовто-бурих тонких голівок, зібраних у пучки, снопи, волоті чи розетки. Кристали розчиняються в аміаку, кислотах і лугах. Тирозин виявляють у сечі за інтоксикацій та захворювань печінки (рис. 18. 5).



Рис. 18.5. Неорганізовані осаді сечі, які виявляють лише у разі патології:

A – холестерол; Б – лейцин; В – тирозин; Г – цистин

Цистин має вигляд багатокутників (найчастіше – шестикутників) із своєрідною концентричною штрихуватістю. Цистин виявляють у сечі у разі порушень обміну речовин (сечокам'яної хвороби, цистинозу).

Холестерол має вигляд тонких прозорих прямокутних блискучих пластинок з вирізаними кутами. Кристали його розчиняються в ефірі й хлороформі. Виявляють їх в осаді сечі за ліпоїдного нефрозу.

Білірубін міститься в осаді сечі у вигляді червоно-оранжевих зерняток або голчастих жовтих кристалів, які розчиняються у хлороформі й лугах. Виявляють їх у сечі під час захворювань печінки.

Гемоглобін (гематин) виявляють в осаді сечі за гемоглобінурії у вигляді бурих аморфних брил, які часто включаються в сечові циліндри.

Індиго – це органічний барвник, який утворюється в лужній сечі з індикану. Кристали індиго мають вигляд тонких голок або брил, здебільшого синього кольору, які розчиняються у хлороформі. Виявляють їх в осаді сечі за патологій печінки, а також інших захворювань, що супроводжуються вираженою індиканурією.

Література: [24, С. 54–62; 25, С. 27–37; 38, С. 358–366; 40, С. 188–197; 49, С. 55–70; 60, С. 274–278].

РОЗДІЛ 19

ДОСЛІДЖЕННЯ ВМІСТУ РУБЦЯ

19.1. Методи відбору вмісту рубця

Для взяття вмісту рубця у інтактних тварин використовують ротоглоткові та носоглоткові зонди. За необхідності вміст беруть пункцією вентрального мішка рубця. Для проведення руміноцентезу використовують голки довжиною 180–200 мм із внутрішнім діаметром 1,0–1,5 мм та одним боковим отвором, розташованим у межах 1,0–1,5 см від її загостреного кінця. Точка уколу знаходиться з лівого боку корови, на лінії колінного суглоба, у ділянці, яка знаходиться на 10,0–20,0 см каудально від костохондрального сполучення реберної дуги (рис. 19.1 і 19.2). У глибокотільних корів слід попередньо пересвідчитися, що в даній ділянці до черевної порожнини прилягає рубець, а не ріг матки з плодом.

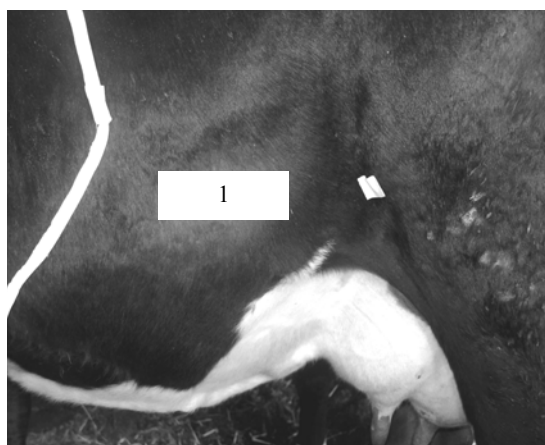


Рис. 19.1. Місце проколу черевної стінки для взяття вмісту рубця (1)

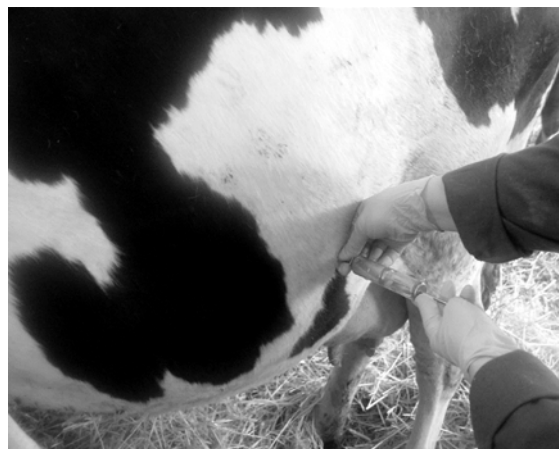


Рис. 19.2. Відкачування шприцом умісту рубця

Експериментальне вивчення процесів травлення в передшлунках виконують на тваринах із фістулами. В останні роки сконструйований штучний рубець, який дає можливість вивчати ферментативні процеси *in vitro*. У країнах Західної Європи виготовляють ротоглоткові зонди різної модифікації, які використовують для одержання проб рубцевого вмісту. Зонд Черкасова, призначений для виведення газів та промивання рубця,

мало придатний для одержання його вмісту, тому у дорослої великої рогатої худоби вміст рубця беруть гумовими чи поліхлорвініловими шлангами довжиною 200–250 см і зовнішнім діаметром 20–40 мм. На передньому кінці шланга роблять невеликі отвори на відрізок 15–20 см на випадок закупорення основного ходу та для фільтрації вмісту.

Для овець, кіз та молодняку ВРХ можна використовувати звичайні шлункові зонди, які випускає медична промисловість. Довжина їх 120–150 см, зовнішній діаметр близько 15 мм. Якщо зондування виконують м'якою трубкою, то під час введення її використовують дерев'яний зівник, який попереджує пошкодження зонда (Ганжа І.Д., 1956).

Техніка введення ротоглоткового зонда. Перед введенням тварині вставляють дерев'яний зівник І.Д. Ганжі з отвором, дещо більшим за діаметр зонда. Для цього, натискуючи пальцями на масетери, вставляють зівник як можна далі до кута рота і фіксують його за рогами за допомогою зав'язок. Попередньо змащують рубцевий кінець зонда вазеліновою олією. Кінець зонда кладуть на корінь язика і обережно посилають до стравоходу, роблячи при цьому невеликі рухи вперед – назад (щоб викликати у тварини акт ковтання).

Правильність введення контролюють шляхом пальпації стравоходу у передній третині шиї (на рівні 10–12 кілець трахеї). Проштовхують його по стравоходу з деяким зусиллям, відчуваючи момент проходження передньої частини зонда через злегка стиснутий стравохід на рівні 10–12 кілець трахеї. У разі потрапляння зонда в гортань чи трахею тварина непокоїться й кашляє. У цьому випадку його слід трохи витягнути і надати стравохідний напрямок. За правильного введення легко помітити просування зонда в середній третині стравоходу оглядом шиї з лівого боку, а коли зонд проходить у рубець, відчувається характерний запах умісту чи його витікання. Для кращого витікання рідини рубця необхідно голову тварини опустити вниз, проводити масаж лівої голодної ямки та рухати зондом вперед-назад. Можна вміст відкачувати вакуумним насосом Комовського в колбу Бунзена. У молодняку великої та дрібної рогатої худоби вміст відбирають, створюючи вакуум шприцем Жане.

У тварин із фістулами рубця вміст беруть металевою трубкою довжиною близько 1 м і діаметром отвору 0,5 см. Трубку вводять через фістулу у вентральний мішок рубця. Для відтягування вмісту використовують шприц Жане, який під'єднують через гумову трубку. Окрім цих методів, сконструйовані ротоглоткові зонди для взяття вмісту рубця.

Зонд на всій довжині має захисну оболонку, виготовлену зі спіралеподібно скрученого дроту (рис. 19.3), що дає змогу використовувати його без застосування зівника. Всередині гнучкої металевої трубки знаходиться гумова, що одним кінцем з'єднана з колбою, в якій за допомогою насоса зворотної дії створюється вакуум, а

протилежний її кінець під'єднаний до металевої оливи, яка завдяки своїй масі опускається на дно рубця, що дає змогу отримувати необхідну кількість його вмісту.



Рис. 19.3. Зонд для взяття вмісту рубця

Після введення зонда в рубець насосом створюється вакуум і рідина засмоктується в колбу. В металевій оливі є отвори, які розміщені під різними кутами, що попереджує засмоктування великих кормових часточок. Застосування цього зонда дозволяє за кілька хвилин отримати 2–3 л вмісту рубця. Для підтримання оптимальної температури і збереження активності мікрофлори вміст рубця доцільно відбирати в термос.

Під час дослідження вміст рубця зберігають за кімнатної температури (20–22° С) не більше 9 год, а в холодильнику – протягом доби. Під час транспортування з господарств проби необхідно ставити в термос з льодом. Для попередження лізису найпростіших і бактерій проби консервують 10% розчином формаліну (5–6 крапель на 20 мл вмісту). Для визначення летких жирних кислот (ЛЖК), лактату, амінокислот, біогенних амінів, іонів (Cl^- , Na^+ , K^+ та ін.) рубцевий вміст можна зберігати в замороженому стані до 6 місяців. Аміак слід визначати лише у свіжому вмісті. Перед дослідженням проби фільтрують через 2–4 шари марлі.

У ході дослідження вмісту рубця слід враховувати склад раціону, час взяття проби після годівлі та техніку зондування.

Під час годівлі грубоволокнистими кормами склад вмісту рубця знаходиться на відносно стабільному рівні протягом години після годівлі. Введення в раціон комбікормів, багатих на крохмаль, змінює ферментативні процеси в рубці. У ньому проходить інтенсивне утворення ЛЖК за рахунок пропіонової кислоти, з'являється молочна кислота. Аналогічні зміни відбуваються у разі згодовування тваринам надлишку (цукрового і напівцукрового буряку, меляси), але при цьому посилено утворюється молочна кислота. Змінюється якісний та кількісний склад мікроорганізмів: кількість грамнегативних бактерій зменшується, а грампозитивних – збільшується.

У ході аналізу результатів досліджень вмісту рубця слід враховувати час останньої годівлі, оскільки протягом 2–3 год після прийому корму в передшлунках відбувається активний гідроліз, що призводить до зростання вмісту ЛЖК, аміаку, хлору, калію; відповідно, величина водневого показника (рН) та іонів натрію знижуються. Пізніше, через поступове затухання ферментативних процесів у рубці та активне засвоєння продуктів гідролізу настає зниження концентрації ЛЖК (особливо пропіонової), аміаку, хлору, калію та зростання величини рН і натрію. Тому під час проведення досліджень вмісту рубця проби слід відбирати в один і той же час після годівлі.

Під час зондування тварин із метою одержання проб вмісту рубця подразнюється ротова порожнина, глотка, кардіальний сфінктер, що зумовлює посилену саливацію. Відомо, що слина має лужну реакцію (рН 8,7–9,2), тому домішування її до вмісту рубця може викликати зміну величини водневого показника та інших компонентів проб. Зміни величини рН через домішки слини особливо відчутні за ацидотичного стану вмісту рубця. Враховуючи те, що максимальна кількість слини надходить у пробу на початку зондування, перші порції його вмісту (200 мл) для аналізів не слід використовувати.

Література: [26, С. 6–9].

19.2. Органолептичне дослідження вмісту рубця

Органолептичне дослідження вмісту рубця проводять зразу після його одержання, безпосередньо у господарстві. При цьому встановлюють: колір, запах, осад та флотацію.

Колір. У здорових тварин колір вмісту рубця залежить від прийнятого корму – переважно від сіро- до темно-коричнево-зеленого. Під час випасання чи згодовування зелених кормів переважає зелений колір, давання сіна – бурий або коричнево-зелений, годівлі жомом – сірий,

кукурудзяним силосом та соломою – жовто-коричневий. Темно-коричневий або чорно-зелений колір може свідчити про застій та гниття вмісту рубця. За гострого ацидозу рубця колір стає молочно-сірим, а за хронічного – молочно-коричневим.

Консистенція. Вміст рубця кашкоподібний, напіврідкий, сік має слабов'язку консистенцію. У разі порушення травлення консистенція може мінятися на водянисту, піняву або в'язку (густу). Водяниста консистенція вказує на зниження ферментативних процесів у передшлунках та розвиток гострого ацидозу. За тимпанії рубця вміст пінявий. В'язка консистенція спостерігається за хронічного ацидозу, але може бути наслідком потрапляння великої кількості слини у пробу вмісту.

Запах вмісту рубця у здорових тварин специфічний, ароматний, кислуватий і залежить від годівлі. Дещо різкий запах може бути під час годівлі зеленою травою, буряком, капустою, силосом. Запах “тухлих яєць” (гниття білків) або аміачний спостерігається за гниття вмісту, атонії та алкалозу рубця. Затхлий або іншого роду неприємний запах пояснюється зниженням активності мікрофлори та ферментативних процесів у рубці. Кислуватий запах характерний для хронічного перебігу ацидозу рубця (руміниту), а різко кислий – для гострого. Затхлий та кислуватий запах може бути у разі потрапляння вмісту сичуга у передшлунки внаслідок порушення його прохідності та за антиперистальтики.

Осад та флотація. Свіжовзятий вміст рубця наливають у скляний циліндр чи стакан, зазначаючи час осідання (на дно склянки) та флотації (над поверхнею рідини) грубих частинок корму. У вмісті рубця здорових тварин значна частина перетравленого корму осідає (осад), а грубі, неперетравлені, з газовими міхурцями компоненти підіймаються на поверхню та збираються у вигляді плаваючого прошарку (флотація).

Для оцінювання утворення осаду та флотації слід відмітити час утворення першої осадової і флотаційної фаз. За оптимального травлення у передшлунках залежно від типу раціону, часу після останньої годівлі, утворення осаду та флотації зазвичай закінчується через 4–10 хв. У разі порушення травлення та водянистої консистенції вмісту випадання осаду прискорюється, а флотація затримується або відсутня. Це спостерігається за інактивації мікрофлори, анорексії чи недостатньої годівлі. Швидке утворення осаду без флотації є характерним для ацидозу рубця, а затримка утворення осаду й флотації є наслідком застою і гниття вмісту рубця та пінистої тимпанії.

Література: [26, С. 9–10; 60, С. 310–311].

19.3. Визначення реакції та величини рН вмісту рубця

Реакція середовища вмісту рубця є важливим показником, що визначає стан ферментативних процесів, утворення метаболітів, їх всмоктування і використання в організмі. Характеризується реакція середовища концентрацією іонів водню або водневим показником. Величина рН – від’ємний десятковий логарифм концентрації іонів водню. Це означає, що для 0,1 моль/л розчину будь-якої сильної кислоти величина рН дорівнює 1, для дистильованої води – 7, для 0,1 моль/л розчину сильного луку – 14. Відповідно, кисла реакція зумовлюється концентрацією іонів водню H^+ , а лужна – гідроксидних іонів OH^- ; за нейтральної реакції $pH=7,0$.

У розчинах величину рН визначають двома методами – колориметричним і електрометричним. Перший метод базується на властивості деяких індикаторів змінювати своє забарвлення залежно від реакції середовища і є найбільш простим, але не зовсім точним. Ним важко визначити величину рН у мутних і забарвлених розчинах, у тому числі й у вмісті рубця. В умовах виробництва величину рН вмісту рубця можна визначати за допомогою універсальних індикаторних смужок (вони дозволяють визначати рН у межах від 1 до 12).

Електрометричний метод застосовують під час роботи із забарвленими розчинами та суспензіями, ним досить швидко можна визначити величину рН з точністю до $\pm 0,05$. *Принцип* методу ґрунтується на тому, що у разі занурення у розчин електрода виникає різниця потенціалів між іонами металу електрода та іонами цього ж металу, що знаходяться у розчині. Якщо в цей же час занурити ще й стандартний електрод з відомим і стійким потенціалом, то електрорушійна сила гальванічного елемента буде залежати від концентрації іонів металу в розчині.

Обладнання. Визначають електричну силу за допомогою рН-метра (ЛПУ-0,1; рН-262; ОР-204/1, універсального іонометра ЭВ-74).

Реактиви: 1) вода дистильована ГОСТ 6709-72; 2) стандарт-титри для приготування зразкових буферних розчинів 2-го розряду ГОСТ 8.135–74 (типи 3, 4, 5); 3) 0,1 н розчин HCl.

Хід визначення. Основний і допоміжний електроди готують до роботи згідно з інструкцією щодо підготовки приладу до роботи.

Прилад попередньо калібрують, враховуючи температуру досліджуваної рідини. У ході визначення величини рН вмісту рубця натискають кнопку з діапазоном вимірювань 4–9. Рідину добре розмішують, виливають у стаканчик і занурюють електроди, які

попередньо промиті дистильованою водою й висушені фільтрувальним папером; фіксують показники на шкалі приладу. Для більш точного вимірювання показник враховують через 1,5–3 хв, оскільки за цей період часу настає стан рівноваги між електродами і розчином. Після закінчення вимірювань прилад вимикають, електроди добре промивають і занурюють у стакан із дистильованою водою.

Клінічне значення. Величина рН вмісту рубця залежить, головним чином, від рівня утворених ферментами мікроорганізмів летких жирних кислот (ЛЖК) – оцтової, пропіонової, масляної, валеріанової та ізовалеріанової, які зміщують величину рН у кислий бік, та від натрію гідрокарбонату, який надходить зі слиною (щодня 370–520 г NaHCO_3) і кормами у рубець, нейтралізуючи кислоти. Окрім того, ЛЖК частково всмоктуються у кров у стінках передшлунків, частково переходять у нижче розташовані відділи травного каналу. Внаслідок цих процесів величина рН вмісту рубця у жуйних підтримується в межах від 6,8 до 7,2, а у високопродуктивних корів – 6,4–6,8 (у середньому $6,73 \pm 0,03$), найвища ($6,91 \pm 0,04$) вона у корів, у структурі раціону яких сіно становить 16–18%.

У кислий бік величина рН (4,0–5,6) вмісту рубця зміщується за надмірного надходження в рубець легкоферментованих вуглеводів (цукровий буряк, кукурудза у стадії молочно-воскової стиглості, меляса), при цьому бурхливо розвивається молочнокисле бродіння і надмірно продукується молочна кислота, що спричиняє розвиток *ацидозу*. У кислому середовищі діяльність інфузорій і бактерій гальмується, а то й спостерігається їх загибель. У тварин відмічають ознаки гострих розладів травлення, анорексію, атонію або тимпанію рубця, інколи – тремор м'язів і брадикардію.

Під впливом молочнокислих бактерій руйнуються деякі амінокислоти, утворюються шкідливі протеїногенні аміни (гістамін, тирамін, кадаверин), які всмоктуються в кров і сприяють розвитку ламініту й гіпотонії передшлунків. За даними О.В.Чуба [9], величина рН вмісту рубця у корів, хворих на кетоз, знижується до $6,25 \pm 0,08$.

Зміщення величини рН вмісту рубця в лужний бік називається *алкалозом*. Виникає він за надмірного споживання трави бобових рослин та інших високобілкових кормів і небілкових азотистих продуктів. Внаслідок цього в рубці утворюється надмірна кількість аміаку (оптимальна кількість амонійного азоту від 5 до 20 мг на 100 мл), яка не може повністю асимілюватися мікроорганізмами. Значна його частина вступає у взаємодію з ЛЖК і нейтралізує їх, що підвищує рН до 7,2–8,0.

За таких умов життєдіяльність симбіонтної мікрофлори гальмується, а натомість розвиваються гнильні мікроорганізми, які утворюють велику кількість отруйних речовин (фенол, крезол, індол, скатол та ін.). Розвиваються токсикоз, гіпотонія передшлунків, пригнічення, а в разі ураження печінки – печінкова енцефалопатія і кома.

Література: [12, С. 292–298; 26, С. 10–12; 60, С. 311–313; 96, С. 82–90].

РОЗДІЛ 20

ВИЗНАЧЕННЯ ФУНКЦІОНАЛЬНОЇ АКТИВНОСТІ МІКРОФЛОРИ РУБЦЯ

20.1. Проба з метиленовим синім (за G. Dirksen)

Принцип проби. Метиленовий синій, введений у вміст рубця (*in vitro*), знебарвлюється, відновлюючись ферментами мікроорганізмів.

Прилади та реактиви: водяна баня, секундомір або годинник, пробірки або хімічні стаканчики, скляні палички, 0,03% розчин метиленового синього.

Хід реакції. У пробірку наливають 10 мл свіжовзятого вмісту рубця, додають до нього 0,5 мл 0,03% розчину метиленового синього і перемішують скляною паличкою. Паралельно ставлять контрольну пробу без додавання фарби. Пробірки поміщають у водяну баню за температури 38°С і контролюють час знебарвлення фарби, порівнюючи дослідну пробу із контрольною. Якщо пробу виконують у хімічних стаканчиках, то беруть 20 мл вмісту та 1 мл метиленового синього.

Клінічне значення. У здорової великої рогатої худоби за змішаного типу годівлі знебарвлення настає протягом трьох хвилин. Якщо час знебарвлення подовжується до 15–17 хв і більше, то це є показником зниження ферментативної активності мікроорганізмів, що спостерігається за порушення годівлі тварин (низька якість корму, недостатня кількість сіна в структурі раціону) та захворювання передшлунків (хронічний румініт, гострий ацидоз рубця, алкалоз рубця). За даними О.В.Чуба [9], редуктазна активність у здорових корів становить у середньому 99,0±9,0 с; у корів, у структурі раціону яких сіно становило 18%, – 32,0±12 с; сіно (11,5%), силос і сінаж (63,5%) – 52,0±2 с, а за відсутності сіна в раціоні – 113±

13 с. У корів, хворих на кетоз, редуктазна активність знижується до 221±55 с (175–292), за ураження кінцівок – до 529±205 с (300–732), а через зміщення сичуга вона становить лише 760±40,2 с (716–803), що є показником тяжкого порушення рубцевого травлення.

Література: [26, С. 12; 60, С. 317; 90, С. 151; 91].

20.2. Проба зі збродженням глюкози

Принцип проби. Легкоперетравні вуглеводи надходять із кормом у рубець, ферментуються мікрофлорою до ЛЖК та газів (вуглекислий газ, метан, водень). Додаючи глюкозу до вмісту рубця (*in vitro*), визначають швидкість і об'єм газоутворення. За об'ємом утвореного газу оцінюють здатність мікроорганізмів до ферментації вуглеводів.

Прилади та реактиви: цукрометр або градуйовані пробірки, термостат, 16% розчин глюкози (свіжоприготовлений).

Техніка виконання. У цукрометрі або градуйованій пробірці змішують 10 мл вмісту рубця з 0,5 мл 16% розчину глюкози (злегка підігрітого) і ставлять у термостат за 38° С. Інтенсивність ферментації глюкози визначають за величиною утвореного прошарку газів через 30 та 60 хв.

Клінічна інтерпретація. У вмісті рубця здорової великої рогатої худоби збродження глюкози протягом 30 хв призводить до утворення газового прошарку висотою 1 см, а через 60 хв – 2 см. У разі інактивації мікрофлори (ацидоз, алкалоз) утворюється незначна кількість газів, або вони зовсім відсутні. За тимпанії рубця газоутворення значно зростає.

Література: [26; 60, С. 317–318; 90, С. 151].

20.3. Проба з відновленням нітритів

Принцип методу. Внесення калію нітриту у вміст рубця (*in vitro*) призводить до його відновлення мікроорганізмами та використання азоту, що характеризується знебарвленням червоного кольору реактивів 1 і 2.

Прилади: водяна баня, пробірки, пластина з комірками.

Реактиви: 1) 0,025% розчин калію нітриту (KNO_2); 2) реактив 1–2,0 мл концентрованої сульфатної кислоти змішують з 200 мл 30% оцтової кислоти; 3) реактив 2 – 0,6 мл α -нафтиліну і 16,0 мл концентрованої оцтової кислоти змішують із 140 мл дистильованої води.

Хід реакції. У три пробірки наливають по 10 мл вмісту рубця. У першу пробірку вносять 0,2 мл, другу – 0,5 мл і, за необхідності, у третю – 0,7 мл 0,025% розчину калію нітриту. Пробірки ставлять у водяну баню за температури 39° С. Через 5 хв з кожної пробірки відбирають по краплі суміші і наносять на пластину з комірками. Потім добавляють до неї по 2 краплі реактивів 1 і 2. Якщо відновлення нітритів не настало, то суміш забарвлюється у червоний колір. У разі відновлення калію нітриту мікрофлорою суміш не змінює кольору. Залежно від активності мікрофлори рубця відновлення калію нітриту відбувається у різний час. Перший раз

спостереження ведуть через 5 хв. За появи червоного забарвлення продовжують спостерігати через кожну хвилину.

Клінічне значення. У вмісті рубця здорових тварин відновлення калію нітриту завершується через 5–10 хв у першій пробірці і відповідно через 20 та 30 хв – у другій і третій. У разі порушення ферментативної активності мікрофлори (ацидоз, алкалоз, гіпотонія й атонія рубця) час відновлення калію нітриту затягується на 10 і 30 хв у першій та другій пробірках відповідно, або воно не відбувається. За пінистої тимпанії відновлення нітритів проходить швидше – протягом 5 хв у першій і 20 хв – у другій пробірках.

Література: [26; 60, С. 318; 90, С. 152].

20.4. Визначення целюлазної активності мікрофлори

Клітковина грубого корму у рубці жуйних гідролізується ферментами, які виробляє целюлолітична мікрофлора, що заселяє рубець від часу поїдання перших порцій сіна (приблизно у двотижневому віці). Уже в 2–3-місячному віці целюлазна активність мікроорганізмів є такою ж, як і в дорослих тварин. Розщеплення клітковини призводить до утворення ЛЖК, які є джерелом енергії для жуйних. У передшлунках засвоюється 60–70% клітковини.

Є кілька методів визначення целюлазної активності мікроорганізмів рубця: за допомогою бавовняної нитки, аморфної целюлози та хроматографічного паперу (цей метод рекомендований міжнародною комісією ПОПАК із біотехнології як основний стандартний тест) [90].

Принцип проби ґрунтується на здатності целюлолітичної мікрофлори перетравлювати бавовняну нитку (*in vitro*).

Прилади та реактиви: термостат, пробірки, скляна кулька, натуральна бавовняна нитка № 40 (штучну чи напівштучну не використовувати), 16% розчин глюкози.

Хід виконання. У пробірці змішують 10 мл свіжого вмісту рубця і 0,3 мл 16% розчину глюкози. На кінець бавовняної нитки прив'язують скляну кульку і опускають на дно пробірки із вмістом рубця. Другий кінець нитки фіксують кругом зовнішньої стінки пробірки. Пробу ставлять у термостат за 39° С і через 12 год проводять перший контроль. Вміст рубця здорових тварин перетравлює нитку протягом 96 год. Якщо перетравлення протягом 96 год не настало, то целюлазна активність вважається зниженою або негативною.

Клінічне значення. У високопродуктивних корів целюлазна активність мікроорганізмів становить у середньому 90 год з коливаннями від 87 до 93 год. У термін до 96 год вона проявлялася у 41% корів, а за патології (кетоз, гепатодистрофія, ендометрит, ураження кінцівок) – лише у 8–12,4%. У разі зміщення сичуга целюлазна активність мікроорганізмів протягом 96 год не виявляється у жодної тварини [8].

Література: [26; 60, С. 318–319; 90, С. 152–153; 91].

20.5. Визначення амілазної активності мікроорганізмів вмісту рубця (за методом Коравця)

Принцип методу. Визначення амілазної активності вмісту рубця базується на розщепленні крохмалю мікробною α -амілазою з утворенням продуктів, які не дають кольорової реакції з йодом. Активність α -амілази оцінюють за зменшенням концентрації крохмалю.

Обладнання: аналітична вага, фотоелектроколориметр, термостат, мірні колби, секундомір, пробірки, піпетки.

Реактиви: 1) 6,25% розчин крохмалю, який готується безпосередньо перед використанням. У колбочку відважується 6,25 г водорозчинного крохмалю і доливається 80 мл дистильованої води. Після одержання суспензії крохмалю колбочку поміщають у киплячу водяну баню на 10 хв (до повного розчинення крохмалю), часто струшуючи. Розчин крохмалю, охолоджений до кімнатної температури, переносять у мірну колбочку на 100 мл і доводять об'єм прокип'яченою дистильованою водою до мітки; 2) фосфатний буфер (рН=6,8) – 13,3 г Na_2HPO_4 (безводного) насипають у мірну колбу на 1 л і доводять дистильованою водою до мітки; 3) 2 н розчин хлоридної кислоти (HCl) – 73 г HCl (61,3 мл) приливають у мірну колбу на 1 л, в якій уже є 0,5 л дистильованої води, після охолодження об'єм доводять до мітки водою (розчин краще готувати з фіксаналу);

4) розчин йодо-йодиду калію – розчиняється 20 г калію йодиду і 2 г кристалічного йоду в 1 л дистильованої води.

Хід визначення. 1. У пробірці “А” змішують 1,6 мл 6,25% розчину крохмального субстрату з 7,4 мл фосфатного буфера. Після нагрівання пробірки у водяній бані протягом 10 хв за температури 40° С додають 1 мл рідини рубця, процідженого через 2 шари марлі. Вміст пробірки “А” старанно збовтують.

2. З пробірки піпеткою одразу переносять 0,5 мл цієї рідини у мірну колбу на 50 мл, у якій міститься 2 мл 2 н розчину HCl для припинення дії мікробних ферментів. У колбочку додають 2 мл розчину йодо-йодиду

калію і дистильованою водою доводять об'єм до 50 мл (проба до інкубації).

3. Після цього пробірку "А" переносять на 1 год у водяну баню за температури 40°С і періодично (через 10–15 хв) вміст її перемішують струшуванням.

4. Після закінчення інкубації з пробірки "А" відбирають 0,5 мл рідини і переносять у мірну колбочку на 50 мл, в якій міститься 2 мл 2 н розчину НСІ. Додають 2 мл йодо-йодиду калію і дистильовану воду до позначки (проба В- після інкубації).

Одержані розчини проб до інкубації і через 1 год після інкубації колориметрують у кюветах з товщиною робочого шару 5 мм з червоним (620 нм) фільтром відносно дистильованої води.

Розрахунки. За калібрувальною кривою визначають кількість мг крохмалю в розчинах до інкубації і після неї, а різниця між цими показниками вказує на кількість мг крохмалю, розщепленого мікробною амілазою протягом 1 год інкубації. Амілазна активність виражається кількістю крохмалю в міліграмах, який розщеплюється 1 мл вмісту рубця протягом 1 год інкубації: $(A - B) \times 20 = \text{мг}$, де: А – кількість мг крохмалю у розчині до інкубації; В – кількість мг крохмалю після інкубації; 20 – перерахунок на 1 мл вмісту рубця.

Клінічне значення. У разі забезпечення раціону крохмалем на 145%, коли частка сіна в ньому за обмінною енергією складала 8,9%, амілазна активність становила $89,7 \pm 2,68$ мг крохмалю за 1 год; за забезпечення крохмалем на 92,8% та частки сіна 11,5% амілазна активність знижувалася до $38,2 \pm 5,4$ мг крохмалю за 1 год.

Література: [26, С. 15–16; 60, С. 319–320].

20.6. Визначення активності α -амілази (за методом Каравея)

Принцип методу полягає в кількісному визначенні редукуючих цукрів, які утворюються внаслідок ферментативного розщеплення крохмалю. В основу кількісного визначення цукрів покладена кольорова реакція з 3,5-динітросаліциловою кислотою, яка в лужному середовищі за наявності редукуючих цукрів перетворюється в 3-аміно-5-нітросаліцилову кислоту і утворює розчин жовто-помаранчевого кольору.

Обладнання. Фотоколориметри, водяна баня, колби, мірні стакани, піпетки.

Реактиви: 1) розчин 3,5-динітросаліцилової кислоти (1г 3,5-динітросаліцилової кислоти і 30 г сегнетової солі розчиняють у 20 мл

2 н розчину NaOH та доводять об'єм до 100 мл); 2) 2 н розчин NaOH (80 г NaOH висипають у мірну колбу на 1 л і доводять до мітки дистильованою водою); 3) калій-натрій виннокислий (сегнетова сіль); 4) мальтоза (для приготування стандартного розчину); 5) 1/15 М розчин натрію хлориду; 6) 1% розчин крохмалю (субстрат).

Хід реакції. Рідину рубця розводять дистильованою водою у співвідношенні 1:5.

1. У дослідну пробірку наливають 1 мл 1% розчину крохмалю і ставлять у водяну баню за 39° С на 1–2 хв.

2. Добавляють 1 мл розведеного вмісту рубця, інкубують 20 хв.

3. Добавляють 2 мл 3,5-динітросаліцилової кислоти для припинення реакції.

4. У контрольну пробірку набирають 2 мл розчину 3,5-динітросаліцилової кислоти, 1 мл розведеного вмісту рубця, а потім 1 мл 1% розчину крохмалю і перемішують.

5. Обидві пробірки поміщають у киплячу водяну баню на 5 хв, відразу охолоджують у проточній воді і фотометрують за 530 нм.

6. Активність α -амілази вираховують за різницею показників оптичної густини між досліджуваними і контрольними пробами, а потім за калібрувальним графіком визначають кількість мальтози, яка звільняється внаслідок ферментативної реакції за 1 хв інкубації, за формулою:

$$E = \frac{A \cdot P}{20},$$

де E – число одиниць активності α -амілази, виражене в мг мальтози, яка утворюється за 1 хв інкубації; A – кількість мальтози, визначеної за графіком; P – величина розведення вмісту рубця (у 5 разів); 20 – час інкубації, хв.

Якщо параметри витримані, то:

$$E = \frac{A \cdot 5}{20} = \frac{A}{4}.$$

П р и м і т к а. Необхідно опрацювати кінетику ферменту, тобто тривалість інкубації.

Клінічне значення. Введення в раціон жуйних кормів із високим вмістом крохмалю призводить до підвищення загальної кількості амілолітичних мікроорганізмів у рубці. Тому амілазна активність рідини рубця у них значно вища, ніж у тварин, яким згодовують корми з низьким

умістом крохмалю, що зумовлено стимулювальною дією крохмалю на активність ферменту [9]. Є дані, що на активність амілолітичних ферментів бактерій впливають деякі амінокислоти. Наприклад, метіонін у концентрації 1–2 мг на 1 мл середовища стимулює, а лізин, навпаки, інгібує амілазну активність бактерій та їх ріст.

Література: [26, С. 16–17; 60, С. 320–321; 90, С. 155–156].

20.7. Визначення протеолітичної активності вмісту рубця

Принцип методу полягає в тому, що за величини рН більше 5,0, альфа-амінокислоти реагують з нінгідрином з утворенням вуглекислоти, альдегіду і сполуки, забарвленої у синій колір, яка характеризується максимальним поглинанням за 597 мкм. Інтенсивність забарвлення прямо пропорційна кількості амінокислот.

Обладнання: фотоелектроколориметр, водяна баня, центрифуга, колби, піпетки, пробірки з притертими пробками.

Реактиви: 1) фосфатний буфер рН 7,1 (4,49 г KH_2PO_4 переносять у мірний посуд на 1 л, приливають 0,8–0,85 л бідистильованої води і під контролем рН-метра встановлюють величину рН 7,1–7,2 за допомогою 0,1 н NaOH ; 2) цитратний буфер, рН 5,4; 3) 2% розчин казеїну, приготовлений на 0,5% розчині Na_2CO_3 ; 4) 0,5% розчин натрію карбонату; 5) 10% розчин ТХО кислоти; 6) 0,01 н розчин HCl ; 7) 60% розчин гліцерину; 8) 1% розчин нінгідрину (розчиняють за підігрівання в цитратному буфері; реактив темного кольору необхідно очищати); 9) розчин “С”: до 40 мл 60% гліцерину додають 100 мл 1%-ного нінгідрину і 40 мл цитратного буфера (готують перед початком проведення досліджень); 10) стандарт: у мірну колбу на 25 мл вносять 10 мг тирозину, розчиняють у 5 мл 0,1N NaOH , об’єм доводять розчином NaOH до мітки.

Хід визначення. 1. В одну пробірку (дослід) вносять 4 мл розчину казеїну, 1 мл фосфатного буфера і розміщують у водяній бані за температури 30° С.

2. Через 10 хв додають 1 мл розведеного у 5 разів дистильованою водою вмісту рубця (1 мл вмісту + 4 мл води). Змішують та інкубують за 30° С протягом 60 хв.

3. Додають 4 мл 10% розчину ТХО кислоти для припинення реакції.

4. Струшують 10 хв, далі центрифугують або фільтрують (фільтрат має бути прозорим).

5. Набирають 0,5 мл фільтрату або аліквоту, додають 3,8 мл розчину “С”, пробірки закривають притертими скляними пробками і занурюють у киплячу водяну баню на 20 хв.

6. Проби, забарвлені в синій колір, охолоджують у проточній воді і фотометрують через 10–15 хв на приладі з червоним світлофільтром (597 мкм) у кюветі з товщиною робочого шару 10 мм. Інтенсивність забарвлення зберігається протягом 1 год.

7. У контрольну пробірку вносять 1 мл розбавленого вмісту рубця, 1 мл фосфатного буфера, 4 мл ТХО кислоти витримують 10 хв у водяній бані за температури 30°С. Після цього вносять 4 мл розчину казеїну, розмішують та фільтрують. Далі дослідження виконують так само, як із дослідною пробою (п.п. 5, 6).

8. Кількість вільного амінного азоту визначають за калібрувальним графіком. Для його побудови беруть стандартні розчини тирозину або гліцину і готують розчини, які містять різну кількість цих амінокислот (мкмоль), далі реакцію проводять так, як описано вище. Активність ферменту виражають у мікромолях амінного азоту гліцину або тирозину за 1 хв на 1 г ферментного препарату (вмісту рубця), що відповідає 1 од активності:

$$X = \frac{a \cdot b}{v},$$

де: a – показник стандартного графіка; b – ступінь розведення (у 5 разів); v – час інкубації – 60 хв.

Клінічне значення. У дорослих жуйних білки в рубці гідролізуються ферментами мікроорганізмів, у сичузі й тонкому кишечнику – ферментами макроорганізму. У рубці розщеплюється 50–80% азотистих речовин кормів, які використовуються для синтезу мікробного білка. Гідроліз білка складається з двох етапів (рис. 20.1).

Спочатку протеїн корму під впливом протеїназ розщеплюється до поліпептидів, які, у свою чергу, пептидазами гідролізуються до амінокислот. Оптимальною реакцією для протеїназ вважається рН близько 7,0 (за 5,7 вона удвічі нижча), а для пептидаз – від 5,5 до 7,7.

Частина вільних амінокислот, особливо незамінних, відразу ж використовується мікроорганізмами для синтезу білка, незначна частина всмоктується у стінці рубця, а решта розпадається. Основною реакцією розпаду амінокислот є дезамінування під впливом бактеріальних дезаміназ. Кінцеві продукти дезамінування – аміак, вуглекислий газ та коротколанцюгові жирні кислоти. Оптимальною реакцією для дії більшості дезаміназ є рН майже 7,0.

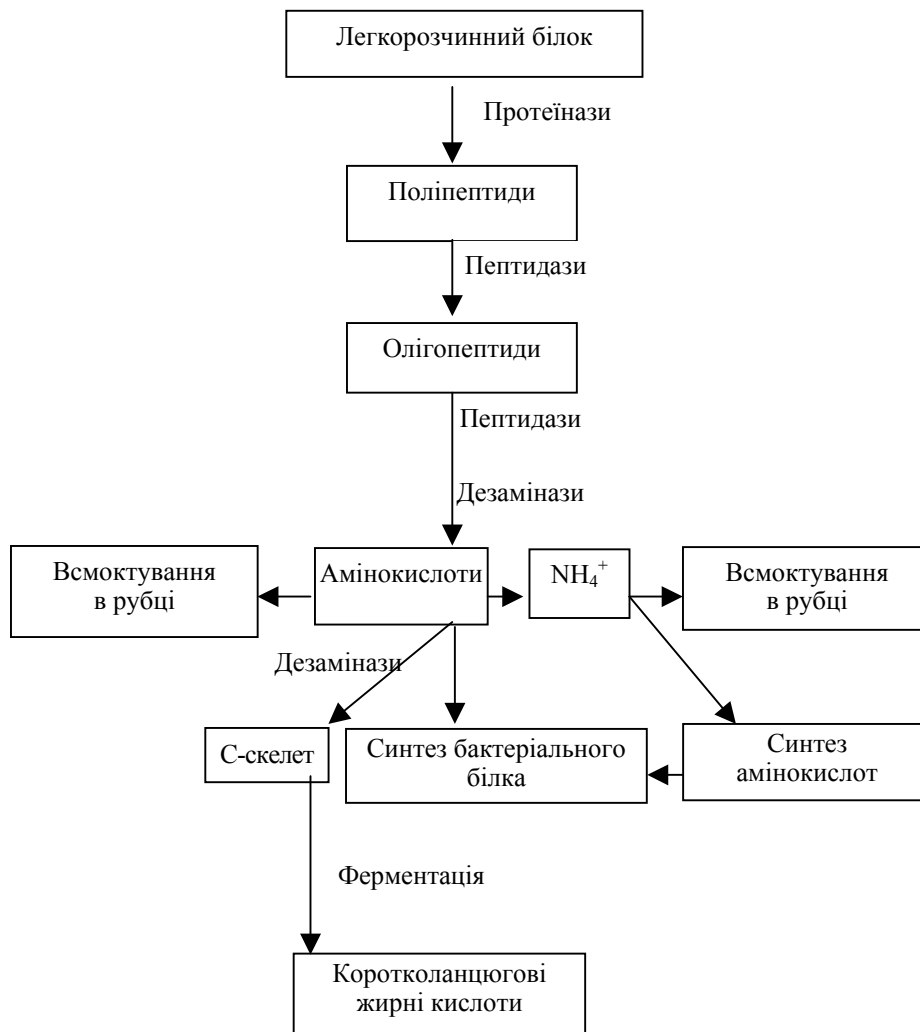


Рис. 20.1. Схема перетворення протеїну в рубці
(Янович В.Г., Сологуб Л.І., 2000) [96].

Аміак, що утворюється в рубці у процесі дезамінування амінокислот, частково всмоктується через його стінку в кров. В основному він використовується мікроорганізмами рубця для синтезу амінокислот і білка. Вважається, що лише бактерії здатні використовувати азот аміаку в синтетичних процесах (50–80% азоту мікроорганізмів походить із азоту аміаку), інфузорії не використовують або ж використовують незначну його кількість. Найбільш ефективно використовується аміак у синтезі амінокислот мікроорганізмами за концентрації його в рідині рубця 5 ммоль/л (9 мг/100 мл).

Мікроорганізми рубця в синтезі власних білків використовують синтезовані ними амінокислоти та амінокислоти, які звільняються під час розщеплення протеїну кормів. Амінокислоти, які звільняються в результаті розщеплення мікробного протеїну, становлять від 50 до 90% загальної кількості, що всмоктується в тонкому кишечнику жуйних тварин. Синтез мікробного протеїну в рубці жуйних залежить насамперед від умісту в

раціоні енергії і розчинного протеїну. В рубці овець він становить 50–100, корів – 700–1500 г за добу.

Важливим фактором, що впливає на ефективність синтезу бактеріального протеїну в рубці, є ступінь забезпечення потреби мікроорганізмів в енергії. Вважається, що близько 75% енергії, необхідної для росту мікроорганізмів, витрачається на синтез білка. Найбільшою мірою забезпечують потребу мікроорганізмів в енергії цукор і крохмаль, за ферментації яких до ЛЖК утворюється АТФ, тому оптимальний уміст їх у раціоні тварин позитивно впливає на ферментативні процеси і синтез бактеріального протеїну в рубці. За нестачі легкоферментованих вуглеводів синтез бактеріального білка гальмується, значна частина продуктів білкового обміну, передусім аміак, переходить у кров і впливає токсично на різні системи.

Синтезований мікрофлорою рубця білок має високу біологічну цінність: із 100 г мікробного білка в організмі жуйних утворюється 80 г білка тварин, тоді як з рослинного – не більше 50–60 г.

Література: [12, С. 62–66; 26, С. 17–20; 60, С. 321–322; 96, С. 89–118].

20.8. Визначення ліполітичної активності вмісту рубця

Принцип методу. Вміст рубця інкубують із приготовленою емульсією соняшникової олії. Показником активності ферментів є кількість вивільнених вільних жирних кислот.

Обладнання: термостат, холодильник, бюретка, колбочки на 100 мл з притертими пробками.

Реактиви: 1) соняшникова олія; 2) жовч; 3) 0,6% розчин цистеїну солянокислого або аскорбінової кислоти; 4) 20% розчин фосфорно-вольфрамової кислоти; 5) 0,01 н розчин NaOH; 6) розчин Рінгера-Локка (9 г NaCl; 0,2 г NaHCO₃; 0,2 г CaCl₂; 0,2 г KCl; 1 г глюкози; вода дистильована до 1 л); 7) розчин Таширо – 40 мл 0,1% спиртового розчину метиленового червоного і 10 мл 0,1% спиртового розчину метиленового синього.

Хід визначення. 1. Вміст рубця добре перемішують і розводять 1:10 дистильованою водою.

2. Готують субстратну суміш: соняшникової олії – 3 мл, розчину Рінгера-Локка – 3 мл, 0,6% розчину цистеїну солянокислого – 1 мл, жовчі – 3 краплі.

3. У колбочки (2 – дослідні і 2 – контрольні) з притертими пробками об'ємом 100 мл набирають по 3 мл субстратної суміші і 1 мл вмісту рубця. Дослідні проби розміщують у термостаті за температури 39° С на 5 год, контрольні – у холодильнику. Через кожну годину проби струшують протягом 5 хв.

4. Через 5 год добавляють по 3 краплі 20%-ного розчину фосфорновольфрамової кислоти, дослідні проби поміщають у холодильник.

5. Уміст колбочок фільтрують у пробірки, додають по 1 краплі реактиву Таширо. Дослідні і контрольні проби титрують 0,01 н розчином NaOH до появи рожевого забарвлення.

6. Ліполітичну активність вмісту рубця (ЛА) визначають за формулою:

$$ЛА = \frac{A - B}{5},$$

де – ЛА – ліполітична активність в одиницях за 1 год інкубації; А – кількість 0,01 н розчину NaOH, витрачена на титрування дослідних проб; В – кількість 0,01 н розчину NaOH, витрачена на титрування контрольних проб; 5 – термін інкубації, год.

Клінічне значення. Ліпіди кормів у рубці частково гідролізуються ліпазами мікроорганізмів. Одним з основних серед них є *Anaerobrio lipolytica*, який продукує ліпазу та естеразу. Мікроорганізми гідролізують також фосфоліпіди і стеролові ефіри. Роль інфузорій у продукуванні ліполітичних ферментів є незначною.

Вивільнені за ліполізу жирні кислоти частково використовуються мікроорганізмами у синтезі власних ліпідів і в процесі метаболізму, решта їх транспортується у тонкий кишечник, де вони всмоктуються. Незначна кількість (майже 1%) вивільнених довголанцюгових жирних кислот окиснюється бактеріями та інфузоріями рубця з утворенням коротколанцюгових жирних кислот і CO₂.

Окрім ліполізу, мікроорганізми рубця здійснюють синтез ліпідів (за добу в рубці корови синтезується 150–350 г ліпідів), беруть участь у гідрогенізації поліненасичених жирних кислот – лінолевої і ліноленової, трансформуючи їх у мононенасичену (олеїнову) і насичену (стеаринову), та перетворенні поліненасичених жирних кислот з *цис-форми* у *транс-форму* (остання є небажаною для організму людей). Норми ліполітичної активності мікроорганізмів рубця в літературі відсутні.

Література: [26, С. 21–22; 60, С. 322; 90, С. 159–160].

РОЗДІЛ 21

ХІМІЧНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ ВМІСТУ РУБЦЯ

21.1. Визначення загальної кислотності вмісту рубця

Принцип методу. Загальну кислотність вмісту рубця визначають подібно до кислотності вмісту шлунка чи сичуга. Вміст рубця в присутності індикатора титрують розчином лугу, що призводить до зміни кольору в нейтральному середовищі.

Обладнання: мікробюретки на 2 і 5 мл, колби на 50 і 100 мл, скляночки або конічні колбочки, піпетки на 5 та 10 мл, крапельниця.

Реактиви: 1% спиртовий розчин фенолфталеїну (1 г фенолфталеїну вносять у колбочку на 100 мл і розчиняють 96% етиловим спиртом); приготовлений індикатор зберігають за кімнатної температури; 0,1 н розчин натрію гідроксиду (NaOH) готують з фіксаналу або порошку. Перед застосуванням його титр перевіряють 0,1 н розчином хлоридної кислоти (HCl).

Хід реакції. У стаканчик або конічну колбочку наливають 10 мл профільтрованого вмісту рубця і додають 1–2 краплі 1% розчину фенолфталеїну. За кислої реакції вмісту індикатор не змінює кольору. Додавання з мікробюретки 0,1 н розчину натрію гідроксиду змінює колір до рожево-червоного. Загальну кислотність вмісту рубця визначають за кількістю мілілітрів 0,1 н розчину натрію гідроксиду, необхідного для титрування 1 л вмісту рубця (одиниць титру). Одна одиниця титру (ОТ) відповідає концентрації кислот 1 ммоль/л.

Розрахунок загальної кислотності проводять за формулою:

$$X = \frac{a \cdot 1000 \cdot 0,1}{C},$$

де X – загальна кислотність, одиниць титру чи ммоль/л; a – кількість 0,1 н розчину NaOH у мл, витраченого на титрування; 1000 – перерахунок на 1 л вмісту рубця; $0,1$ – кількість мг-екв. лугу в 1 мл 0,1 н розчину, ммоль; C – кількість вмісту рубця, взятого для дослідження, мл.

Якщо всі параметри витримані, то формула має вигляд:

$$X = a \cdot 10.$$

Клінічне значення. У клінічно здорових корів з нормальною ферментацією вмісту загальна кислотність складає 8–25 ммоль/л (ОТ). За гіперацидного стану (ацидоз, зміщення сичуга, антиперистальтика) загальна

кислотність зростає до 70 ммоль/л (ОТ). За даними О.В. Чуба [9], у корів, хворих на вторинну дистонію рубця, загальна кислотність суттєво не відрізнялася від показників клінічно здорових тварин і становила $21,8 \pm 1,1$ і $23,2 \pm 2,3$ ОД титру відповідно. В.В. Влізло [14] відмічає, що за збільшення величини рН вмісту рубця загальна кислотність, навпаки, знижується.

Література: [26, С. 22–23; 60, С. 323; 90, С. 160–161; 91].

21.2. Визначення загальної кількості летких жирних кислот (ЛЖК)

Принцип методу. Під дією гарячої пари відбувається відганяння летких жирних кислот, що містяться у рубцевому вмісті, з наступним визначенням їх кількості шляхом титрування розчином лугу.

Обладнання. Апарат Маркгама, електроплитка (нагрівач), штатив для титрування, лабораторний посуд.

Реактиви: 1) насичений розчин магнію сульфату (сіль вносять в 1 л дистильованої води кімнатної температури до того часу, поки вона не перестане розчинятися, потім фільтрують), до 1 л якого додають 25 мл концентрованої сульфатної кислоти); 2) 0,1 н розчин NaOH; 3) індикатор – фенолфталеїн.

Хід роботи. Із загальної проби профільтрованого вмісту рубця відбирають у скляночку 5 мл рідини і додають 5 мл насиченого розчину магнію сульфату. Після цього 4 мл отриманої суміші (еквівалент 2 мл рідини рубця) переносять у апарат Маркгама для відганяння (рис. 21.1).

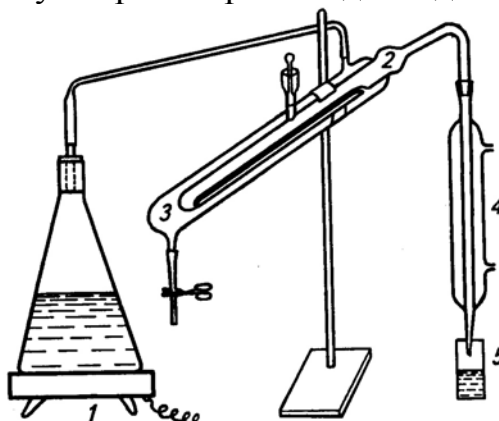


Рис. 21.1. Схема визначення летких жирних кислот в апараті Маркгама:

1 – колба на нагрівачі; 2 – внутрішня трубка; 3 – зовнішня трубка; 4 – холодильник; 5 – стаканчик для збирання конденсату ЛЖК

Пробу обережно заливають у внутрішню трубку приладу через лійку. Водяна пара із пароутворювача проходить між зовнішньою і внутрішньою трубками апарата, обігріває внутрішню трубку, а потім через отвір надходить у внутрішню камеру. Під дією пари відбувається “відганяння” ЛЖК, які разом із водяною парою потрапляють у холодильник, де і відбувається їх конденсація. Відбирають у стаканчик 50 мл рідини і титрують 0,1 н розчином лугу в присутності індикатора фенолфталеїну до появи слабо-рожевого кольору. Відмічають кількість розчину лугу (мл), витраченого на титрування.

З метою контролю повного видалення ЛЖК необхідно продовжити дистиляцію проби рубцевої рідини і провести титрування другої порції дистиляту (50 мл). За відсутності ЛЖК у другій пробі рідина в стаканчику одразу ж набуває рожевого забарвлення після додавання декількох крапель лугу.

Загальну кількість ЛЖК в 1 л вмісту рубця визначають за формулою:

$$X = \frac{A \cdot 0,1 \cdot 1000}{B}, \text{ або } X = A \cdot 50 \text{ (ммоль/л)},$$

де X – загальна кількість ЛЖК, ммоль/л; A – кількість 0,1 н розчину NaOH, витраченого на титрування (мл); $0,1$ – нормальність розчину NaOH; 1000 – перерахунок концентрації ЛЖК на 1 л вмісту рубця; B – кількість рідини рубця, взятої для аналізу (2 мл).

Клінічне значення. За добу мікроорганізми рубця у корів синтезують 4–6 кг, в овець – 0,3–0,4 кг ЛЖК (їх ще називають коротколанцюговими – КЖК). Концентрація ЛЖК у рубці клінічно здорових корів коливається в межах 80–150 ммоль/л (в середньому 120 ммоль/л). *Збільшення* їх загальної кількості буває за годівлі висококонцентратного типу, *зменшення* – менше 80 ммоль/л – у разі захворювання рубця (гіпо- і атонія, алкалоз), оскільки зменшується кількість та активність мікроорганізмів. Особливо мало ЛЖК під час зміщення сичуга – 52–76 (65±10,4 ммоль/л) [91].

Література: [26, С. 23–25; 45; 48; 60, С. 313–314; 91].

21.3. Хроматографічний аналіз летких жирних кислот

Принцип методу. Під дією високої температури (210° С) кислоти починають випаровуватися. Проходячи через колонку, заповнену хромосорбом-101, вони повністю відокремлюються одна від іншої. Потрапляючи в детектор, згоряють у полум'ї чистого водню, при цьому утворюється певний електричний потенціал, який реєструється на самописці у вигляді піків. Чим більше кислоти міститься в досліджуваній пробі, тим більшою буде висота піку.

Обладнання. Газовий хроматограф “Хром-5”, генератор водню “Водень-1”, компресор, балон з азотом, скляна колонка довжиною 1,5 м, заповнена хромосорбом-101, самописець, рулон паперу з міліметровими позначками, олівець для запису показників, мікрошприц на 10 мкл, лабораторна вага ВЛР-200, наважки не менше 2-го класу точності.

Реактиви: 1) стандарти летких жирних кислот (оцтової, пропіонової, масляної, ізомасляної, валеріанової та ін.) зі ступенем чистоти понад 99%; 2) сорбент хромосорб-101.

Хід визначення. Перед початком досліджень проводять підготовку стандартів. Для цього готують суміш ЛЖК у такому співвідношенні, щоб воно приблизно відповідало середнім показникам вмісту летких жирних кислот, що знаходяться в рідині рубця. Прилад “Хром-5” перед роботою необхідно прогріти протягом 1,5–2 год. Показником готовності приладу до роботи є чітка нульова лінія на самописці. Вихідні дані приладу: швидкість руху азоту – 40 мл/хв (визначаємо піновимірником), швидкість руху водню – 40 мл/хв, повітря – 400 мл/хв. Робоча температура камери вводу досліджуваної проби становить 170° С, камери з колонкою і детектором – 210° С.

Порядок включення і роботи приладу. Відкривають балон із азотом. Включають “Хром-5”, генератор водню і компресор. Після цього виставляють на приладі необхідні параметри роботи: швидкість руху азоту, водню і повітря, температурний режим: камера вводу проби – 170° С, камера з колонкою і детектором – 210° С. На детекторі підпалюють водень і вмикають кнопку “Нагрів”. Далі вставляють олівець і вмикають самописець. Протягом 1,5–2 год прилад прогривають за постійного контролю температурного режиму і самописця. Якщо через 2 год самописець викреслює чітку нульову (горизонтальну) лінію, то прилад готовий до роботи. Потім у мікрошприц набирають 3 мкл досліджуваної проби і вводять у камеру вводу. На папері самописцем фіксується отриманий результат. Протягом усієї роботи приладу слід контролювати температурний режим.

Підрахунок отриманих результатів. За допомогою міліметрової лінійки вираховують площу піків кожної кислоти в окремо взятій пробі та стандартній суміші. Для цього вимірюють висоту піку і множать на ширину на половині його висоти. Отримані результати щодо кожної кислоти додають і підраховують площу проби. Наприклад, висота піку оцтової кислоти – 40 мм, ширина на середині висоти – 6 мм, тоді площа становить: $40 \times 6 = 240 \text{ мм}^2$. Таким же чином підраховують площу усіх наявних кислот. Сума площ усіх кислот складає 100%, а площа окремо взятої кислоти дорівнює „X”. Після проведення необхідних математичних розрахунків отримують відсоткове значення окремо взятої кислоти. Наприклад, загальна площа усіх кислот становить 560 мм^2 , а площа оцтової кислоти – 240 мм^2 . Складають пропорцію:

$$\begin{aligned} & \frac{560 \text{ мм}^2 - 100\%}{240 \text{ мм}^2 - X} \\ X &= \frac{240 \cdot 100}{560} = 42,85 \%. \end{aligned}$$

Знаючи, що поправний коефіцієнт для оцтової кислоти становить 1,125, множать отриманий результат на цей коефіцієнт: $42,85 \times 1,125 = 48,2\%$. Отже, відносний уміст оцтової кислоти становить 48,2%.

Визначення поправкових коефіцієнтів. За допомогою мікросприца вводять 3 мкл стандарту в камеру вводу і записують показники на самописці. Проводять підрахунок отриманих результатів і визначають поправковий коефіцієнт.

Наприклад: у стандартній суміші міститься 60% оцтової, 20 – пропіонової, 15 – масляної, 2 – ізовалеріанової і 3% валеріанової кислот. Проводячи підрахунки хроматограм, отримують наступні показники: оцтова кислота – 52, пропіонова – 18, масляна – 23, ізовалеріанова – 2,9 і валеріанова кислоти – 4,1%.

Вираховують поправковий коефіцієнт для оцтової кислоти: $60:52=1,153$. Таким же чином вираховують його для всіх кислот: пропіонової – $20:18 = 1,11$; масляної – $15:23 = 0,652$; ізовалеріанової – $2:2,3 = 0,689$; валеріанової – $3:4,1 = 0,731$.

П р и м і т к а. Для постійного контролю роботи приладу суміш стандартних кислот необхідно вводити перед початком досліджень, а потім через кожні 8–10 проб.

Клінічне значення. Кінцевим продуктом ферментації вуглеводів є ЛЖК: оцтова, пропіонова, масляна, кількість яких складає близько 95% від загальної кількості ЛЖК. Решта припадає на валеріанову, ізовалеріанову,

ізомаляну і капронову кислоти. За даними О.В.Чуба [91], у вмісті рубця клінічно здорових високопродуктивних корів міститься 45–55% оцтової; 20–30 – пропіонової; 10,3–25,0% – масляної кислот. Окрім них, у вмісті є $2,0 \pm 0,4$ ізовалеріанової і $2,8 \pm 0,6\%$ – валеріанової кислот. В.В.Влізло [14] виявляв у вмісті рубця корів незначну кількість ізомаляної кислоти.

Утворені в рубці ЛЖК частково всмоктуються через стінку рубця у кров і використовуються як енергетичний матеріал та як метаболіти для синтезу інших речовин. За рахунок оцтової кислоти макроорганізм може задовольнити близько 40% усієї енергетичної потреби. Значна кількість її через вищі карбонові кислоти включається до складу молочного та внутрішнього жирів. Подібним шляхом використовується в організмі масляна кислота. У стінці рубця більша частина її перетворюється в бета-оксималяну, яка потім окиснюється в ацетооцтову. За рахунок цих кислот корови покривають 5–7% своїх потреб в енергії. Найбільше використовується бета-оксибутират в енергетичних процесах у головному мозку, скелетних і серцевому м'язах жуйних. Іншим шляхом метаболізму β -оксибутирату в тканинах жуйних тварин є використання його в синтезі жирних кислот у молочній залозі після перетворення в ацетил – CoA. Молочна залоза кіз поглинає 57% β -оксибутирату [96].

Пропіонова кислота є основним джерелом (45–50%) глюкози в організмі жуйних. Перетворення пропіонової кислоти в глюкозу починається уже в слизовій оболонці рубця, проте основна кількість її використовується для синтезу глюкози в печінці.

Збільшення в раціоні жуйних клітковини призводить до зростання синтезу оцтової кислоти, крохмалю – пропіонової, цукру – масляної. Зменшується концентрація оцтової кислоти за низького вмісту сіна в раціоні; у корів, хворих на кетоз, гепатодистрофію і зміщення сичуга. Відносна кількість масляної кислоти збільшується за кетозу (в 1,4 рази), тому співвідношення пропіонової і масляної кислот зменшується до $1,04 \pm 0,08$ порівняно з $1,37 \pm 0,09$ у здорових [91], у разі гепатодистрофії це співвідношення становить $1,25 \pm 0,06$, затримання посліду – $1,0 \pm 0,03$.

За вторинної дистонії рубця збільшується кількість ізовалеріанової і валеріанової кислот. Особливо велика концентрація їх під час зміщення сичуга ($4,2 \pm 0,1$ і $7,2 \pm 0,9\%$ відповідно). Можливо, це пояснюється тим, що через зменшення в раціоні клітковини бактерії рубця потребують для свого росту добавки валеріанової, ізовалеріанової та ізомаляної кислот [91].

Література: [14; 26, С. 25–28; 60, С. 314–317; 91].

21.4. Визначення концентрації молочної кислоти

У присутності лактатдегідрогенази (ЛДГ) лактат переходить у піровиноградну кислоту.

Реактиви: 1) 0,4 М гідразин-гліциновий буфер рН 9,5; 2) розчин НАД⁺ 5×10^{-2} М; 3) розчин ЛДГ (вміст білка має складати близько 5 мг/мл).

Хід визначення. У кювету з шириною оптичного шару 1 см наливають 2,2 мл інкубаційного середовища, що містить 2,0 мл буферу і 0,2 мл розчину НАД, додають 0,2 мл культурального середовища вмісту рубця і вимірюють оптичну густину (E_1) за довжини хвилі 340 нм. Щільність при цьому встановлюється по буферу. До проби додають 0,05 мл розчину ЛДГ, перемішують і визначають (E_2). У контрольну пробу замість 0,2 мл культурального середовища вносять 0,2 мл дистильованої води і проводять аналогічні виміри – отримують E_k . Вміст лактату (в мікромолях на 1 мл культуральної рідини) вираховують за формулою:

$$X = (E_2 - E_1) K \times U / 6,22,$$

де K – фактор розведення проби відносно 1 мл культуральної рідини; U – кінцевий об'єм проби (2,45 мл); 6,22 – коефіцієнт мікромолярної екстинції відновленої форми піридинових нуклеотидів за довжини хвилі 340 нм.

Клінічне значення. Молочна кислота є одним із проміжних продуктів перетравлення вуглеводів у рубці. У рубцевій рідині знаходять лише її сліди, після годівлі тварин рівень молочної кислоти становить 0,15–0,50 ммоль/л. Під час введення до раціону значної кількості кормів, багатих на крохмаль (зернові корми) і цукор (цукровий і напівцукровий буряк, яблука, м'яса), рівень молочної кислоти різко зростає до 3–6 ммоль/л. Молочна кислота в надлишку надходить у кров, зміщуючи кислотно-лужну рівновагу в кислу сторону. За концентрації молочної кислоти в рубці 16–17 ммоль/л можлива загибель тварини внаслідок некомпенсованого ацидозу.

Література: [26, С. 28].

21.5. Визначення загального азоту в рідині рубця

Для визначення концентрації загального азоту в рубцевій рідині використовують метод К'ельдаля, принцип дії якого базується на здатності органічних сполук під впливом киплячої сульфатної кислоти окиснюватись до вуглекислоти і води. Азот білкових та близьких до них

сполук при цьому гідролізується, утворюючи в присутності води іони NH_4^+ . Цей метод має три етапи: мінералізація (спалювання) проби, відганяння аміаку і визначення його кількості.

Прилади: колби К'ельдаля на 100 мл; плита для спалювання зразків; прилад К'ельдаля; піпетки; бюретка на 10 мл; індикаторний папір.

Реактиви: 1) концентрована H_2SO_4 (ч.д.а. або х.ч.); 2) 33% розчин NaOH ; 3) 0,01 н (0,01 ммоль/л) розчин NaOH ; 4) 0,01 н (0,005 ммоль/л) H_2SO_4 ; 5) індикатор Таширо; 6) каталізатор, який складається з K_2SO_4 (Na_2SO_4), CuSO_4 і селену у співвідношенні 100:10:5. Як каталізатор можна використовувати 6% розчин CuSO_4 .

Хід визначення. У колбу К'ельдаля обережно вливають 1 мл рубцевої рідини. Туди ж наливають 5 мл H_2SO_4 (конц.) і добавляють 1 г каталізатора або 0,5 мл 6% CuSO_4 . Колби ставлять похило, під кутом, спочатку на слабке, а відтак на сильне полум'я, не доводячи до сильного кипіння. Спалювання припиняють, коли рідина у колбі стане прозорою.

У перегінну колбу переносять весь об'єм спаленої проби. У прийомну колбочку наливають 10–20 мл 0,01 н розчину сульфатної кислоти і добавляють 3–4 краплі індикатора Таширо, підставляють її під скляну трубку, з'єдану з холодильником апарата К'ельдаля, занурюючи кінець трубки в розчин кислоти.

Відмірюють 30–40 мл 33% розчину NaOH і заливають його через лійку в перегінну колбу.

Вмикають нагрівач і починають відгонити проби. Під час кип'ятіння виділяється аміак, який разом з парами води після проходження через холодильник потрапляє в приймач і зв'язується із сульфатною кислотою. Відганяння продовжують 15–30 хв до нейтральної реакції, яку встановлюють індикаторним папірцем.

Вміст приймальної колби титрують 0,01 н розчином NaOH до зміни малинового забарвлення на зелене.

Кількість загального азоту в пробі розраховують за формулою:

$$X = (A - B) \times 0,14 \times 100,$$

де: X – кількість загального азоту в 100 мл рубцевої рідини, мг; A – кількість 0,01 н розчину H_2SO_4 , налитого у приймальну колбу, мл; B – кількість 0,01 н розчину NaOH , витрачена на титрування, мл; 0,14 – кількість азоту, який зв'язується 1 мл 0,01 н розчину сульфатної кислоти, мг.

Розбіжність результатів паралельних визначень не має перевищувати 2–3% відносно отриманих величин.

Концентрація загального азоту, який представлений білками мікроорганізмів, нерозщепленим протеїном корму, кінцевими та проміжними продуктами азотного обміну (аміак, вільні амінокислоти, пептиди та тощо), у нативному вмісті рубця корів може становити 100–300 мг/100 мл,

у рубцевій рідині – від 50 до 240 мг/100 мл, у овець – 120–350 і 60–250 мг/100 мл відповідно.

Література: [26, С. 28–30; 60, С. 324–325; 90, С. 161–162].

21.6. Визначення небілкового (залишкового) і білкового азоту в рідині рубця

Визначення небілкового азоту. Небілковий азот у рубцевій рідині визначають за методом К'ельдаля. Попередньо слід провести осадження білків. Для цього краще використовувати солі важких металів, оскільки трихлороцтова кислота недостатньо повно осаджує рослинні білки і поліпептиди.

Прилади: центрифуга, центрифужні пробірки, а також ті, що й за визначення загального азоту.

Реактиви: 1) 0,3 н (0,15 моль/л) розчин Ва (ОН)₂; 2) 5% розчин ZnSO₄; індикатор – фенолфталеїн; 3) ті ж реактиви, що й за визначення загального азоту.

Хід визначення. Для осадження білків у центрифужну пробірку наливають визначений об'єм рубцевої рідини (наприклад 2 мл), додають таку ж кількість барію оксиду й аналогічний об'єм цинку сульфату. Суміш старанно перемішують і центрифугують 15 хв за 3000 – 5000 об./хв.

Переносять 3 мл центрифугату, що відповідає 1 мл рубцевої рідини, у колбу К'ельдаля, заливають 3 мл концентрованої сульфатної (сірчаної) кислоти. Спалювання проби і відганяння аміаку проводять аналогічно визначенню загального азоту.

Вміст небілкового азоту в пробі визначають так само, як і загального азоту, за формулою:

$$X = (A - B) \times 0,14 \times 100,$$

де X – концентрація небілкового азоту, мг/100 мл рубцевої рідини.

Кількість небілкового азоту у рубцевій рідині великої рогатої худоби складає 15–60, овець – 10–50 мг/100 мл.

Визначення білкового азоту. Білковий азот визначають за різницею загального і небілкового азоту. Його кількість у рідині рубця великої рогатої худоби становить 35–200, овець – 40–240 мг/100 мл.

Література: [26, С. 30–31; 60, С. 325–326; 90, С. 162–163].

21.7. Визначення аміаку (амонійного азоту) з реактивом Неслера

Принцип методу полягає в тому, що реактив Неслера у лужному середовищі, взаємодіючи з аміаком, утворює жовте забарвлення суміші, оптичну щільність якої визначають на спектрофотометрі або фотоелектроколориметрі.

Обладнання. Спектрофотометр або фотоелектроколориметр, центрифуга, мікропіпетка.

Реактиви: 1) реактив Неслера; 2) амонію сульфат.

Хід реакції. Мікропіпеткою відбирають 20 мкл відцентрифугованої рідини рубця, переносять у пробірки, в які попередньо набирають по 5 мл дистильованої води, перемішують. Після цього додають по 0,2 мл реактиву Неслера і знову перемішують. Проби, в яких колір став жовтим, через 10 хв фотометрують за довжини хвилі 410 нм. Оптичну щільність вимірюють проти контрольної проби, в яку входять ті ж інгредієнти, але замість вмісту рубця беруть 20 мкл дистильованої води. Таким же чином обробляють 20 мкл стандартного розчину, використовуючи амонію сульфат. Для його приготування використовують 0,4716 г перекристалізованого $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ в 1 л бідистильованої води. В 1 мл такого розчину міститься 100 мкг азоту (у 20 мкл – 2 мкг). Кількість аміаку у вмісті рубця вираховують за формулою:

$$X = (E_n \times A) : E_c,$$

де X – кількість аміаку в пробі, мкг; E_n – екстинція проби; E_c – екстинція стандарту; A – кількість аміаку у стандартному розчині.

Література: [26, С. 31; 60, С. 326; 64; 90, С. 164–165].

21.8. Визначення аміаку мікродифузійним методом

Принцип методу. Полягає у витісненні аміаку з амонійних солей концентрованим розчином луку з наступним поглинанням його титрованим розчином кислоти.

Обладнання. Чашки Конвея; піпетки; бюретка на 2 мл.

Реактиви: 1) 0,02 н розчин сульфатної кислоти (0,01 моль/л); 2) насичений розчин K_2CO_3 (порошок розчиняють у дистильованій воді кімнатної температури до того часу, поки його надлишок не почне випадати в осад, рідину фільтрують); 3) 0,01 н (0,01 моль/л) розчин натрію гідроксиду; 4) індикатор Таширо. Готують два розчини: а) 50 мг метиленового синього розчиняють у 50 мл етилового спирту;

б) 100 мг метиленового червоного (метилроту) розчиняють у 50 мл етилового спирту, потім обидва розчини з'єднують у рівних об'ємах.

Хід реакції. Попередньо готують чашку, зовнішній верхній край чашки змащують вазеліном. У внутрішню чашечку заливають точно відміряну кількість 0,02 н розчину сульфатної кислоти. З огляду на допустимий рівень аміаку в пробі, об'єм розчину може бути 2 або 3 мл. Туди ж додають 3–4 краплі індикатору Таширо. У зовнішню камеру чашки наливають 1 мл рубцевої рідини і чашку закривають кришкою. Потім, злегка відкривши кришку, у зовнішню камеру обережно, з протилежного боку від наливої рубцевої рідини, вливають 2 мл насиченого розчину K_2CO_3 . Кришку швидко закривають, перевіряють герметичність камери і обережно змішують досліджувану рідину з кислотою.

Паралельно з дослідними, ставлять контрольну пробу, при цьому у зовнішню камеру чашки замість рубцевої рідини наливають 1 мл дистильованої води. Решта маніпуляцій такі ж, як із дослідною пробюю.

Потім чашки з дослідними пробами та контрольні ставлять на термін, необхідний для повного вивільнення з досліджуваного розчину аміаку і наступного поглинання його розчином сульфатної кислоти. Дифузія за кімнатної температури продовжується не менше 12 год. Проте найчастіше її проводять 20–24 год. Після закінчення цього часу надлишок кислоти відтитрують 0,01 н розчином натрію гідроксиду до зміни малинового забарвлення на зелене.

Розрахунки проводять за формулою:

$$X=(A-B)\times 0,17\times 100,$$

де X – кількість аміаку в 100 мл рідини (мг у 100 мл); A – кількість (мл) 0,01 н розчину натрію гідроксиду, що витратили на титрування контрольної проби; B – кількість (мл) 0,01 н розчину натрію гідроксиду, що витратили на титрування дослідної проби; 0,17 – кількість аміаку, еквівалентна 1 мл 0,01 н розчину натрію гідроксиду або 1 мл 0,01 н розчину сульфатної кислоти.

Слід зазначити, що цей метод аналізу дозволяє виявити не тільки вільний газоподібний аміак, але й аміак, що знаходиться у вмісті рубця у зв'язаному стані у вигляді амонію. Тому краще вести розрахунки вмісту у рубцевій рідині азоту аміаку або амонійного азоту за формулою:

$$X=(A-B)\times 0,14\times 100,$$

де 0,14 – кількість амонійного азоту, еквівалентна 1 мл 0,01 н розчину натрію гідроксиду або 1 мл 0,01 н розчину сульфатної кислоти.

Приклад: на титрування контрольної проби витрачено 4 мл 0,01 н розчину натрію гідроксиду, на титрування дослідної проби – 2,24 мл 0,01 н розчину NaOH; $X=(4,00-2,24)\times 0,14\times 100 = 24,64$ мг. Відповідно, у

100 мл рубцевої рідини міститься 24,64 мг азоту аміаку або амонійного азоту.

Клінічне значення. Аміак є кінцевим продуктом перетворення білкових і небілкових речовин корму. Кількість аміаку, що утворюється в рубці, залежить, у першу чергу, від кількості білка, співвідношення легко- і важкоферментованого протеїну в кормах раціону, азотовмісних небілкових сполук, а також від інтенсивності його використання у процесі синтезу мікробного білка і всмоктування в кров. За звичайних умов годівлі концентрація аміаку може становити від 5 до 40 мг/100 мл (2,8–22 ммоль/л), але оптимальною є кількість від 6,5 до 25 мг/100 мл.

Швидкість утворення аміаку і його концентрація у вмісті рубця залежать від складу раціону та використання аміаку рубцевою мікрофлорою для синтезу білка. Встановлено, що максимальна швидкість синтезу білка мікроорганізмами проходить за концентрації амонійного азоту в рубці у межах від 5 до 20 мг/100 мл (від 2,8 до 11,0 ммоль/л). За концентрації вище 50 мг / 100 мл (27,5 ммоль/л) аміак починає інтенсивно всмоктуватись у кров. Більша частина його перетворюється в печінці у сечовину (орнітиновий цикл), деяка кількість сечовини синтезується з аміаку у нирках (цикл Кребса-Генселяйта). Нині встановлений механізм синтезу сечовини з аміаку в стінці передшлунків: тут активність ферментів орнітинового циклу становить близько 20% їх активності у печінці. Водночас у слизовій оболонці рубця локалізується фермент уреаза, який розщеплює сечовину. Окрім синтезу сечовини, у стінках передшлунків знешкодження аміаку відбувається внаслідок синтезу глутаміну і глутамінової кислоти, яка утворюється в результаті приєднання аміаку до α -кетоглутарової кислоти.

Через такі особливості вважають, що у жуйних спостерігається рубцево-печінкова циркуляція сечовини. Вона полягає в тому, що аміак всмоктується стінкою рубця і з кров'ю ворітної вени переноситься в печінку, де використовується для синтезу сечовини. Близько половини утвореної в печінці сечовини виділяється знову в рубець через його стінку або зі слиною. Таким шляхом забезпечується безперервне надходження азоту в рубець. Руменогепатична циркуляція азоту в організмі тісно пов'язана з процесом виділення сечовини нирками. За високого вмісту азоту в кормах біля 40% сечовини, що знаходиться у крові, може виділятися з сечею, а за його нестачі екскреція сечовини знижується до 1–2%. При цьому клубочкова фільтрація сечовини суттєво не змінюється, а збільшується ступінь реабсорбції її у ниркових каналцях [96].

Збільшення утворення аміаку в рубці спостерігається: а) у разі порушення співвідношення в кормах раціону між легко- і важкоферментованим протеїном (оптимальною кількістю є 50–60% легкоферментованого протеїну на початку лактації, 65–70% – в середній і останній третині);

б) згодовування зеленої маси люцерни, конюшини, озимого жита; в) підвищеної кількості нітратів у кормах; г) викорис-тання вуглецево-амонійних солей, аміачної води; д) згодовування неякісного силосу і сінажу, в яких вміст амонійного азоту може складати 35–50% від загального азоту. Окрім того, величина рН вмісту рубця зміщується в лужний бік, що збільшує швидкість всмоктування аміаку в кров.

Знешкодження аміаку порушується за патології печінки (гепатит, цироз, гепатодистрофія) внаслідок зменшення синтезу сечовини. Кількість його в крові збільшується (*гіперамоніємія*): в артеріальній – до 20–129, венозній – 12–85 мкмоль/л (у здорових корів – 7,0–30,0 і 5,5–25). Аміак легко проникає через гематоенцефалічний бар'єр, і його кількість у лікворі може складати 40–64 мкмоль/л проти 8,5 у здорових корів [12, 14]. Солі амонію різко пригнічують обмін ацетилхоліну, тварин розвивається печінкова енцефалопатія та печінкова кома.

Аміак, який накопичився в тканинах, блокує цикл Кребса, що неминуче призводить до порушення окисно-відновних процесів в організмі, тобто до стану гіпоксії. Пригнічення тканинного дихання є наслідком порушення синтезу макроергічних сполук (АТФ, КФ). Припускають, що це може бути пов'язано з блокуванням альфа-кетоглутарової кислоти внаслідок активування процесу відновного амінування або пригнічення активності ферментів, які беруть участь в окисному декарбоксилуванні альфа-кетокислот [96].

Вплив амонійного азоту на організм моногастричних тварин є значно сильнішим через відсутність у них гепаторуменальної системи обміну азоту.

Література: [26, С. 31–34; 60, С. 326–328; 96].

21.9. Визначення нітритів у вмісті рубця

Принцип методу базується на реакції Грісса, за якою під час взаємодії реактиву Грісса з іонами NO_2^- утворюється розчин, інтенсивність забарвлення якого залежить від концентрації нітритів.

Обладнання: фотоелектроколориметр або спектрофотометр; мірні колбочки на 100 мл.

Реактиви: 1) 0,3 н розчин Ва (ОН)₂; 2) 5% розчин цинку сульфату; 3) індикатор – 1% розчин фенолфталеїну; 4) 5% розчин аміаку; 5) 0,1 н розчин НСl; 6) етиловий спирт 96%; 7) сульфанілова кислота; 8) альфа-нафтиламін; 9) 12% розчин оцтової кислоти; 10) реактив Грісса, який складається з рівних об'ємів двох приготовлених розчинів: а) 0,5 г сульфанілової кислоти розчиняють у 150 мл 12% розчину оцтової кислоти; б) змішують 180 мл 12%

розчину оцтової кислоти з фільтратом водного розчину альфа-нафтиламіну, отриманого у ході кип'ятіння 0,2 г останнього в 20 мл дистильованої води. Зберігають розчин у темному місці, а перед використанням готують необхідну кількість реактиву Грісса.

Хід визначення. Заздалегідь важливо приготувати осадники. Обидва розчини (0,3 н Ва(ОН)₂ і 5% розчин ZnSO₄) мають точно нейтралізувати один одного за фенолфталеїном (об'єм на об'єм). Потім проводять осадження білків умісту рубця. Для цього в пробірки наливають по 2 мл вмісту рубця, додають таку ж кількість барію гідроксиду і цинку сульфату. Суміш ретельно змішують і центрифугують 15 хв за 3000–5000 об/хв.

У мірну колбу переносять 2 мл отриманого центрифугату на 100 мл, куди послідовно додають 5 мл 5% розчину аміаку, 10 мл 0,1 н розчину хлоридної кислоти і об'єм доводять до позначки дистильованою водою. Із отриманого розчину відбирають 15 мл і змішують з 15 мл реактиву Грісса. Через 15 хв визначають інтенсивність забарвлення на фотоелектроколориметрі із зеленим світлофільтром у 20-міліметровій кюветі. За показниками екстинції за калібрувальним графіком вираховують уміст нітритів у розчині. Калібрувальний графік будують за стандартним розчином натрію нітриту (NaNO₂) з концентрацією нітриту від 0,1 до 1 мкг у 1 мл.

Кількість нітритів у 100 мл вмісту рубця визначають за формулою:

$$X = E \times 1500,$$

де X – кількість нітритів у 100 мл вмісту рубця; E – показник кількості нітритів в 1 мл, що відповідає отриманій екстинції; 1500 – похідна 15×100 , де 15 – число, на яке множать кількість вмісту рубця, що міститься в 20 мл безбілкового фільтрату, щоб привести до 100 мл рубцевої рідини; 100 – число, на яке необхідно помножити кількість нітритів, знайдених за калібрувальною кривою (E), щоб визначити, скільки нітритів міститься в 20 мл безбілкового фільтрату.

Якщо показник екстинції вище діапазону калібрувальної кривої, отриманий безбілковий фільтрат розбавляють певною кількістю дистильованої води і під час розрахунків враховують ступінь розведення (P) фільтрату. Формула для визначення кількості нітритів у цьому випадку:

$$X = E \times 1500 \times P.$$

Література: 26. С. 34–36; 60. С. 329–330.

РОЗДІЛ 22

МІКРОСКОПІЧНІ МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ ВМІСТУ РУБЦЯ

22.1. Методика підрахунку мікроорганізмів у вмісті рубця

У рубці жуйних існує велика кількість різноманітних мікроорганізмів – бактерій, грибів та інфузорій. Завдяки їх активній діяльності поживні речовини корму зазнають складних перетворень, внаслідок чого утворюються ЛЖК, білок, аміак, амінокислоти, ліпіди, які використовуються організмом у процесах обміну. Поряд з перетворенням складових частин корму в сполуки, доступні для засвоєння в передшлунках, відбувається синтез життєво важливих амінокислот і вітамінів. Надходячи в розташовані нижче відділи травного каналу, бактерії, гриби та інфузорії перетравлюються і забезпечують організм повноцінними білками.

Розвитку великої за кількістю і різнобічної за складом мікрофлори та мікрофауни сприяють умови середовища в цьому органі, у тому числі величина рН вмісту, постійний іонний склад, постійне постачання мікроорганізмів живильним середовищем (кормом), анаеробні фактори. Бактерії та найпростіші чутливо реагують на зміни годівлі й утримання тварин. Наприклад, кількість інфузорій збільшується у разі додавання до раціону сіна. Якщо в раціоні переважає силос, найпростіших стає менше, змінюється їх видовий склад. Улітку під час годівлі зеленими кормами їх, як правило, стає більше порівняно із зимовим раціоном. Майже повністю вони зникають у разі голодування, мало їх за патологічного стану передшлунків: атонії, тимпанії рубця, травматичного ретикуліту.

Інфузорії. Важливу роль у процесах травлення в рубці жуйних тварин відіграють *інфузорії*, маса яких становить приблизно половину біомаси рубця. Інфузорії – одноклітинні мікроорганізми довжиною до 20 мкм. Кількість їх у 1 мл рідини рубця досягає 1–2 млн, що залежить від складу раціону. Білки інфузорій мають більшу біологічну цінність, ніж рослинні й бактеріальні. Це зумовлено великим вмістом у білках інфузорій лізину, який є однією з найбільш лімітуючих амінокислот у раціонах тварин, великої кількості аспарагінової та глутамінової кислот і лейцину.

У рубці жуйних знаходиться майже 100 видів інфузорій. Най-більша їх кількість представлена класом *Ciliata*, до якого входять дві великі групи: підклас *Holotricha* і підклас *Spirotricha*. Інфузорії першого

підкласу – рівновійчасті (вся їхня поверхня рівномірно покрита війками), другого – маловійчасті. Кількість останніх у рубці складає 60–80% від загальної кількості інфузорій [96].

Інфузорії виконують різноманітні функції. Окремі з них – целюлолітичні – поглинають частинки рослинних кормів, розщеплюючи 25–30% клітковини, а також стимулюють розщеплення клітковини бактеріями. Вони засвоюють прості вуглеводи і перетворюють їх у полісахарид типу амілопектину, який нагромаджується в клітинах, продукують ферменти, що гідролізують полісахариди рослин, зокрема крохмаль. Голотріхи містять амілолітичні ферменти з різним оптимумом рН. Основними метаболітами у процесі ферментації цукрів є молочна, масляна і оцтова кислоти, H_2 , CO_2 . Кількість карбонових кислот, що утворюється при цьому, становить 3–5% загальної кількості тих, що синтезуються в рубці [96]. Інфузорії синтезують жирні кислоти. У ліпідах інфузорій переважають фосфоліпіди.

Протеолітична активність інфузорій є низькою. Вони поглинають рубцеві бактерії, які зазнають лізису в травних вакуолях, а звільнені під час гідролізу білків амінокислоти використовуються інфузоріями в синтезі білків та виділяються у середовище рубця. Разом з тим, інфузорії здатні поглинати амінокислоти із середовища і навіть синтезувати їх, використовуючи вуглецевий ланцюг ацетату, глюкози і галактози. Отже, інфузорії є додатковим джерелом білків для жуйних тварин.

У рубці великої рогатої худоби вони перебувають 14–37 год. У молочний період живлення інфузорії у вмісті рубця жуйних відсутні. Вони з'являються після переходу тварин на рослинне живлення. Найбільша кількість інфузорій виявляється до годівлі тварин, а після годівлі – зменшується приблизно удвічі.

Наявність у рубці великої кількості інфузорій свідчить про нормальний і ефективний перебіг ферментативних процесів. Найбільш чутливі до зміни середовища в рубці великі інфузорії. Вони зникають у першу чергу за несприятливих умов існування в рубці і в останню чергу з'являються за нормалізації процесів. Визначають видовий та кількісний склад інфузорій.

Видовий склад найпростіших визначають тільки у свіжому вмісті рубця. Краплю вмісту наносять на предметне скельце, накривають покривним і розглядають під мікроскопом спочатку за малого збільшення (окуляр – 7, об'єктив –10), потім – великого (об'єктив – 40) із злегка затемненою діафрагмою. Оскільки інфузорії, особливо великі, за кімнатної температури швидко втрачають рухливість, то бажано користуватися столиком з підігрівом (температура 38–39° С). Для більш детального визначення будови тіла інфузорій препарат краще зафарбувати

розчином Люголя, приготувати мазок і розглядати його за великого збільшення або під імерсією.

Література: [26, С. 36–38; 96, С. 41–54].

22.2. Підрахунок загальної кількості інфузорій

Прилади та реактиви. Мікроскоп, лічильна камера з сіткою Горяєва, лейкоцитарний меланжер, 0,85% розчин NaCl, злегка забарвлений метиленовим синім, 4% розчин формаліну.

Хід визначення. 1. У пробірку відбирають 5 мл профільтрованого вмісту рубця (рідку частину) і додають 0,1 мл 4% розчину формаліну для фіксації інфузорій. Це дозволяє проводити підрахунок кількості інфузорій протягом 20–24 год після взяття вмісту рубця.

2. Вміст пробірки перемішують 5–6 разів, набирають рідину в лейкоцитарний змішувач (меланжер) до мітки 1, а до мітки 11 – ізотонічний (0,85%) розчин натрію хлориду, попередньо забарвлений розчином метиленового синього. Струшують 1–2 хв. Отримують розведення рідини у 10 разів.

3. Заправляють камеру нанесенням краплі рідини під покривне скельце (першу краплю видувають на вату). Проводять підрахунок кількості інфузорій у 100 великих квадратів.

Загальну кількість інфузорій у 1 мм³ (мкл) підраховують за формулою:

$$X = \frac{a \cdot c}{n \cdot s \cdot h} = \frac{a \cdot 10}{100 \cdot \frac{1}{25} \cdot \frac{1}{10}} = \frac{a \cdot 10 \cdot 250}{100} = a \cdot 25,$$

де a – кількість підрахованих інфузорій; c – розведення вмісту рубця (у 10 разів); n – кількість квадратів, у яких підраховані інфузорії (100); s – площа одного квадрата (1/25 мм²); h – висота камери (0,1 мм).

Кількість інфузорій у 1 мл вмісту рубця визначають за формулою:

$$X = A \times 1000, \text{ оскільки } 1 \text{ мл} = 1000 \text{ мкл.}$$

У 1 мл рубцевого вмісту має бути 0,5–2 млн інфузорій. Кількість їх зменшується внаслідок різних патологій. Особливо мало інфузорій (70–100 тис./мл) за зміщення сичуга [91].

Література: [26; 60, С. 330–332; 90, С. 172–173; 91].

22.3. Підрахунок кількості бактерій

Бактерії відіграють важливу роль у процесах травлення жуйних тварин. Вони піддають ферментному гідролізу целюлозу (основний компонент грубих кормів), крохмаль, моноцукри, кислоти (молочну, бурштинову, мурашину), беруть участь у перетворенні азотистих сполук. Разом з основними видами існує низка бактерій, які не мають функціонального значення, а є випадковими, що потрапили в рубець із кормом та водою. Тому для чисто рубцевих бактерій існують певні вимоги: 1) мікроорганізми, виділені з рубця, мають бути анаеробами; 2) бактерії мають бути в рубці у кількості не менше 1 млн в 1 г його вмісту; 3) по 10 штамів цього виду має бути виділено не менше, ніж від двох тварин; 4) культури одного виду мають бути в рубці тварин у різних географічних зонах; 5) кінцеві продукти обміну речовин з отриманих культур є типовими рубцевими метаболітами.

Загальну кількість бактерій у рідині рубця підраховують кількома методами: за допомогою діамінопімельінової кислоти, у лічильних камерах та у пофарбованих мазках (за методом Бріда) [90].

Підрахунок загальної кількості мікроорганізмів у пофарбованих мазках

Прилади та реактиви. Мікроскоп, мікропіпетки, 0,85% розчин NaCl.

Хід визначення. Уміст рубця розводять стерильним ізотонічним розчином натрію хлориду з розрахунку 1:1000. Мікропіпеткою відбирають 0,01 мл вмісту рубця і профламбованою голкою на предметному склі розмазують мазок площею 1 см². Як правило, роблять 3–4 мазки. Мазок висушують, фіксують над полум'ям спиртівки і фарбують за Грамом. Готовий мазок досліджують під мікроскопом з імерсійним об'єктивом. Підраховують бактерії у певній кількості типових полів зору. У зв'язку з тим, що мазок не завжди рівномірний, поля для підрахунку необхідно брати по всьому мазку, але найкраще за діагоналю. У кожному мазку рахують не менше 10-ти полів і виводять середнє.

Для визначення загальної кількості бактерій необхідно знати площу поля зору мікроскопа. Оскільки площа кола дорівнює πr^2 , то потрібно виміряти діаметр поля (в мм) за допомогою об'єкт-мікрометра. Площа мазка 100 мм², поділена на площу зору під мікроскопом, дорівнює кількості полів зору в мазку. Оскільки мазок приготовлений із 0,01 мл рідини, то кількість полів зору на ньому, помножена на 100, дає кількість

полів зору, які можна приготувати з 1 мл вмісту рубця, розбавленого до 10^3 . Математичні розрахунки можна об'єднати формулою: $10000 : 3,1417 (r^2)$ – коефіцієнт, на який потрібно множити середню кількість клітин у полі зору мікроскопа.

Таким чином, підраховавши необхідну кількість полів зору (по 10 у трьох мазках), додають загальну кількість бактерій і вираховують середню їх кількість у одному полі зору. Отримане число множать на коефіцієнт і ступінь розведення. Коефіцієнт залишається незмінним до тих пір, поки об'єктив, положення тубуса і окуляр мікроскопа залишаються нерухомими.

Приклад. Визначаємо коефіцієнт. Діаметр поля зору мікроскопа – 0,132 мм; відповідно, радіус його – 0,066 мм, а r^2 становитиме 0,004356:

$$\frac{10000}{3,1416 \cdot 0,004356} = \frac{10000}{0,0137}$$

Підраховавши 30 полів зору (по 10 у трьох мазках), визначили, що у полі зору в середньому нараховується 15 мікробних клітин. Відповідно в 1 мл вмісту рубця міститься:

$$\frac{15 \cdot 10000}{0,0137} \cdot 1000 = 10,9 \text{ млрд} = 1,09 \cdot 10^{10} \text{ мікробних клітин.}$$

Загальна кількість бактерій в 1 г рубцевого вмісту становить 10^9 – 20^{10} клітин.

П р и м і т к а. Про визначення аміло-, ліпо- і целюлозолітичних бактерій можна дізнатись у довіднику згідно зі списком рекомендованої літератури [90].

Література: [26, С. 39–40; 60, С. 332–336; 90, С. 168–170].

ДОДАТКИ

Запитання і тести для програмованого контролю

Розділ 4 і 5 Загальний клінічний аналіз крові Дослідження кислотно-лужного балансу крові

1. Визначення гемоглобіну колориметричним методом.
2. Основні етапи геміглобінціанідного методу визначення гемоглобіну.
3. Норма вмісту гемоглобіну в крові сільськогосподарських тварин та причини його змін.
4. Меланжерний метод підрахунку еритроцитів.
5. Пробірковий метод підрахунку еритроцитів.
6. Кількість еритроцитів у крові великої рогатої худоби. Зміни їх кількості та причини.
7. Індeksi "червоної крові", їх розрахунки та діагностичне значення.
8. Підрахунок кількості лейкоцитів меланжерним методом.
9. Лейкоцитози, класифікація, діагностичне значення.
10. Підрахунок клітин крові у птиці.
11. Приготування мазків крові.
12. Методи фарбування мазків крові.
13. Методика виведення лейкограми.
14. Інтерпретація змін нейтрофілів.
15. Інтерпретація змін еозинофілів і моноцитів.
16. Інтерпретація змін лімфоцитів.
17. Морфологічні зміни еритроцитів і лейкоцитів.
18. Підрахунок кількості тромбоцитів.
19. Визначення ШОЕ та її діагностичне значення.
20. Визначення відносної густини крові та її діагностичне значення.
21. Визначення гематокритної величини та клінічне оцінювання її змін.
22. Швидкість згортання крові: визначення і діагностичне значення.
23. Діагностичне значення визначення осмотичної і кислотної резистентності еритроцитів.
24. Діагностичне значення визначення вікового складу еритроцитів.

25. Діагностичне значення визначення білка і ліпідів у мембранах еритроцитів.
26. Діагностичне значення визначення 2,3-дифосфогліцерату в еритроцитах.
27. Кислотно-основний баланс та буферні системи крові.
28. Зміни кислотно-основного балансу крові та їх характеристика.
29. Причини метаболічного ацидозу.
30. Причини респіраторного ацидозу і алкалозу.

Розділ 6 і 7

Методи дослідження обміну білків

Методи визначення активності ферментів

1. Визначення вмісту білка в сироватці крові рефрактометричним методом.
2. Діагностичне значення змін вмісту загального білка в сироватці крові.
3. Вміст альбумінів у сироватці крові та діагностичне значення їх змін.
4. Діагностичне значення змін фракцій глобулінів у сироватці крові.
5. Визначення загальної кількості імуноглобулінів у сироватці крові за реакцією з натрію сульфідом.
6. Причини імунодефіцитного стану новонародженого молодняку.
7. Сулемова колоїдно-осадова проба та її діагностичне значення.
8. Формолова колоїдно-осадова проба та її діагностичне значення.
9. Цинк-сульфатний бронхо-легеневий тест та його діагностичне значення.
10. Цинк-сульфатна колоїдно-осадова проба та її діагностичне значення.
11. Тимолова проба, її суть та діагностичне значення.
12. Залишковий азот: складові та діагностичне значення його визначення.
13. Перерахувати методи визначення сечовини в сироватці крові. Діагностичне значення її визначення.
14. Діагностичне значення визначення сечової кислоти в сироватці крові.
15. Діагностичне значення визначення креатиніну в сироватці крові.

16. Класифікація ферментів сироватки й плазми крові залежно від локалізації в органах і тканинах. Клітинні ферменти.
17. Гіперферментемія та її діагностичне значення.
18. Дисферментемія та її діагностичне значення.
19. Індикаторні цитолітичні ферменти печінки.
20. Діагностичне значення визначення аспарагінової та аланінової трансфераз у сироватці крові.
21. Діагностичне значення визначення гамма-глутамілтранспептидази в сироватці крові.
22. Діагностичне значення визначення альфа-амілази в сироватці крові.
23. Діагностичне значення визначення загальної активності лужної фосфатази.
24. Діагностичне значення визначення активності ізоферментів лактатдегідрогенази.
25. Діагностичне значення визначення ізоферментів креатинкінази.
26. Діагностичне значення визначення ізоферментів лужної фосфатази.

Розділ 8 і 9

Методи дослідження обміну вуглеводів і ліпідів

1. Методи визначення глюкози в сироватці крові (перерахувати) та її вміст у сироватці крові тварин.
2. Діагностичне значення гіпоглікемії.
3. Діагностичне значення гіперглікемії.
4. Діагностичне значення визначення вмісту піровиноградної кислоти.
5. Діагностичне значення визначення вмісту молочної кислоти.
6. Глікопротеїни та діагностичне значення їх визначення.
7. Протеоглікани. Складові частини глікозаміногліканів.
8. Діагностичне значення визначення фракцій глікозаміногліканів.
9. Прості та складні ліпіди. Діагностичне значення визначення загальних ліпідів у сироватці крові.
10. Діагностичне значення визначення триацилгліцеролів у сироватці крові.
11. Діагностичне значення визначення ліпопротеїнів у сироватці крові.
12. Діагностичне значення визначення загального холестеролу в сироватці крові.

13. Ефіровз'язаний холестерол. Діагностичне значення його визначення.
14. Кетогенез у жуйних.
15. Діагностичне значення визначення кетонових тіл у сироватці крові.
16. Пероксидне окиснення ліпідів та його продукти.
17. Антиоксидантна система захисту та її складові.
18. Діагностичне значення визначення продуктів вільнорадикального окиснення ліпідів.
19. Супероксиддисмутаза еритроцитів та клінічне значення її визначення.
20. Каталаза еритроцитів та клінічне значення її визначення.
21. Глутатіонпероксидаза еритроцитів та клінічне значення її визначення.
22. Глутатіонредуктаза крові та клінічне значення її визначення.
23. Глутатіон крові та діагностичне значення його визначення.

Розділ 10

Методи дослідження обміну макро- і мікроелементів

1. Класифікація мінеральних елементів за кількістю та біологічною роллю в організмі.
2. Вимоги до біотичних елементів, їх склад.
3. Біологічна роль кальцію в організмі.
4. Фактори, що впливають на абсорбцію кальцію в кишечнику.
5. Роль паратгормону і кальцитоніну в обміні кальцію.
6. Механізми транспорту кальцію через ентероцити.
7. Діагностичне значення визначення вмісту кальцію в сироватці крові.
8. Біологічні функції фосфору в організмі.
9. Регулятори транспорту фосфору в епітелії кишечника.
10. Діагностичне значення визначення вмісту неорганічного фосфору в сироватці крові.
11. Значення метаболітів вітаміну D в абсорбції кальцію і фосфору в кишечнику.
12. Вплив нестачі кальцію і фосфору в раціоні на формування і структуру кісткової тканини.
13. Причини ендогенного порушення обміну кальцію і фосфору.
14. Біологічна роль магнію в організмі.
15. Діагностичне значення змін вмісту магнію в сироватці крові.
16. Біологічна роль натрію в організмі.
17. Гормональна регуляція обміну натрію.

18. Діагностичне значення визначення вмісту натрію в сироватці крові.
19. Біологічна роль калію в організмі.
20. Гіперкаліємія, її причини та діагностичне значення.
21. Діагностичне значення гіпокаліємії.
22. Методи визначення вмісту Феруму в сироватці крові.
23. Функції біомолекул, які містять Ферум в геміновій формі.
24. Функції біомолекул, які містять негемінове залізо.
25. Діагностичне значення визначення Феруму в сироватці крові.
26. Діагностичне значення визначення загальної ферумозв'язувальної здатності сироватки крові.
27. Фізіологічна роль кобальту в організмі тварин.
28. Діагностичне значення визначення кобальту.
29. Фізіологічна роль міді в організмі тварин.
30. Діагностичне значення визначення міді в сироватці крові.
31. Фізіологічна роль цинку в організмі тварин.
32. Діагностичне значення визначення вмісту цинку в сироватці крові.
33. Діагностичне значення визначення церулоплазміну в сироватці крові.

Розділ 11

Дослідження обміну вітамінів

1. Екзогенні причини гіповітамінозів.
2. Причини ендогенної вітамінної недостатності.
3. Біологічна роль вітаміну А.
4. Фактори, що впливають на засвоєння каротину і його трансформацію у вітамін А.
5. Діагностичне значення визначення каротину в сироватці крові.
6. Діагностичне значення визначення вітаміну А в сироватці крові.
7. Діагностичне значення визначення вмісту вітаміну А в печінці.
8. Діагностичне значення визначення вмісту вітаміну А і каротиноїдів у жовтках яєць.
9. Джерела вітаміну D для сільськогосподарських тварин.
10. Обмін вітаміну D в організмі тварин.
11. Вплив метаболітів вітаміну D на гомеостаз кальцію.
12. Вплив метаболітів вітаміну D на гомеостаз фосфору.
13. Діагностичне значення визначення 25OHD₃.

14. Порушення обміну вітаміну D за патології внутрішніх органів.
15. Біологічна роль токоферолу в організмі.
16. Діагностичне значення визначення токоферолу в сироватці крові та жовтках яєць.
17. Біологічна роль тіаміну.
18. Критерії діагностики недостатності тіаміну.
19. Біологічно активні сполуки рибофлавіну.
20. Діагностичне значення визначення рибофлавіну у яйцях птиці.
21. Біологічна роль пантотенової кислоти.
22. Нікотинова кислота та її біологічно активні сполуки.
23. Методи контролю обміну нікотинової кислоти.
24. Біологічна роль піридоксину та наслідки його недостатності.
25. Фолієва кислота і її роль у гемопоезі.
26. Біологічна роль ціанокобаламіну в організмі.
27. Методи контролю забезпеченості тварин ціанокобаламіном.
28. Біологічна роль аскорбінової кислоти. Методи діагностики її недостатності.

Розділ 12

Дослідження пігментного обміну

1. Обмін білірубіну в організмі.
2. Принцип визначення білірубіну.
3. Діагностичне значення визначення білірубіну.
4. Обмін білірубіну за гемолітичної жовтяниці.
5. Обмін білірубіну за паренхіматозної жовтяниці.
6. Обмін білірубіну за механічної жовтяниці.
7. Діагностичне значення визначення метгемоглобіну в крові.

Розділ 15

Дослідження сечі

1. Топографія нирок у тварин.
2. Перерахувати основні методи дослідження нирок.
3. Методи дослідження сечового міхура та уретри.
4. Теорія сечоутворення.
5. Ниркові набряки: механізм утворення та диференціація.
6. Перерахувати хвороби нирок і сечових шляхів.
7. Навести визначення запальних процесів у нирках.
8. Отримання сечі у тварин.

9. Особливості отримання сечі у коней.
10. Правила зберігання і консервування сечі.
11. Кількість сечі, яку виділяють тварини за добу.
12. Гормони, які регулюють виділення сечі, та їх вплив на добовий діурез.
13. Причини олігурії.
14. Причини поліурії.
15. Колір сечі, його зміни та причини.
16. Причини гематурії та її різновиди.
17. Диференціація гематурії, гемоглобінурії та міоглобінурії.
18. Прозорість сечі та причини її помутніння.
19. Консистенція і запах сечі та їх зміни у разі хвороб.
20. Відносна густина сечі в нормі та причини її змін.
21. Водневий показник сечі в нормі та причини його змін.
22. Причини гемоглобінурії та її диференціація від гематурії.
23. Якісні реакції на білок у сечі.
24. Визначення кількості білка у сечі.
25. Класифікація і причини ниркової протеїнурії.
26. Диференціація окремих хвороб нирок за рівнем протеїнурії.
27. Диференціація ниркової і позаниркової протеїнурії (загальні принципи).
28. Якісні реакції визначення глюкози в сечі (перерахувати).
Описати пробу Гайнеса.
29. Визначення глюкози в сечі пробою Ніляндера.
30. Глюкозурія та її класифікація. Поняття про нирковий поріг, його рівень у тварин різних видів.
31. Діагностичне значення патологічної глюкозурії.
32. Назвіть гормони гіпер- і гіпоглікемічної дії.
33. Кетонурія та її причини.
34. Визначення кетонових тіл у сечі.
35. Діагностичне значення визначення білірубину в сечі.
36. Діагностичне і прогностичне значення уробіліногенурії.
37. Диференціація жовтяниць за вмістом білірубину та уробіліну в сечі.
38. Принцип методів визначення крові в сечі. Перерахувати методи.
39. Методи визначення гемоглобіну в сечі.
40. Диференціація ниркової і позаниркової гематурії.
41. Гемоглобінурія та її діагностичне значення.
42. Діагностичне значення гематурії.
43. Діагностичне значення визначення залишкового азоту в сечі.
44. Діагностичне значення індиканурії.

45. Діагностичне значення визначення сечовини в сечі.
46. Діагностичне значення визначення креатиніну в сечі.
47. Ферментоурія та її значення у лабораторній діагностиці хвороб нирок (загальні принципи).
48. Діагностичне значення визначення ГГТП у сечі.
49. Діагностичне значення визначення ЛФ і ЛДГ у сечі.
50. Діагностичне значення визначення α -амілази в сечі.
51. Фізичні особливості сечі у коней.
52. Особливості дослідження сечі коней на вміст білка і глюкози.
53. Причини еритроцитурії і лейкоцитурії у разі різних хвороб сечової системи.
54. Діагностичне значення виявлення епітеліальних клітин у сечі.
55. Діагностичне значення гіалінових, епітеліальних і зернистих циліндрів у сечі.
56. Діагностичне значення воскоподібних, еритроцитарних і гемоглобінових циліндрів у сечі.

Тести до розділу 15 Дослідження сечі

1. Сечу для дослідження відбирають:
 - а) вдень до годівлі;
 - б) вдень після годівлі;
 - в) вранці натще;
 - г) цілодобово.
2. Сечу дозволяється консервувати:
 - а) тимолом;
 - б) гепарином;
 - в) хлороформом;
 - г) толуолом;
 - д) заморожуванням.
3. Олігурія – це:
 - а) зменшення частоти сечовиділення;
 - б) припинення діурезу;
 - в) зменшення добового діурезу;
 - г) зменшення частоти сечовиділення і добового діурезу;
 - д) збільшення добового діурезу.

4. Олігурія виникає у разі:
- а) зневоднення організму;
 - б) гломерулонефриту;
 - в) збільшення виділення вазопресину;
 - г) зменшення виділення вазопресину;
 - д) збільшення секреції альдостерону;
 - е) зменшення секреції альдостерону;
 - ж) серцево-судинної недостатності.

5. Поліурія виникає у разі:
- а) зневоднення організму;
 - б) цукрового діабету;
 - в) асцити та плевриту;
 - г) нефротичного синдрому;
 - д) гломерулонефриту;
 - е) зменшення виділення вазопресину;
 - ж) збільшення виділення вазопресину.

6. Якщо під час сечовиділення вся сеча червоного кольору, то це вказує на:

- а) ураження сечовивідних шляхів;
- б) ураження сечового міхура;
- в) захворювання нирок;
- г) міоглобінурію;
- д) гемоглобінурію.

7. У коней виділяється мутнувата сеча – це:

- а) норма;
- б) вказує на ураження нирок;
- в) виникає після поїдання великої кількості зерна.

8. Якщо сеча піниться, то це означає, що:

- а) у ній проходять процеси бродіння з утворенням газів;
- б) у сечі великий вміст білка;
- в) сеча містить багато епітеліальних клітин, бактерій і слизу.

9. Ниркова гематурія виникає у разі:

- а) гломерулонефриту;
- б) інтерстиціального нефриту;
- в) нефротичного синдрому;
- г) пієлонефриту;
- д) нефросклерозу;
- е) пухлин нирок.

10. Гемоглобінурія виникає у разі:
- а) патології печінки;
 - б) гемолітичної анемії;
 - в) постгеморагічної анемії;
 - г) пухлин нирок;
 - д) гломерулонефриту;
 - е) пієлонефриту.
11. Відносна густина сечі залежить від:
- а) стану водного обміну;
 - б) концентраційної здатності нирок;
 - в) екскреторної функції нирок;
 - г) вмісту в сечі сечовини;
 - д) вмісту в сечі білка;
 - е) вмісту в сечі глюкози;
 - ж) реабсорбційної функції ниркових каналців;
 - з) виділення АДГ.
12. Лужна реакція сечі у тварин буває у разі:
- а) згодовування великої кількості рослинних кормів;
 - б) надлишку протеїну в раціоні;
 - в) голодування;
 - г) захворювань органів сечової системи.
13. Причини ренальної протеїнурії:
- а) інтоксикація;
 - б) серцева недостатність;
 - в) патологія печінки;
 - г) гломерулонефрит;
 - д) нефротичний синдром.
14. За позаниркової протеїнурії вміст білка в сечі становить:
- а) до 0,1%;
 - б) до 1%;
 - в) до 2%.
15. За ниркової протеїнурії вміст білка в сечі становить:
- а) до 0,1%;
 - б) до 1,5%;
 - в) до 2,5%.
16. Нирковий поріг для глюкози (мілімоль глюкози в 1 л крові) у жуйних становить:
- а) 2–3;
 - б) 3–5;
 - в) 5–6;
 - г) 6–9.

17. За ренальної глюкозурії рівень глюкози у крові:
- а) зменшений;
 - б) збільшений;
 - в) у нормі.
18. Причини патологічної глюкозурії:
- а) патологія підшлункової залози;
 - б) гіперфункція надниркових залоз;
 - в) гіпофункція надниркових залоз;
 - г) гіперфункція щитоподібної залози.
19. Кетонурія у корів діагностується за вмісту кетонових тіл у сечі (ммоль/л):
- а) до 0,5;
 - б) 0,6–1,5;
 - в) 1,6–2,5;
 - г) 2,6–3,5.
20. Кетонурія у корів виникає при:
- а) голодуванні;
 - б) ожирінні;
 - в) нестачі енергії в раціоні;
 - г) нестачі протеїну в раціоні;
 - е) нестачі цукру в раціоні;
 - ж) надлишку цукру в раціоні.
21. Білірубінурія виникає у разі жовтяниці:
- а) паренхіматозної;
 - б) механічної;
 - в) гемолітичної.
22. Уробіліногенурія розвивається у разі жовтяниці:
- а) гемолітичної;
 - б) механічної;
 - в) паренхіматозної.
23. Білірубінурія та уробіліногенурія розвиваються у разі жовтяниці:
- а) гемолітичної;
 - б) механічної;
 - в) паренхіматозної.
24. За позаниркової гематурії:
- 1) еритроцитів у полі зору:
 - а) 10–20;
 - б) 21–50;
 - в) 51–100;
 - 2) білка в сечі (г/л):
 - а) менше 1;
 - б) більше 1.

25. За ниркової гематурії:
- 1) еритроцитів у полі зору:
 - а) 10–20;
 - б) 21–50;
 - в) 51–100;
 - 2) білка в сечі, г/л:
 - а) менше 1;
 - б) більше 1.
26. До організованих компонентів сечі відносять:
- а) формені елементи крові;
 - б) солі кальцію;
 - в) циліндри;
 - г) епітеліальні клітини;
27. У сечі кислої реакції є:
- а) кристали сечової кислоти;
 - б) урати;
 - в) фосфати.
28. Сеча лужної реакції містить:
- а) кальцію оксалат;
 - б) калію сульфат;
 - в) кальцію карбонат;
 - г) трипельфосфат.

Розділ 19–22

Дослідження вмісту рубця

1. Фізичні властивості вмісту рубця в нормі та їх зміни за ацидозу і алкалозу.
2. Визначення величини рН вмісту рубця, оптимальні показники.
3. Клінічне значення визначення величини рН вмісту рубця.
4. Зміни вмісту рубця за ацидозу.
5. ЛЖК, які утворюються у разі гідролізу вуглеводів у рубці. Їх співвідношення у здорових тварин.
6. Роль оцтової кислоти вмісту рубця в обміні речовин у жуйних.
7. Діагностичне значення визначення загальної кількості синтезованих ЛЖК у рубці.
8. Фізіологічна роль пропіонової кислоти, зміни її кількості у вмісті рубця під час патології.
9. Діагностичне значення визначення молочної кислоти у вмісті рубця.
10. Діагностичне значення визначення масляної кислоти у вмісті рубця та її роль в організмі.

11. Вплив структури раціону на синтез і співвідношення ЛЖК у вмісті рубця.
12. Мікроорганізми, що населяють передшлунки жуйних тварин. Функції інфузорій.
13. Діагностичне значення підрахунку кількості інфузорій у рубці. Зміни кількості інфузорій за різних хвороб.
14. Діагностичне значення визначення целюлазної активності мікроорганізмів рубця.
15. Діагностичне значення редуктазної проби та її постановка (за Dirksen J.).
16. Клінічне значення визначення амілазної активності мікроорганізмів рубця.
17. Перетворення протеїну в передшлунках жуйних.
18. Клінічне значення визначення ліполітичної активності мікроорганізмів рубця.
19. Шляхи використання амінокислот у передшлунках.
20. Клінічне значення визначення аміаку у вмісті рубця.
21. Методика підрахунку інфузорій у вмісті рубця.
22. Діагностичне значення рубцево-печінкової циркуляції аміаку в жуйних.

Тести до розділів 19–22 Дослідження вмісту рубця

1. Для взяття вмісту рубця використовують зонди:
 - а) Хохлова;
 - б) Черкасова;
 - в) з мандреном і оливою;
 - г) ЗМУ-1;
 - д) ротоглотковий зонд із металевою оливою;
 - е) гумовий шланг достатньої довжини і діаметра.
2. Для дослідження вмісту рубця беруть:
 - а) перші 300–500 мл вмісту;
 - б) наступні 300–500 мл;
 - в) різниці у порціях немає.
3. Вміст рубця після його одержання можна зберігати у нативному вигляді:
 - а) за кімнатної температури – 9 год;
 - б) за кімнатної температури – 1 добу;
 - в) в холодильнику – 9 год;
 - г) в холодильнику – 1 добу;
 - д) в замороженому стані – до 6 міс.

4. Колір вмісту рубця у клінічно здорових тварин:
- а) від сіро-зеленого до коричнево-зеленого;
 - б) жовто-коричневий;
 - г) від темно-коричневого до чорно-зеленого;
 - д) від молочно-сірого до молочно-зеленого.
5. Величина рН вмісту рубця клінічно здорових високопродуктивних корів становить:
- а) 6,8–7,2;
 - б) 6,2–6,8;
 - в) 6,4–6,8;
 - г) 7,2–7,5.
6. Час прояву редуказної активності становить:
- а) 3–15 хв;
 - б) до 3 хв;
 - в) більше 15 хв.
7. Амілазна активність мікроорганізмів рубця збільшується у разі:
- а) збільшення частки грубих кормів (сіна) у структурі раціону;
 - б) збільшення частки злакових концентрованих кормів;
 - в) збільшення частки концкормів і зменшення грубих.
8. Загальна кількість ЛЖК у вмісті рубця високопродуктивних корів становить:
- а) 60–80 ммоль/л;
 - б) 80–120 ммоль/л;
 - в) 120–150 ммоль/л;
 - г) 150–180 ммоль/л.
9. За добу у рубці корови синтезується ЛЖК:
- а) 2–4 кг;
 - б) 4–6 кг;
 - в) 6–8 кг.
10. Збільшення загальної кількості ЛЖК буває за:
- а) збільшення частки сіна у структурі раціону;
 - б) зменшення частки грубих кормів;
 - в) збільшення кількості зернових концкормів.

ПРЕДМЕТНИЙ ПОКАЖЧИК

- 1,25-дигідрокси-
холекальциферол.....198, 251
- 2,3-дифосфогліцерат.....76, 226
- 24,25-дигідроксихолекальци-
ферол....198, 251
- 25-гідроксихолекальциферол.....198
- N-ацетилгалактозамін.....133, 147, 342
- α_1 -мікроглобулін.....314
- α -амілаза.....123, 342, 346
- α -глобуліни.....87–90, 146, 314
- β_2 -макроглобулін.....314
- β -глобуліни.....87–90, 146, 314
- β -каротин.....182
- β -оксимасяна кислота –
(див. *Кислота β -оксимасяна*)
- γ -глобуліни.....87–90, 146, 314
- γ -глутамілпептид *акцепторний*....122, 345
- γ -глутамілтранспептидаза *в сечі*...342–345
- γ -глутамілтранспептидаза.....120
- γ -глутамілтрансфераза.....122
- Абсцес *нирок*.....303
- Абсцеси *печінки*.....88
- Адгезивно-агрегаційна активність
тромбоцитів.....275, 280
- АДФ.....133, 207, 275, 280, 282
- Азот *сечовини*.....110, 330, 333
- Азот: *залишковий, загальний*.....27, 109,
329, 330, 333, 388
- Азотемічна стадія нефротичного
синдрому.....110, 333
- Акт *сечовиділення*.....304, 350
- Активна *метиленова група*.....335
- Активність α -амілази.....123, 342, 346
- Активність *каталази*.....186
- Активність *пероксидази*.....188
- Активність *супероксиддисмутази*
(СОД).....183, 184
- Аланінамінопептидаза.....342
- Аланінамінотрансфераза (АЛАТ)...118–120
- Аліментарна дистрофія –
(див. *Дистрофія аліментарна*)
- Алкалоз.....62, 81, 201, 215, 309, 366, 370
- Алкалоз *респіраторний,*
метаболический.....83, 84, 309
- Альбуміни.....62, 72, 86–97, 146, 158, 198
- Альбумін *сечі*.....198, 310–313
- Альбуміно-глобуліновий
коефіцієнт.....98, 99
- Альбумози.....311, 316, 337
- Альбумози *сечі*.....337
- Аміак.....5, 106, 212, 232, 307, 329,
359, 364, 377, 391
- Аміак *концентрований*.....319, 323
- Амілаза.....342
- Амінний азот.....377
- Амінокислоти.....116, 226, 276, 330, 360,
376
- Амонію *карбонат*.....309
- Амонію *роданід*.....337, 338
- Амонію *сульфат*....106, 319, 326, 329, 390
- Аналіз *хроматографічний*.....259, 385
- Аніон *ртуті роданідний*.....213, 338
- Антиоксиданти.....174, 235, 258
- Антиоксидантний захист (АОЗ)....174, 182
- Антитромбін III.....290
- Анурія.....305
- Апарат *Маркгама*.....383
- Апаратура *фотометрична*.....6, 20
- Ареометр.....61, 296, 297
- Артрит.....88, 149, 191
- Аскорбінова кислота – (див. *Вітамін С*)
- Аспаргатамінотрансфераза (АсАТ)...118–120
- Асцит.....305
- Атомно-абсорбційна фотометрія –
(див. *Фотометрія атомно-
абсорбційна*)
- Атомно-абсорбційний спектрофотометр –
(див. *Спектрофотометр*)
- Атрофія *ниркової паренхіми*.....303, 304
- АТФ.....133, 135, 173, 207, 234, 275, 379
- Ацетил-КоА.....168
- Ацетилхолін.....135, 137, 212, 394
- Ацетилхолінестераза.....137
- Ацетоацетат.....168
- Ацетон.....51, 163–172, 302, 319
- Ацетонціангідрин.....37, 327
- Ацетооцтова кислота –
(див. *Кислота ацетооцтова*)
- Ацидоз.....62, 81–83, 146, 201,
365, 368, 371, 382, 388
- Ацидоз *метаболический,*
респіраторний.....82, 83, 309
- Ацидоз *рубця*.....82, 309
- Бабезіоз.....60, 328

Бактерії.....	273, 354, 378, 387, 396–399
Бактерієурія.....	342
Барію хлорид.....	102, 321
Білівердин.....	264, 321, 353
Білірубін.....	27, 28, 160, 182, 264–269, 310, 321, 322, 352
Білірубінглюкуроніди.....	264
Білірубінурія.....	322, 412
Білки.....	31, 85, 88, 92, 138, 146, 161, 173, 182, 226, 313, 352, 377, 390, 396
Білки “гострої фази”.....	88, 146, 236, 283
Білки плазми.....	146
Білковий азот.....	390
Білкові молекули.....	173
Білкові фракції.....	28, 87, 89
Білок загальний.....	27–29, 32, 84–87, 298, 301
Білок яєць.....	263
Біопсія.....	310
Біохімічна лабораторія.....	5
Біуретова реакція.....	85
Блювання.....	41, 62, 83, 221, 308, 309
Бронхолегеневий тест.....	97
Бронхолегеневий тест (удосконалений).....	98
Бронхопневмонія катаральна.....	78, 88
Буфер фосфатний.....	183, 184, 189–193, 244, 282, 285, 316, 376
Бюретка.....	98, 203, 379, 389, 391
Вазопресин.....	217, 218, 275, 305, 306, 410
Ванадат-молібденовий реактив.....	206
Величина рН.....	81, 82, 309, 342, 351, 367, 368, 394, 396, 415
Величини фізіологічні.....	207, 234, 238, 268
Вердоглобін.....	264
Виразки.....	124, 225, 259, 304–306, 328, 347
Виразки шлунка.....	124, 225, 347
Високопродуктивна корова.....	82, 114, 119, 122, 133, 161, 168, 208, 212, 308, 333, 335, 368, 373, 386
Відновлення нітритів.....	371
Відносна густина крові.....	61
Відносна густина ліквору.....	30
Відносна густина молозива.....	296
Відносна густина сечі.....	308
Вільні жирні кислоти.....	158, 379
Вісмуту нітрат, оксид, металічний, сульфат.....	315, 316
Вітамін U (S-метилметіонін).....	239
Вітамін А.....	29, 154, 174, 239, 241
Вітамін В ₁	146, 239
Вітамін В ₂	38, 41, 239, 260
Вітамін В ₃	239
Вітамін В ₅	239
Вітамін В ₆	239
Вітамін В ₁₂	38, 41, 239
Вітамін В ₁₃	239
Вітамін В ₁₅	239
Вітамін В _С	38, 41, 239, 262
Вітамін С.....	28, 38, 41, 174, 181, 239
Вітамін D.....	129, 154, 197, 207, 239, 253
Вітамін-D-гідроксилази.....	254
Вітамін Е.....	28, 29, 154, 174, 181, 239
Вітамін F.....	239, 254
Вітамін К.....	154, 181, 239
Вітамін Н.....	239
Вітамін Р.....	174, 239
Вітаміни.....	239
Вітаміни водорозчинні.....	239
Вітаміни жиророзчинні.....	239
Вітаміноподібні речовини.....	239
Вміст гемоглобіну в одному еритроциті.....	36, 42
Вміст рубця.....	30, 362
Вміст шлунка.....	30, 382
Вода дистильована.....	6, 11
Водянка.....	218
Вуглеводи.....	138, 157, 226, 314, 370, 397
Газ вуглекислий.....	80, 85, 220, 236, 330, 358, 370, 377
Газовий хроматограф – (див. Хроматограф газовий)	
Галактоза.....	138, 146, 319, 397
Галактозурія.....	319
Гангліозиди.....	154
Гангрена легень.....	306, 337
Гаптоглобін.....	147
Гарячка.....	66, 306, 308, 313
Гастроентерит.....	45, 253, 305
Гексоза.....	138, 146, 147
Гексозаміни.....	146, 147
Гематин солянокислий.....	36, 37, 326, 327
Гематокритна величина.....	27, 42, 58, 64
Гематурія.....	304, 306, 325, 327, 355, 357
Гематурія великої рогатої худоби (хронічна).....	304
Геміглобін.....	37, 270, 234
Геміглобінціанід.....	37, 270, 325, 327

Гемоглобін.....	27, 28, 34, 36–38, 58, 183, 220, 264, 270, 323, 326, 353, 361
Гемоглобінурія.....	234, 306, 313, 328, 356, 361
Гемоліз <i>еритроцитів</i>	28, 180, 269
Гемометр <i>Салі</i>	36, 67, 326
Гемосидерин.....	222, 224, 325
Гемостаз <i>вторинний</i>	272
Гемостаз <i>первинний</i>	272
Гепарансульфат.....	147, 148, 152, 278
Гепарин.....	27–29, 67, 69, 71, 76, 147
Гепатит.....	87–89, 96, 105, 117, 120, 124, 137, 150, 156–158, 161, 185, 197, 225, 253, 322, 347, 394
Гепатодистрофія – (див. <i>Гепатоз</i>)	
Гепатодистрофія <i>жирова</i>	120, 141, 157, 185, 335
Гепатоз.....	87, 96, 102, 120, 149–153, 161, 168, 234, 253, 259, 269, 322, 373, 387, 394
Гетерополісахариди.....	138, 147
Гіалуронова кислота – (див. <i>Кислота гіалуронова</i>)	
Гідроген.....	106, 140, 154, 173, 182, 190
Гідроксиаміну гідрохлорид.....	209, 223, 227
Гідроксильний радикал.....	173, 182
Гідроліз <i>динатрійфосфату</i>	347
Гідроліз.....	73, 107, 112, 135, 137, 149, 155, 199, 236, 341, 252, 299, 330, 347, 365, 377, 399
Гідронефроз.....	303, 304
Гідропероксидази.....	173, 178, 182, 195, 258
Гіперадренокортицизм.....	306
Гіперазотемія.....	110
Гіперамілаземія.....	124, 347
Гіперамілазурія.....	124, 347
Гіперацидний стан.....	382
Гіпергаммаглобулінемія.....	89
Гіперглікемія.....	141, 142, 306
Гіперглобулінемія.....	97
Гіперкальціурія.....	341
Гіперкальціємічна остеопатія.....	341
Гіперкупроз.....	234
Гіперпаратиреоїдизм.....	129, 251, 341
Гіперпротеїнемія.....	87
Гіперхолестеролемія.....	161, 162
Гіпо- і гіперфосфатемія.....	207, 208
Гіпоальбумінемія.....	63, 88, 97
Гіповітамінози <i>С, К</i>	328
Гіпогаммаглобулінемія.....	89
Гіпоглікемія.....	141, 144
Гіпокальціємія.....	3, 31, 197, 201, 251, 253
Гіпомагніємія, гіпермагніємія.....	212, 213
Гіпопротеїнемія.....	63, 88
Гіпостенурія.....	308
Гіпосульфід <i>кристалічний</i>	336
Гіпотиреоз.....	157, 162
Гіпотонія <i>передилунків</i>	368, 369, 372
Гіпофункція <i>щитоподібної залози</i>	156
Гістамін.....	124, 275, 347, 368
Глікоген.....	124, 138, 142, 146, 200, 318, 347
Глікозаміноглікани (<i>ГАГ</i>).....	147, 151, 274
Глікопротеїни.....	146–149, 235, 274, 278
Гліцерол.....	154, 354
Гліцин.....	223, 227, 377
Глобін.....	264
Глобуліни.....	29, 88, 96, 158
Гломерулонефрит гострий.....	305, 308, 314, 318, 328, 333, 343, 355, 357
Гломерулонефрит дифузний.....	305
Гломерулонефрит хронічний.....	110, 305, 318, 328, 333, 343
Гломерулонефрит.....	66, 83, 87, 88, 114, 149, 162, 207, 303, 314
Глутаміловий залишок.....	345
Глутамін.....	103, 381
Глутатіон.....	174, 189, 193, 195
Глутатіонпероксидаза.....	173, 182, 189
Глутатіонредуктаза.....	174, 191
Глутатіонтрансфераза (<i>ГП</i>).....	174
Глюкоза.....	28, 138–145, 315–318, 335
Глюкоза сечі.....	315
Глюкозооксидаза.....	140, 315, 316
Глюкозурія.....	142, 308, 318, 356
Гонадотропін.....	146
Гормони.....	27, 88, 142, 146, 154, 174, 200, 207, 217, 251, 308
Грам-еквівалент.....	12, 15
Графік калібрувальний.....	18
Гриби.....	354, 396
Гуанідину гідрохлорид.....	223, 227
Гуморальний захист організму.....	88
Густина молозива.....	296
Густина сечі відносна.....	308, 351
ДВЗ-синдром.....	272, 273, 281, 285, 292
Дезамінування.....	112, 377
Декарбоксилаза.....	144

Декомпенсація серцева.....	64	Ефір.....	39, 47, 49, 51, 84, 254, 255, 360, 380
Декстрини.....	124, 347	Ефір <i>сірчанокислий</i>	323
Дерматансульфат.....	147	Ехінококоз.....	53, 322
Диспансеризація.....	27, 303, 350	Желатин.....	183, 354
Диспротеїнемія.....	63, 88, 96–100, 105	Жири.....	154, 305
Дистрофічні процеси.....	88, 150, 303	Жирні кислоти.....	138, 142, 154, 158, 173, 177, 236, 364, 383–387, 397
Дистрофія <i>аліментарна</i>	141	Жироподібні речовини.....	154
Дистрофія <i>м'язова</i>	259, 319	Жовток яєць.....	241–244, 254, 257–262
Діабет.....	83, 157	Жовтяниця <i>паренхіматозна, гемолітична, механічна</i>	64, 105, 269, 306, 322, 324
Діабет <i>ренальний</i>	318	Жовч.....	122, 129, 158, 198, 226, 264, 322
Діабет <i>цукровий, нецукровий</i>	3, 31, 112, 142, 162, 167, 305–307, 320	Жовчний міхур.....	342
Діагностика <i>диференціальна</i>	105, 310	Жовчні кислоти – (див. <i>Кислоти жовчні</i>)	
Діапазон <i>оптимальних</i> <i>концентрацій</i>	213, 217, 220, 225, 234, 238	Жовчні пігменти – (див. <i>Пігменти жовчні</i>)	
Діарея.....	38, 64, 221, 308	Заворот <i>кишечнику</i>	324
Діацетил.....	107	Загальна антиоксидантна активність (<i>ЗАА</i>).....	182, 174
Діацетилмонооксим.....	107–109, 330–332	Загальна залізовв'язувальна здатність крові (<i>ЗЗЗЗ</i>).....	227–229
Діетилдитіокарбамат <i>натрію</i>	232, 233	Загальна кислотність.....	30, 382
Дієнові кон'югати (<i>ДК</i>).....	173, 177–181	Загальний азот (<i>нітроген</i>).....	330, 388–394
Діурез.....	29, 217, 305, 307, 308, 330	Загальний кальцій.....	196–199, 203, 302
ДНК.....	173, 182, 236	Залежність корелятивна.....	301
Довголанцюгові жирні кислоти.....	380	Залишковий азот.....	27, 106, 328
Довжина хвилі.....	74, 120, 140, 171, 213, 225, 316, 348	Заліза (феруму) <i>хлорид</i>	71, 109, 159
Дозатори.....	23–26, 40	Залізо, ферум.....	27, 41, 222–230
Екскреція сечовини.....	393	Залізоаміачний галун.....	337
Ексудат.....	38, 41, 62, 87, 238, 303, 340	Залоза <i>підшлункова</i>	87, 122, 124, 141, 146, 162, 189, 230, 236, 303, 345
Електрофорез.....	20, 89	Залози <i>слинні</i>	124, 347
Ендогідроліз.....	124, 347	Запалення <i>сечового міхура</i>	307
Ендокардит септичний.....	88	Запалення <i>уретри</i>	304
Ендометрит.....	27, 45, 168, 172, 355, 373	Запах.....	9, 305, 307, 363, 366
Ендотелій <i>ниркових клубочків</i>	310	Запах <i>аміачний</i>	307
Енергетичний обмін <i>м'язової</i> <i>тканини</i>	114, 333	Запах <i>сечі фруктової</i>	307
Ентерит.....	89, 141, 225	Захворювання виразкові.....	225, 306
Ентероколіт.....	183, 324	Зброджування <i>глюкози</i>	371
Енцефалопатія <i>печінкова</i>	369, 394	Зважувальна техніка.....	6
Епітеліальні клітини: <i>плескати,</i> <i>циліндричні, круглі</i>	355, 356	Звивисті каналці <i>проксимальні</i>	252, 342
Епітелій.....	354, 356	Зівник.....	362, 363
Ергокальциферол.....	251	Зміни морфологічні.....	58
Еритропоетин.....	146	Зміщення <i>сичуга</i>	83, 370, 373, 382, 399
Еритроцити.....	28, 31, 36, 39–43, 66–79, 179, 182, 184, 186, 194, 354	Зневоднення <i>організму</i>	65, 87, 110, 305, 308
Еритроцитурія.....	355	Знежирене молозиво.....	299
Етакридин.....	151	Ізоферменти <i>в сечі</i>	124, 343, 347, 349
Ефективність абсорбції.....	301	Ізоферменти <i>слинний, панкреатичний</i>	347

Імунітет <i>напружений</i>	296	Каротин.....	174, 240, 241
Імуноглобуліни – (див. <i>Гаммаглобуліни</i>)		Каротиноїди.....	241, 257, 258
Імуноглобуліни <i>колостральні</i>	92, 296	Карцинома нирок.....	343
Імунореактивна система.....	89	Каталаза.....	173, 174, 186, 191, 222, 224
Інвагінація.....	324	Катетер.....	304, 350
Інгібітори <i>коагуляції</i>	148, 273–278	Катетеризація.....	29, 304, 350
Індиго <i>синій, червоний</i>	336, 361	Катехоламіни.....	142, 147
Індикан.....	109, 353	Каудальна порожниста вена.....	265, 323
Індикан <i>в сечі</i>	336, 352, 353	Кератансульфат.....	147
Індиканурія.....	306, 353, 361	Кетоацидоз.....	82, 320
Індоксил.....	336, 353	Кетодієни (<i>КД</i>).....	170–180
Індол.....	336, 369	Кетоз.....	29, 88, 141, 162, 177, 368, 387
Інозит.....	239	Кетонемія.....	141, 168
Інсулін.....	141, 185, 318	Кетонові тіла.....	27, 82, 154, 163–177, 302–320, 352
Інтерстицій <i>навколо клубочковий</i>	303	Кетонлактія.....	168
Інтерферон.....	147, 275	Кетонурія.....	307, 320
Інтоксикації.....	41, 60, 117, 218, 234, 328, 361	Кефалін.....	154
Інфузорії.....	368, 378, 396–399	Кислота β -оксималяна.....	164, 167–171
Іон <i>хлоридний, феруму</i>	213, 338	Кислота <i>ацетооцтова</i>	82, 166, 170, 302, 320
Йод.....	8, 27, 122, 164, 196, 243, 321, 345, 373	Кислота <i>бензойна</i>	139
Йодиди.....	336	Кислота <i>борна</i>	114, 335
Казеїн.....	297, 299, 376	Кислота <i>вугільна</i>	82, 364, 389
Кайма <i>щиткоподібна</i>	343	Кислота <i>гіалуронова</i>	147, 274
Калій.....	28, 219–223	Кислота <i>глюконова</i>	140, 316
Калій <i>залізоціаністий</i>	37, 311	Кислота <i>глюкуронова</i>	147, 265
Калію <i>перманганат</i>	188, 336, 338	Кислота <i>індоксилсульфатна</i>	336
Калію <i>сульфат</i>	358	Кислота <i>карболова</i>	306
Кальцитріол.....	201, 253	Кислота <i>лимонна</i>	253
Кальцифікація.....	253	Кислота <i>лінолева</i>	381
Кальцієзв'язувальний білок.....	198, 251, 252	Кислота <i>ліноленова</i> – (див. <i>Вітамін F</i>)	
Кальцій.....	27, 29, 66, 202–205	Кислота <i>масляна</i>	82, 320, 368, 387
Кальцій <i>у сечі</i>	340	Кислота <i>молочна</i>	82, 144, 376, 388
Кальцій <i>іонізований, білокзв'язаний</i>	198– 201	Кислота <i>нітратна</i>	311, 312
Кальцію <i>гідрокарбонат, оксалат</i>	307, 358	Кислота <i>ортофосфатна</i>	109, 124, 154, 200
Кальцію <i>сульфат</i>	358	Кислота <i>оцтова</i>	71, 120, 135
Кальцію <i>фосфат</i>	359	Кислота <i>параамінобензойна</i>	239
Кальцію <i>хлорид</i>	101, 272	Кислота <i>пікринова</i>	113, 138, 334
Камені <i>сечові</i>	113, 309, 358, 360	Кислота <i>піровиноградна</i>	82, 118, 130, 142
Канальці <i>ниркові</i>	114, 122, 208, 252, 304	Кислота <i>пропіонова</i>	138, 364, 368, 387
Капіляри <i>жовчні</i>	264, 322	Кислота <i>сечова</i>	84, 106, 111, 182, 309, 330, 360
Капсула <i>фіброзна</i>	303	Кислота <i>сульфатна</i>	7, 71, 80
Капсула <i>Шумлянського-Боумена</i>	303	Кислота <i>сульфосаліцилова</i>	310, 311, 352
Карбгемоглобін, карбоксигемоглобін.....	264	Кислота <i>тіобарбітурова (ТБК)</i>	176
Карбонати.....	80, 215, 227, 297, 307	Кислота <i>трихлороцтова (ТХО)</i>	76, 106, 390
Карбункули.....	303		
Карнітин.....	239		

Кислота хлоридна.....	12, 30, 36, 135	Лактатдегідрогеназа.....	29, 134
Кислота щавлевооцтова.....	118, 168	Лактоденсиметр.....	298
Кислоти жовчні.....	62, 154, 158, 310, 322	Лактоза.....	140, 228
Кислоти карбонові.....	154, 387, 397	Лактозурия.....	321
Кислоти леткі жирні.....	82, 138, 364–372, 383, 387, 396	Лейкограма.....	31, 53, 57
Кислоти уронові.....	142	Лейкоз.....	42, 46, 54, 56, 67, 89, 114, 151, 152, 238, 275
Кислотність молозива.....	300	Лейкопенія.....	46
Кислотньо-основний баланс.....	219, 405	Лейкоцити.....	30, 45–47, 57, 59, 307, 356, 357
Кілодальтон.....	344	Лейкоцитоз.....	45, 46, 54, 55, 59, 404
Кісткова тканина.....	255	Лейцин.....	362, 363, 398
Кістково-мозковий пунктат.....	31	Лептоспіроз.....	39, 61, 271, 330
Клінічний прояв.....	223, 240	Летальність.....	300
Клітини канальцевого епітелію.....	331	Лецитин.....	156
Клітини ниркових канальців.....	344	ЛЖК.....	83, 140, 366, 367, 370–372, 374, 381, 385–389, 398, 415–417
Клубочковий фільтр.....	343	Лізоцим.....	316, 344
Колаген.....	148–150, 152, 236, 275–277, 283, 284	Ліквор.....	26, 30, 31, 131, 236, 396
Колібактеріоз.....	89, 332, 335, 338, 347	Лімфолейкоз.....	55, 90
Колірний показник.....	36, 43, 57	Ліпаза.....	344, 382
Колоїдно-осадові проби.....	85, 97	Ліпіди.....	76, 119, 156, 157, 175, 382, 398, 406
Компоненти осаду сечі організовані, неорганізовані.....	360	Ліполітична активність.....	382
Консерванти.....	247	Ліпопротеїди (ЛП).....	106, 160, 161
Консистенція.....	309, 353, 368, 410	Ліпопротеїди високої густини (ЛПВГ).....	161
Константа фізіологічна.....	203	Ліпурия аліментарна.....	309
Контроль внутрішньолабораторний.....	16, 19	Лістеріоз.....	31, 55, 310, 320
Контроль міжлабораторний.....	19	Лужна фосфатаза.....	126, 127, 129–131, 344, 345, 350, 351
Контроль якості.....	16	Лужний резерв крові.....	83
Контрольна карта.....	18	Магній.....	210–212, 214
Копропорфірини.....	266	Магнію сульфат.....	61, 211, 214, 385
Коротколанцюгові жирні кислоти.....	379	Мазки крові.....	47, 48
Кортизол.....	308	Макроелементи.....	198
Кортикостероїди.....	126, 349	Малоновий діальдегід.....	175–177
Креатин.....	108, 116, 137, 332, 336	Мальпігієві клубочки.....	305
Креатинін.....	85, 108, 115–118, 312, 332, 336–338, 406, 411	Мальтоза.....	377
Креатинінемія.....	337	Мезобілірубін.....	267
Креатинкіназа.....	137	Меланжер.....	40–42, 44, 45, 400
Креатинфосфат.....	116, 135, 209, 336	Мембрана базальна.....	276
Кристали сечової кислоти.....	362, 415	Мембрани еритроцитів.....	73, 229
Критерії контрольні.....	18, 19	Менінгоенцефаліт.....	31, 320
Критерії попереджувальні.....	18	Метгемоглобін.....	37, 226, 272, 327, 329, 355, 409
Крохмаль.....	90, 366, 375, 381, 390, 399, 401	Метиленовий синій.....	372
Кювета.....	23, 73–76, 78, 92, 100, 147, 159, 180, 202, 204, 220, 268, 272, 348, 376	Метод геміглобінціанідний, колориметричний, Салі.....	36

Метод електронно-автоматичний.....	65	Нефротичний синдром.....	152, 305, 306, 347, 413
Метод мікроцентрифугування.....	65	Ниркова миска.....	305
Метод Неводова.....	64	Ниркова недостатність.....	155, 184, 212
Метод Панченкова.....	63	Ниркова недостатність (гостра).....	107, 312, 325
Метод Тодорова.....	65	Ниркова недостатність (гостра).....	107, 312, 325
Мідь.....	198, 231, 232	Ниркова недостатність (хронічна).....	108, 112, 118, 308, 224
Міжнародна система одиниць.....	32	Нирковий поріг.....	320
Мікрогематурія.....	308	Нирковий фільтр.....	354
Мікроелементи.....	198, 227	Нітриди.....	373, 396
Мікрофлора.....	374	Новоутворення.....	107, 186, 312, 342
Мікрошприц.....	387, 388	Носоглотковий зонд.....	364
Мінералізат.....	331	Нуклеопротейни.....	114, 332
Міоглобін.....	224, 226, 266, 308, 312, 327, 328, 330	Об'єкт досліджень.....	26
Міоглобінурія.....	308, 315, 330	Обмін білковий, водно-сольовий.....	85, 306
Міокард.....	122, 134, 135, 137, 187, 219	Обмін водний.....	307
Міокардит.....	54	Ожиріння.....	158, 161
Міокардоз.....	89	Оксалати.....	28, 186, 309, 311, 349, 362
Міопатоз.....	330	Оксалати в раціоні.....	349
Молозивний жир.....	301	Оксигемоглобін.....	266
Молозиво.....	30, 62, 93, 94, 228, 244, 257, 298, 301–304	Оксид азоту.....	175, 276
Молозиво високої якості.....	302	Олігурія.....	307
Молоко.....	26, 29, 30, 159, 216, 228, 257, 298, 299, 304	Ортотолуїдин.....	317
Моноетаноламін.....	342	Ортофосфатна кислота – (див. Кислота ортофосфорна)	
Мукоїд.....	309	Осад сечі.....	356
Мурексид.....	205, 206	Осад сечі білковий.....	312
Муцин.....	309, 353	Остеодистрофія.....	131, 151, 200, 210, 254, 255
Натрій.....	86, 113, 180, 196, 217, 219, 329, 349, 377	Остеокальцин.....	255
Натрію гідроксид.....	11, 81, 82, 86, 87, 90, 108, 109, 127, 133, 134, 138, 145, 167–169, 171, 173, 174, 200, 205, 206, 211–213, 221, 262, 263, 284, 301, 317, 384, 394, 395	Остеоліз.....	255
Небілковий азот.....	392	Оцтова кислота (див. Кислота оцтова)	
Некробіоз.....	344	Оцтовий ангідрид.....	162
Нефелометрія.....	22	Панкреатит.....	120, 124, 143, 159, 321, 346
Нефрит.....	64, 67, 84, 88, 89, 103, 112, 117, 152, 158, 200, 305, 357, 358, 360, 412	Паралітична міоглобінурія коней.....	328, 330
Нефроз.....	64, 84, 88–90, 164, 200, 305, 306, 309, 316, 358, 359, 363	Параліч сечового міхура.....	306
Нефросклероз.....	152, 305, 307, 308, 310, 316, 320, 412	Паранефрит.....	305
		Парапротейни.....	89, 98
		Парапротейнурія.....	98
		Паратгормон.....	254
		Парез сечового міхура.....	306
		Паренхіма нирок.....	305
		Пароксизмальна гемоглобінурія телят.....	330

Паротит <i>гострий</i>	126, 349	Проба за Грінстедом (сулемова проба)....	97
Переродження <i>нирок (жирове)</i>	359	Проба за Постніковим В.С. (з розчином міді сульфату)....	101
Перикардит.....	46, 54, 89, 339	Проба зброджувальна.....	316
Перикардит <i>травматичний</i>	54, 339	Проба <i>Обермайєра, Яффе</i>	338, 339
Перинефрит.....	305	Проба <i>тимолова</i>	106
Пероксидаза.....	142, 175, 184	Проба <i>формолова</i>	102
Пероксидне окиснення ліпідів (ПОЛ)....	175	Проба <i>цинк-сульфатна</i> (<i>печінкова</i>).....	103
Пероксидний гемоліз еритроцитів.....	186	Проба <i>цинк-сульфатна</i>	104
Пероксильні радикали.....	175	Проби <i>Бенедикта, Ніляндера, Гейнеса, Фелінга, Лестраде</i>	317, 321
Печінка (<i>глікогеносинтезувальна функція</i>).....	320	Проби <i>Розіна, Фуше, Франка</i>	323, 324
Питома вага крові – (див. <i>Відносна густина крові</i>)		Проби <i>Флоренса-Камарицина, Богомолова, Шлізінгера, Гай-Крафта</i>	324, 325
Пігменти.....	89, 236, 266, 327	Провітамін D.....	156
Пігменти <i>гематогенні</i>	266	Продукти метаболізму.....	306
Пігменти <i>жовчні</i>	266, 308	Продукти розщеплення фібрину (<i>ПРФ</i>)	286–290
Пієліт.....	330, 357, 361	Пропіонова кислота – (див. <i>Кислота пропіонова</i>)	
Пієліт <i>гострий</i>	330	Просвіт каналців.....	344
Пієлонефрит.....	84, 112, 223, 305, 308, 357, 360	Простатит.....	357
Пієлонефрит <i>гнійний</i>	357	Протеїн.....	44, 88, 95
Піонефроз.....	3052	Протеїн С.....	276, 280, 294
Піпетка <i>пастерівська</i>	356	Протеїн <i>мікробний</i>	379–381, 395
Піровиноградна кислота – (див. <i>Кислота піровиноградна</i>)		Протеїнурія.....	64, 310, 312, 315, 358
Післяродова гемоглобінурія <i>корів</i>	330	Протеїнурія <i>каналцева, клубочкова, змішана, несправжня</i>	315
Післяродова <i>гіпокальціємія</i>	3, 200, 203	Протеїнурія <i>ниркова (ренальна)</i>	305
Піурія <i>ниркова</i>	357	Протеїнурія <i>передниркова</i> (<i>преренальна</i>)	305
Плазмалогени.....	156	Протеїнурія <i>післяниркова</i> (<i>постренальна</i>)	315
Плеврит.....	46, 84, 151, 307	Протеїнурія <i>фізіологічна</i>	358
Плевромукоїди.....	141	Протеоглікани.....	148, 276
Пневмонія.....	46, 54, 84, 89, 98, 109, 114, 170, 311	Протеолітична активність.....	378
Показник водневий.....	311, 356	Протоки <i>жовчні</i>	124, 347
Полідипсія.....	308	Протопорфірини-1х.....	266
Поліненасичені жирні кислоти.....	179, 238, 260, 383	Протромбін.....	148, 278
Полісахариди.....	126, 140, 149, 276, 279, 349, 399	Протромбіновий час.....	290
Поліурія.....	63, 220, 307, 353	Профіль <i>гематологічний</i>	56
Популяції <i>еритроцитів</i>	69	Процеси <i>гангренозні</i>	309
Порфірини.....	224, 266	Процеси <i>гнильні</i>	306, 338, 339
Посуд <i>хіміко-лабораторний</i>	6	Псевдохолінестераза.....	139
Прилади <i>електрохімічні</i>	20	Пухлини.....	46, 64, 89, 103, 144, 320
Прилади <i>оптоелектричні</i>	20	Пухлини <i>нирок</i>	330, 339
Прищитоподібна залоза.....	200, 209	Рак <i>сечового міхура</i>	339
Проба <i>бензидинова</i>	327		
Проба <i>Вельтмана</i>	102		
Проба <i>Гваякова</i>	328		

Рахіт.....	82, 131, 151, 200, 201, 254, 256
Реабсорбційна ємність	
<i>ниркових каналців</i>	310
Реабсорбція білків.....	307
Реабсорбція води.....	219, 307, 310, 316
Реабсорбція глюкози у ниркових	
<i>каналцях</i>	320
Реабсорбція каналцева.....	337
Реабсорбція натрію.....	219, 307
Реабсорбція первинної сечі.....	307
Реактив <i>Гайнеса, Росса</i>	317, 322
Реактив <i>Грісса</i>	396, 397
Реактив <i>Неслера</i>	108, 331, 393
Реакція <i>Лестраде, Ланге</i>	3040
Реакція <i>Яффе</i>	115, 116, 333, 336
Ревматизм.....	89
Редуктазна активність.....	372
Резистентність еритроцитів	
<i>кислотна</i>	37, 68
Резистентність еритроцитів	
<i>осмотична</i>	37, 67
Резистентність неспецифічна.....	303
Ретинол – (див. <i>Вітамін А</i>)	
Рефрактометр.....	22, 85, 293
Рефрактометрія.....	22, 85
Рибофлавін – (див. <i>Вітамін В₂</i>)	
Розчини.....	9
<i>розчини молярні</i>	9–11
<i>розчини нормальні</i>	9–12
Ротоглотковий зонд.....	364
Рубець.....	364
Рутин.....	176
Саліцилати.....	126, 354
Сальмонельоз.....	46, 89
Секреція антидіуретичного	
<i>гормону</i>	310
Секреція <i>вазопресину, альдостерону</i>	305
Селен.....	27, 174, 184, 193, 261, 391
Септичний стан.....	294, 339
Серцевий м'яз – (див. <i>Міокард</i>)	
Сеча добова, кінцева.....	337
Сеча консервована.....	338
Сеча консистенція (<i>тягуча,</i>	
<i>драгелеподібна</i>).....	305, 310
Сеча нативна.....	305
Сеча первинна.....	394
Сечова кислота – (див. <i>Кислота сечова</i>)	
Сечовина.....	27, 85, 108, 109, 332, 395
Сечокам'яна хвороба – (див. <i>Уролітіаз</i>)	
Сечокислий діатез.....	114
Сибірка.....	66, 330
Сила струму лампи.....	215, 219, 222, 227, 236, 240
Синдром <i>гепаторенальний</i>	113
Синдром <i>Кушинга</i>	144, 308
Синдром <i>нефротичний</i>	87, 152, 159, 210, 238, 256, 305, 306, 315, 353
Синдром <i>холемії</i>	326
Синовія (<i>синовіальна рідина</i>).....	131, 279
Сироватка крові.....	27–29
Сироватка <i>молозива</i>	288, 290
Система гемостазу.....	262
Система <i>гепатобіліарна</i>	120, 311, 334
Сіалоглікопротеїни.....	141, 144
Сіль <i>калійна</i>	328
Сіль <i>кухонна</i>	329
Сіль <i>сегнетова</i>	84, 305, 306, 362
Сіль <i>червона кров'яна</i>	38, 317
Сірка.....	308, 314
Сітка <i>Горяєва</i>	40, 44, 45, 271, 385
Сказ.....	137, 308
Склеротичне ураження	
<i>ниркових артеріол</i>	292
Смола <i>Гваякова</i>	315
Смужки <i>діагностичні</i>	
(<i>індикаторні</i>).....	298, 305, 310, 340
Солі <i>амонію</i>	381
Солі <i>фосфорнокислі, лимоннокислі</i>	286
Сорбент.....	219, 238, 372
Спектрофотометр	
<i>атомно-абсорбційний</i>	20, 205, 209, 212, 217, 225, 228
Спектрофотометр.....	19–23
Спектрофотометрія.....	21
Спирт.....	14, 40, 48, 50–53, 60, 79, 149
Спирт <i>етиловий</i>	50, 53, 176
Срібла <i>нітрат, хлорид</i>	327
Стабілізатори.....	249, 324
Стериди.....	149
Стеркобілін.....	255, 256, 312, 313
Стеркобіліноген.....	255, 256, 312, 313
Стероли.....	149, 367
Судан III.....	345
Сульфат <i>калію</i> – (див. <i>Калію сульфат</i>)	
Сульфат <i>кальцію</i> – (див. <i>Кальцію сульфат</i>)	
Сульфогемоглобін.....	313
Суміш <i>хрмова</i>	6, 7, 48, 122, 158, 221
Супернатант.....	176, 183, 208, 219, 338

Супероксиддисмутаза (СОД).....	166, 175, 177	Уроцистит.....	292, 295, 298, 342, 345
Суспензія еритроцитів.....	68–78, 172	Утворення папіломатозні.....	317
Телята новонароджені.....	66, 92, 221, 234, 284	УФ-детекція фосфомолібдатного комплексу.....	198
Тетрациклін.....	120, 335	Фактор концентрації сечовини.....	322
Тимол.....	30, 50, 101, 293	Фактор XIII.....	277
Тирозин.....	348, 363	Фактори згортання.....	265
Тіамін.....	139, 141	Фенол.....	134, 335, 338
Тіла кетонів (див. Кетонів тіла)		Фенолфталеїн.....	72, 79, 80, 286, 314, 368, 375
Тіла уробілінові (див. Уробілін)		Феритин.....	167, 175, 213, 216
Тіла уробіліногенів (див. Уробіліноген)		Ферментативна активність.....	390
Тіосечовина.....	134, 215, 306	Ферменти (ензими).....	114
Тканинне дихання.....	221, 252, 379	Ферменти гнільних бактерій.....	324
Токоферол – (див. Вітамін Е)		Ферменти дихальні.....	255
Толуол.....	30, 269, 393	Ферменти мікробні.....	360
Травматичний перикардит – (див. Перикардит травматичний)		Ферменти сечі (низькомолекулярні).....	330
Транссудат.....	39, 43, 63, 86, 294	Ферменти цитоплазматичні, лізосомальні, мітохондріальні.....	330, 331
Трансферин.....	141, 167, 213, 215, 218, 227, 302	Ферментурія.....	330
Трансферин сечі.....	302	Фібрин розчинний.....	262
Триацилгліцероли.....	149, 150	Фібриноген.....	31, 63, 87, 99, 272
Трилон Б.....	28, 61, 71, 123, 187, 195	Фібриноліз.....	263
Трилонометричний метод – (див. Метод трилонометричний)		Фізіологічна константа – (див. Константа фізіологічна)	
Трипельфосфат.....	345, 346	Фізіологічні величини – (див. Величини фізіологічні)	
Триптофан.....	324	Фіксанали.....	14, 131, 158
Трихлороцтова кислота.....	76, 103, 121, 122, 221, 306	Фільтраційна здатність базальної мембрани гломерулярних капілярів.....	320
Тромбіновий час.....	276	Фільтрація гломерулярна.....	330
Тромбоцити.....	37, 43, 45, 47, 51, 61, 142, 262–271	Фільтрація сечі.....	293
Туберкульоз.....	55, 87, 100, 110, 143, 212	Фістула рубця.....	351
Тубулярні ураження – (див. Ураження тубулярні)		Флавінаденіндинуклеотид (ФАД).....	252
Убіхінон.....	166, 233	Флавінмононуклеотид (ФМН).....	252
Ураження тубулярні.....	330	Флавопротеїни.....	252
Урати.....	109, 110, 295, 298, 345	Флотація.....	352, 354
Уретра.....	291–296, 303, 316, 342	Флуоресцентні основи Шіффа.....	173
Уретрит.....	342	Формальдегід.....	99, 150, 293, 341
Уробілін.....	255, 299, 311	Фосфати.....	217, 299, 347
Уробіліноген.....	30, 255, 311, 340	Фосфоліпіди.....	75, 149, 266, 367, 383
Уробіліногенурія.....	256, 311	Фосфор.....	27, 30, 78
Уробілінурія.....	311	Фосфорилювання.....	128, 199, 204
Урокіназа.....	330	Фосфорнокисла аміакмагnezія.....	345
Уролітіаз.....	3, 147, 292, 303, 329	Фотоелектроколориметр.....	19
Урометр.....	20, 296	Фотоколориметрія.....	19, 20
Уромукопротеїни.....	141	Фотометр.....	19, 20
Уропорфірини.....	255	Фотометрія атомно-абсорбційна.....	20

Фотометрія <i>полуменева</i>	20, 23	Целюлазна <i>активність</i>	359
Фруктоза.....	132, 143, 217	Центрифуга, центрифугат.....	20, 64, 68, 70, 163
Функції нирок – (див. <i>Нирки функції</i>)		Церулоплазмін.....	141, 167, 175, 221, 226
Фуросемід.....	120, 213, 335	Циліндри.....	6, 62, 131
Хвороба <i>Гамборо</i>	87	Циліндри <i>еритроцитарні</i>	344
Хвороба <i>сечокам'яна</i> – (див. <i>Уролітіаз</i>)		Циліндри <i>кров'яні</i>	343
Хвороби <i>печінки</i>	64, 191	Циліндри <i>сечі</i>	343
Хілурія.....	295	Циліндроїди.....	345
Хіміко-лабораторний посуд – (див. <i>Посуд хіміко-лабораторний</i>)		Циліндрурія.....	343
Хімічні <i>реактиви</i>	4–9	Цинк, <i>недостатність</i>	229, 230
Хімостаз.....	120, 334	Цинковий <i>пил</i>	337
Хінонімін.....	135, 305	Цироз.....	86–88, 94, 100
Хлорид <i>заліза (феруму)</i> – (див. <i>Заліза хлорид</i>)		Цироз <i>нирок</i>	294
Хлориди.....	205, 329	Цироз <i>печінки</i>	113, 131, 142, 146, 156, 178, 191, 216, 226, 310
Хлориди <i>у сечі</i>	326	Цистин.....	298, 348
Хлорне <i>залізо</i> – (див. <i>Залізо хлорне</i>)		Цистиноз.....	348
Хлороформ.....	30, 62, 154, 325, 348	Цитомембрана.....	264, 266, 268, 331
Холекальциферол.....	191, 242	Цукор.....	385, 307, 366, 374
Холестаза.....	118, 124, 152, 154	Цукор <i>молочний</i>	285
Холестерол.....	27, 29, 63, 75, 153, 348	Цукровий <i>діабет</i>	3, 31, 110, 137, 139, 155, 294, 309
Холін.....	130, 204, 231	Цукрометри <i>Ейнгорна, Ласара-Кона, Альтгаузена</i>	304
Холінестераза (<i>визначення активності</i>)..	130	Чашечка <i>нирки</i>	291
Холінестераза.....	132	Чашка <i>Петрі</i>	51, 269, 282, 341
Хондроїтин.....	142, 145, 264	Чашки <i>Конвея</i>	377
Хондроїтинсульфати (<i>ХСТ</i>).....	147	Чума <i>свиней</i>	46, 55
Хроматограф <i>газовий</i>	371	Чума <i>собак</i>	307
Хроматографічний аналіз – (див. <i>Аналіз хроматографічний</i>)		Шар <i>кірковий, мозковий</i>	43, 331
Хромова суміш – (див. <i>Суміш хромова</i>)		Шафа <i>вितяжна</i>	4
Хромоген.....	116, 194, 294, 329	Шафа <i>сушильна</i>	4
Хромосорб.....	370	Швидкість <i>згортання крові</i>	37, 63, 66
Хронічна гематурія – (див. <i>Гематурія великої рогатої худоби</i>)		Шлунково-кишковий <i>канал</i>	178, 286, 291
Хронічна ниркова недостатність (<i>термінальна стадія</i>).....	381	Штучний <i>рубець</i> – (див. <i>Рубець штучний</i>)	
Хронічна ниркова недостатність – (див. <i>Ниркова недостатність</i>)		Щавлевооцтова <i>кислота (ЩОК)</i> – (див. <i>Кислота щавлевооцтова</i>)	
(див. <i>Кайма щіткоподібна</i>)		Щіткоподібна <i>кайма</i> –	

ЛІТЕРАТУРА

1. Апуховская Л.И. Влияние стерина на свойства мембран эритроцитов при экспериментальном рахите / Л.И. Апуховская, С.П. Ивашкевич, В.П. Вендт // Вопросы мед. химии. – 1979. – Т. 24. – № 5. – С. 548–553.

2. Безух В.М. Якість молозива корів і його вплив на неспецифічну резистентність та стан здоров'я телят: Автореф. дис. ... канд. вет. наук: спец. 16.00.01 “Діагностика і терапія тварин” / В.М. Безух. – Біла Церква, 1998. – 17 с.

3. Белицер В.А. Определение ПРФ по задержке полимеризации мономерного фибрина / В.А. Белицер, Т.В. Варецкая, Я.М. Ена // Продукты расщепления фибрина/фибриногена при патологических процессах / Г.Н. Дранник, Я.М. Ена, Т.В. Варецкая. – К. : Здоров'я, 1987. – С. 51–57.

4. Біохімічні методи дослідження крові тварин: Методичні рекомендації / [В.І. Левченко, Ю.М. Новожицька, В.В. Сахнюк та ін.]. – К. : 2004. – 104 с.

5. Біохімічні методи дослідження: лабораторний практикум / Ф.Ф.Боечко, Л.О.Боечко, Н.В.Чепуренко, І.В.Шмиголь. – Черкаси : ЧПУ, 2005. – 312 с.

6. Биохимические методы исследования в клинике ; под ред. А.А. Покровского. – М.: Медицина, 1969. – 652 с.

7. Біохімічні основи нормування мінерального живлення великої рогатої худоби. – Макроелементи / В.В. Влізло, Л.І. Сологуб, В.Г. Янович та ін. // Біологія тварин (наук.-теорет. журнал). – Т. 8. – № 1–2. – Львів, 2006. – С. 19–40.

8. Боровков С.Б. Клініко-біохімічні показники стану сполучної тканини в діагностиці та лікуванні остеодистрофії корів: Автореф. дис. ... канд. вет. наук: спец. 16.00.01 “Діагностика і терапія тварин” / С.Б.Боровков. – Біла Церква, 2006. – 24 с.

9. Братчик А.М. Методы исследования системы фибринолиза // Клинические проблемы фибринолиза / А.М. Братчик, К.Н. Веремеенко. – К. : Здоров'я, 1993. – С. 314–336.

10. Бузлама В.С. Методическое пособие по изучению процессов перекисного окисления липидов и системы антиоксидантной защиты организма животных / В.С. Бузлама. – Воронеж : РАСХН, 1997. – 89 с.

11. Вагнер В.К. Методы и результаты исследования изоферментов (кишечной и печеночной фракций) сывороточной щелочной фосфатазы при острых хирургических заболеваниях органов брюшной полости / В.К. Вагнер, В.М. Путилин, Г.Г. Харабуга // Вопр. мед. химии. – 1981. – 27. – № 6. – С. 752–754.

12. 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.

13. Визначення активності карбоангідрази, вмісту 2,3-дифосфогліцерату і деяких показників червоної крові при рахіті / Л.І. Апуховська, В.П. Вендт, О.М. Лук'янова та ін. // Педіатрія, акушерство і гінекологія. – 1976. – № 5. – С. 28–29.

14. Влізло В.В. Жировий гепатоз у високопродуктивних корів: Автореф. дис. ... д-ра. вет. наук: спец. 16.00.01 “Діагностика і терапія тварин” / В.В. Влізло. – К., 1998. – 24 с.

15. Вітамін D и костная система / [Г.В. Гайко, А.В. Калашников, А.Т. Бруско та ін.]. – К. : Книга плюс, 2008. – 176 с.

16. Вміст ліпідів у мембранах еритроцитів телят / В. Москаленко, В. Левченко, Л. Апуховська, А. Розумнюк // Вісник Білоцерків. держ. аграр. ун-ту. – Вип. 3, Ч. 1. – Біла Церква, 1997. – С. 97–100.

17. Внутрішні хвороби тварин / [В.І. Левченко, І.П. Кондрахін, В.В. Влізло та ін.]. ; за ред. В.І. Левченка. – Ч.2. – Біла Церква, 2001. – 544 с.

18. Вовкотруб Н.В. Нефротичний синдром у високопродуктивних корів і новонароджених телят (патогенез, діагностика і лікування): Автореф. дис. ... канд. вет. наук: спец. 16.00.01 “Діагностика і терапія тварин” / Н.В. Вовкотруб. – Біла Церква, 2005. – 22 с.

19. Гиммерих Ф.И. К определению глутатиона крови / Ф.И. Гиммерих. – Лаб. дело. – 1967. – № 9. – С. 564.

20. Гительзон И.И. Неоднородность эритроцитов и ее значение для исследования качественного состава красной крови / И.И. Гительзон, И.А. Терсков // Красноярск, Ин-т физики АН СССР. – М. : Наука, 1960. – 55 с.

21. Горячковский А.М. Клиническая биохимия / А.М. Горячковский. – Одеса : Экология, 1998. – 608 с.

22. Горячковский А.М. Клиническая биохимия в лабораторной диагностике : справ. пособ. / А.М. Горячковский. – [изд. 3-е]. – Одеса : Экология, 2005. – 616 с.

23. Діагностика, лікування та профілактика внутрішньої патології високопродуктивних корів / В.І. Левченко, О.С. Петренко, Ш.М. Абдуллаєв, В.В. Сахнюк // Здоров'я тварин і ліки. – 2009. – № 1. – С. 12–14.

24. Дослідження сечі : метод. рекомендації. / [В.І. Левченко, М.Я. Тишківський, В.В. Сахнюк та ін.]. – Біла Церква, 2005. – 74 с.

25. Дослідження сечі у коней : метод. рекомендації. / [В.І. Левченко, В.І. Головаха, І.А. Жила та ін.]. – К., 2007. – 39 с.

26. Дослідження вмісту рубця : метод. рекомендації. / [В.І. Левченко, О.В. Чуб, В.В. Сахнюк та ін.]. – Біла Церква, 2005. – 52 с.

27. Дубина Е.Е. Активность и изоферментный спектр СОД эритроцитов / Е.Е. Дубина, Л.Ф. Ефимова // Лаб. дело. – 1983. – № 10. – С. 30–33.

28. Жила І.А. Клініко-функціональна діагностика нефропатії у коней: Автореф. дис. ... канд. вет. наук: спец. 16.00.01 “Діагностика і терапія тварин” / І.А. Жила. – Біла Церква, 2005. – 21 с.

29. Зароза В.Г. Эшерихиозы телят / В.Г. Загроза. – М. : Агропромиздат, 1991. – 240 с.

30. Интернациональная система единиц измерения (СИ) в ветеринарной диагностике / С.П. Гоженко, В.И. Левченко, В.Т. Розумнюк, Л.Д. Сафонова. – Белая Церковь, 1983. – 30 с.

31. Камышников В.С. Справочник по клинико-биохимической лабораторной диагностике : в 2 т. / В.С. Камышников. – Минск : Беларусь, 2000. – Т. 1. – 496 с.

32. Камышников В.С. Справочник по клинико-биохимической лабораторной диагностике : в 2 т. / В.С. Камышников. – Минск : Беларусь, 2000. – Т. 2. – 464 с.

33. Кібкало Д.В. Інформативність біохімічних показників сполучної тканини в диференціальній діагностиці гепатодистрофії і цирозу печінки у корів: Автореф. дис. ... канд. вет. наук: спец. 16.00.01 “Діагностика і терапія тварин” / Д.В. Кібкало. – Біла Церква, 2004. – 20 с.

34. Кібкало Д.В. Перспективи застосування біохімічних показників стану сполучної тканини в діагностиці внутрішніх неінфекційних хвороб / Д.В. Кібкало // Вісник Білоцерків. держ. аграр. ун-ту. – Вип. 56. – Біла Церква, 2008. – С. 75–78.

35. Кількісне визначення фібриногену в плазмі крові людини / В.О. Беліцер, Т.В. Варецька, К.М. Веремеєнко та ін. // Лаб. діагностика. – 1997. – № 2. – С. 53–55.

36. Кислотна резистентність та популяційний склад еритроцитів телят, хворих на бронхопневмонію / В.І. Левченко, А.В. Розумнюк, В.П. Москаленко та ін. // Вісник Білоцерків. держ. аграр. ун-ту. – Вип. 14. – Біла Церква, 2000. – С. 218–222.

37. Клінічна біохімія : навч. посіб. / [О.П. Тимошенко, Л.М. Вороніна, В.М. Кравченко та ін.]. ; за ред. О.П. Тимошенко. – Харків : Золоті сторінки, 2003. – 239 с.

38. Клінічна діагностика внутрішніх хвороб тварин / [В.І. Левченко, В.В. Влізло, І.П. Кондрахін та ін.]. ; за ред. В.І. Левченка. – Біла Церква, 2004. – 607 с.

39. Клиническая лабораторная диагностика в ветеринарии : справ. изд. / [И.П. Кондрахин, Н.В. Курилов, А.Г. Малахов и др.]. – М. : Агропромиздат, 1985. – 287 с.

40. Козловская Л.В. Учебное пособие по клиническим лабораторным методам исследования (с элементами программирования) / Л.В. Козловская, М.А. Мартынова. – М.: Медицина, 1975. – 352 с.

41. Кондрахин И.П. Диагностические коллоидно-осадочные пробы / И.П. Кондрахин // Ветеринария. – 2004. – № 9. – С. 53–55.

42. Кондрахин И.П. Послеродовая гипокальциемия коров / И.П. Кондрахин, И.Ф. Гаджаев, В.А. Мухина // Сб. науч. трудов Моск. вет. акад. – М., 1986. – С. 59–62.

43. Кондрахин І.П. Методика визначення кетонів у крові / І.П. Кондрахин, І.В. Сенчук // Вет. медицина України. – 2008. – № 12. – С. 35–36.

44. Корабейникова С.Н. Модификация определения ПОЛ в реакции с ТБК / С.Н. Корабейникова // Лаб. дело. – 1989. – № 7. – С. 8–9.

45. Кроткова А.П. Определение летучих жирных кислот в содержимом рубца у жвачных животных / А.П. Кроткова, Н.И. Митин // Вестник с.-х. науки. – 1957. – № 10. – С. 13–17.

46. Кругликов Г.О. Глутатионпероксидазная и глутатионредуктазная активность печени крыс после введения селенита натрия / Г.О. Кругликов, И.М. Штутман // Укр. биохим. журнал. – 1976. – № 2. – С. 203–207.

47. Кугенев П.В. Практикум по молочному делу / П.В. Кугенев, М.В. Барабанщиков. – М.: Колос, 1978. – 240 с.

48. Курилов Н.В. Физиология и биохимия пищеварения жвачных / Н.В. Курилов, А.П. Кроткова. – М.: Колос, 1971. – 293 с.

49. Лабораторные исследования в ветеринарной клинической диагностике / П.С. Ионов, В.Г. Мухин, А.И. Федоров, И.Г. Шарабрин. – М.: Сельхозгиз, 1952. – 186 с.

50. Лабораторные исследования в ветеринарии: биохимические и микологические: Справочник / [Б.И. Антонов, Т.Ф. Яковлева, В.И. Дерябина и др.] ; под ред. Б.И. Антонова. – М. : Агропромиздат, 1991. – 287 с.

51. 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.

52. Левченко В.І. Діагностика ранніх форм D-гіповітамінозу в телят за вмістом фосфору і 2,3-дифосфогліцерату в еритроцитах / В.І. Левченко, Л.А. Тихонюк, Л.І. Апуховська // Вісник с.-г. науки. – 1981. – № 9. – С. 73–76.

53. Левченко В.И. Методические рекомендации по ранней диагностике и профилактике D-гиповитаминоза молодняка крупного

рогатого скота при выращивании и откорме в специализированных хозяйствах УССР / В.И. Левченко, Л.А. Тыхонюк. – К., 1984. – 20 с.

54. Левченко В.И. К методике определения витамина А и каротина в печени / В.И. Левченко, Г.А. Щуревич // Пути совершенствования науч.-технического прогресса в с.-х. производстве: Тезисы науч.-техн. конф. (25–26 мая 1985 г., г Одесса). – Одесса, 1985. – С. 29.

55. Левченко В.І. Визначення вітаміну А і каротиноїдів за допомогою колориметрів (КФК-2, КФК-3) / В.І. Левченко, В.В. Сахнюк, Г.О. Щуревич // Вісник Білоцерків. держ. аграр. ун-ту. – Вип. 4, ч. 1. – Біла Церква, 1998. – С. 77–79.

56. Левченко В.І. Структурно-функціональні властивості еритроцитів у телят, хворих на анемію / В.І. Левченко, В.П. Москаленко // Вісник Білоцерків. держ. аграр. ун-ту. – Вип. 8, ч. 1. – Біла Церква, 1999. – С. 140–145.

57. Левченко В.І. Зміна структури і функцій еритроцитів венозної та артеріальної крові телят, хворих на бронхопневмонію / В.І. Левченко, А.В. Розумнюк, О.Д. Таджієва // Наук.-техн. бюлетень Ін-ту біології тварин УААН. – Вип. 1–2. – Львів, 2001. – С. 315–319.

58. Левченко В.І. Удосконалення біохімічного тесту прогнозування перебігу бронхопневмонії телят / В.І. Левченко, А.В. Розумнюк // Вісник Білоцерків. держ. аграр. ун-ту. – Вип. 29. – Біла Церква, 2004. – С. 113–117.

59. Левченко В.І. Патогенез і профілактика післяродової гіпокальціємії у корів / В.І. Левченко, А.С. Петренко // Біологія тварин (наук.-теорет. журнал). – Т. 10. – № 1–2. – Львів, 2008. – С. 49–63.

60. Методы ветеринарной клинической лабораторной диагностики: Справочник / [И.П. Кондрахин, А.В. Архипов, В.И. Левченко и др.]. – М. : КолосС, 2004 – 520 с.

61. Мельник А.Ю. Клініко-біохімічне обґрунтування методів діагностики та профілактики порушень фосфорно-кальцієвого і D-вітамінного обмінів у курей-несучок: Автореф. дис. ... канд. вет. наук: спец. 16.00.01 “Діагностика і терапія тварин” / А.Ю. Мельник. – Біла Церква, 2008. – 22 с.

62. Методы определения активности каталазы / М.А. Королюк, Л.И. Иванова, И.Г. Майорова, В.Е. Токарев // Лаб. дело. – 1988. – № 1. – С. 16–19.

63. Методичні вказівки щодо використання методів біохімічних досліджень біологічного матеріалу в державних лабораторіях ветеринарної медицини при діагностиці захворювань неінфекційної етіології / [В.І. Левченко, М.С. Павленко, Ю.М. Новожицька та ін.]. – К., 2000. – 85 с.

64. Микрометод ускоренного определения концентрации аммиака в рубцовой жидкости / Г.И. Калачнюк, О.Г. Совка, Я. Копчены и др. // Науч.-техн. бюл. УНИИФиБ с.-х. животных. – 1981. – Вып. 3 (3). – С. 24–25.

65. Морозенко Д.В. Хронічна ниркова недостатність домашніх котів (патогенез, діагностика і лікування): Автореф. дис. ... канд. вет. наук: спец. 16.00.01 “Діагностика і терапія тварин” / Д.В. Морозенко. – Біла Церква, 2008. – 22 с.

66. Москаленко В.П. Вікова динаміка вмісту 2,3-ДФГ в еритроцитах телят / В.П. Москаленко // Вісник Білоцерків. держ. аграр. ун-ту. – Біла Церква, 1997. – Вип. 2. – Ч. 1. – С. 66–68.

67. Москаленко В.П. Структурно-функціональні властивості еритроцитів у здорових і хворих на анемію телят та їх зміни при лікуванні: Автореф. дис. ... канд. вет. наук: спец. 16.00.01 “Діагностика і терапія тварин” / В.П. Москаленко. – Біла Церква, 1999. – 18 с.

68. Николадзе М.Г. Диагностика и профилактика алиментарной анемии и иммун-ной недостаточности у поросят: Автореф. дис. ... канд. вет. наук: спец. 16.00.01 “Диагностика и терапия животных” / М.Г. Николадзе. – Витебск, 2002. – 18 с.

69. Омельченко Л.І. Дослідження ліпідного складу мембран, вмісту 2,3-дифосфо-гліцерату і неорганічного фосфору в еритроцитах у дітей з рахітом /Л.І. Омельченко, Л.І. Апуховська, С.П. Івашкевич // Педіатрія, акушерство і гінекологія. – 1980. – № 2. С. 20–22.

70. Определение растворимого фибрина в плазме крови / Т.В. Варецкая, Л.И. Ми-хайловская, Л.А. Свитальская и др. //Клинич. лабор. диагностика. – 1992. – № 7–8. – С. 10–14.

71. Перекисное окисление липидов и эндогенная интоксикация у животных / [С.С. Абрамов, А.А. Белко, А.А. Мацинович и др.]. – Витебск : УОВГАВМ, 2006. – 208 с.

72. Піддубняк О.В. Порівняльна характеристика показників еритроцитопоезу в коней / О.В. Піддубняк, В.І. Головаха // Вісник Білоцерків. держ. аграр. ун-ту. – Вип. 56. – Біла Церква, 2008. – С. 135–139.

73. Піддубняк О.В. Еритроцитопоез у коней за латентного перебігу нефропатії / О.В. Піддубняк, В.І. Головаха //Вісник Білоцерків. держ. аграр. ун-ту. – Вип. 56. – Біла Церква, 2008. – С. 132–135.

74. Постников В.С. Коллоидно-осадочная реакция крови для определения нарушения белковообразовательной функции печени / В.С. Постников // Профилактика и лечение незаразных болезней с.-х. животных. – М., 1964. – С. 139–140.

75. Рапопорт Ж.Ж. Модификация неферментативного определения 2,3-дифосфо-глицерата в эритроцитах / Ж.Ж. Рапопорт, Л.А. Михайлова // Лаб. дело. – 1978. – № 11. – С. 661–663.

76. Розумнюк А.В. Структура і функціональні властивості еритроцитів та їх зміни при лікуванні телят, хворих на бронхопневмонію: Автореф. дис. ... канд. вет. наук: спец. 16.00.01 “Діагностика і терапія тварин” / А.В. Розумнюк. – Біла Церква, 2002. – 18 с.

77. Рубленко М.В. Методи визначення показників гемостазу у тварин : метод. рекомендації / М.В. Рубленко, С.А. Власенко, А.В. Яремчук. – Біла Церква, 2007. – 16 с.

78. Сазонтова Т.Г. Значение баланса прооксидантов и антиоксидантов – равно-значных участников метаболизма / Т.Г. Сазонтова, Ю.В. Архипенко // Патолог. физиология и эксперим. терапия. – М. : Медицина, 2007. – № 3. – С. 2–18.

79. Сизова И.А. Безаппаратурный способ фракционирования красных клеток крови в градиенте плотности сахарозы / И.А. Сизова, В.В. Каменская, В.И. Феденков // Изв. Сиб. отд. АН СССР – 1980. – Вып. 3. – № 15. – С. 119–122.

80. Симонян Г.А. Ветеринарная гематология / Г.А. Симонян, Ф.Ф. Хисамутдинов. – М. : Колос, 1995. – С. 53–89.

81. Слівінська Л.Г. Методичні рекомендації до лабораторно-практичних занять з дослідження сечової системи та сечі у дрібних домашніх тварин / Л.Г. Слівінська. – Львів, 2003. – 72 с.

82. Слуцкий Л.И. Биохимия нормальной и патологически измененной соединительной ткани / Л.И. Слуцкий. – Л. : Медицина, 1969. – 375 с.

83. Современные представления о системе гемостаза / [Г.Л. Волков, Т.Н. Платонова, А.Н. Савчук и др.]. – К. : Наукова думка, 2005. – 296 с.

84. Способ определения гликозаминогликанов в сыворотке крови: А. с. 960626 СССР, М.кл.³. G 01 № 133148. / М.Р. Штерн, О.П. Тимошенко, Ф.С. Леонтьева, Г.Ф. Ключева (СССР). – № 2998857128–13; Заявл. 23.10.80; Опубл. 23.09.82, Бюл. № 35. – С. 163.

85. Справочник по лабораторным методам исследования ; под ред. Л.А. Даниловой. – СПб. : Питер, 2003. – С. 398–399.

86. Стальная И.Д. Метод определения диеновой конъюгации ненасыщенных высших жирных кислот / И.Д. Стальная // Современные методы в биохимии. – М., 1977. – С. 63–64.

87. Терсков И.А. Метод химических (кислотных) эритрограмм) / И.А. Терсков, И.И. Гительзон // Биофизика – 1960. – № 12. – С. 259–263.

88. Титов В.Н. Клиническая лабораторная диагностика / В.Н. Титов, Т.Г. Творогова. – 1995. – № 3. – С. 15–18.

89. Тишківська Н.В. Порівняльна інформативність різних методів діагностики D-гіповітамінозу у молодняку на відгодівлі / Н.В. Тишківська // Вісник Білоцерків. держ. аграр. ун-ту. – Біла Церква. – 2008. — Вип. 56. С. 171–177.

90. Фізіолого-біохімічні методи досліджень у біології, тваринництві та ветеринарній медицині : довідник / [Л.В. Андреева, П.І. Вербицький, О.І. Віщур та ін.]. – Львів, 2004. – 399 с.

91. Чуб О.В. Вторинна дистонія рубця у високопродуктивних корів (патогенез і лікування): Автореф. дис. ... канд. вет. наук: спец. 16.00.01 “Діагностика і терапія тварин” / О.В. Чуб. – Біла Церква, 2002. – 16 с.

92. Штейнберг О.П. Определение гликопротеидов в сыворотке крови / О.П. Штейнберг, Я.Н. Доценко // Врачебное дело. 1962. – № 12. – С. 43–45.

93. Эммануэль В.Л. Клиническая лабораторная диагностика / В.Л. Эммануэль. – К., 1997. – № 10. – С. 25–34.

94. Энциклопедия клинических лабораторных тестов ; под ред. Н.У. Тица. – М. : Лабинформ, 1997. – С. 570–571.

95. Ющенко Г.О. Сечокам'яна хвороба домашніх кішок (патогенез, діагностика та лікування): Автореф. дис. ... канд. вет. наук: спец. 16.00.01 “Діагностика і терапія тварин” / Г.О. Ющенко. – Біла Церква, 2005. – 20 с.

96. Янович В.Г. Біологічні основи трансформації поживних речовин у жуйних тварин / В.Г. Янович, Л.І. Сологуб. – Львів, 2000. – 384 с.

97. Astrup T. The fibrin plate method for estimating fibrinolytic activity / T. Astrup, S. Müllertz // Arch. Biochem. Biophys. – 1952. – Vol. 40. – P. 346–351.

98. Dodge J.T. The preparation and chemical characteristics of hemoglobin – free ghosts of human erythrocytes / J.T. Dodge, C.F. Mitchell, D.C. Hanahan // Arch. Biochem. and Biophys. – 1963. – Vol. 100, № 1. – P. 119–123.

99. Dyce B.J. Phospholipids in membranes / B.J. Dyce, S.P. Bessman // Arch. Environ Health. – 1973. – Vol. 27. – P. 205–207.

100. Dyce B.J. A rapid nonenzymatic assay for 2,3-DPG in multiple specimens of blood / B.J. Dyce, S.P. Bessman // Arch. Environ health. – 1973. – Vol. 27, Aug. – P. 112–115.

101. Johnson and Ellison Evaluation of a commercially available kit for the colorimetric determination of zinc // International journal of Andrology. – 1987. – April 10 (2). – P. 435–440.

102. Kurnik B.R. Mechanism of stimulator of renal phosphate transport by 1,25-dihydroxycholecalciferol / B.R. Kurnik, K.A. Hrusko // Biochim. Biophys. Acta. 1985. – Vol. 817, № 1. – P. 42–50.

103. Review of the concept of vitamin D “Sufficiency und insufficiency” / A.C. Gomez, D.M. Naves, G.M. Rodriguez et al. // Nefrologia. – 2003. – Vol. 23, № 2. – P. 73–77.

ЗМІСТ

ВСТУП.....	3
Розділ 1. ОРГАНІЗАЦІЯ РОБОТИ БІОХІМІЧНОЇ ЛАБОРАТОРІЇ	5
1.1. Приміщення лабораторії	5
1.2. Підготовка лабораторного посуду до аналізів.....	6
1.3. Хімічні реактиви.....	8
1.4. Приготування і зберігання точних розчинів.....	10
1.5. Контроль якості біохімічних досліджень.....	15
1.6. Основна апаратура в лабораторній клінічній діагностиці	19
1.7. Автоматичні прилади відбору і дозування рідини.....	24
Розділ 2. ОБ'ЄКТИ ДОСЛІДЖЕНЬ КЛІНІЧНОЇ ЛАБОРАТОРНОЇ ДІАГНОСТИКИ.....	27
Розділ 3. МІЖНАРОДНА СИСТЕМА ОДИНИЦЬ ВИМІРЮВАННЯ	33
Розділ 4. ЗАГАЛЬНИЙ КЛІНІЧНИЙ АНАЛІЗ КРОВІ	37
4.1. Визначення вмісту гемоглобіну	37
4.2. Підрахунок кількості еритроцитів	40
4.3. Визначення індексів “червоної крові”	43
4.4. Підрахунок кількості лейкоцитів	44
4.5. Підрахунок кількості клітин крові у птиці	47
4.6. Виведення лейкограми	47
4.7. Гематологічний профіль	56
4.8. Зміни морфологічної структури еритроцитів і лейкоцитів.....	59
4.9. Підрахунок кількості тромбоцитів.....	60
4.10. Визначення відносної густини крові	61
4.11. Визначення швидкості осідання еритроцитів (ШОЕ)	63
4.12. Визначення гематокритної величини.....	64
4.13. Визначення швидкості згортання крові	66
4.14. Визначення ретракції кров'яного згустку	67
4.15. Визначення осмотичної резистентності еритроцитів	67
4.16. Визначення кислотної резистентності еритроцитів (за Гітельзоном І.І., Терських І.А. у модифікації Москаленка В.П.).....	68
4.17. Визначення популяційного (вікового) складу еритроцитів у тварин (за методом Сизової І. зі співавт., 1980)	70
4.18. Визначення білка та ліпідних компонентів у мембранах еритроцитів	71
4.18.1. Визначення білка в мембранах еритроцитів за Лоурі	73
4.18.2. Визначення сумарних фосфоліпідів у мембранах еритроцитів	74
4.18.3. Визначення загальних ліпідів у мембранах еритроцитів	75
4.18.4. Визначення холестеролу у мембранах еритроцитів	75
4.19. Визначення фосфору і 2,3-дифосфогліцерату в еритроцитах (за Дусе у модифікації Апуховської Л.І.).....	76
4.19.1. Визначення неорганічного фосфору.....	77
4.19.2. Визначення загального фосфору	78
Розділ 5. ДОСЛІДЖЕННЯ КИСЛОТНО-ОСНОВНОГО БАЛАНСУ КРОВІ.....	80
5.1. Визначення лужного резерву крові дифузійним методом у здвоєних колбах (за Кондрахіним І.П.).....	80
Розділ 6. МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ ОБМІНУ БІЛКІВ.....	84
6.1. Визначення загального білка в сироватці крові рефрактометричним методом	84
6.2. Визначення загального білка в сироватці крові за біуретовою реакцією.....	85
6.3. Визначення білкових фракцій у сироватці крові.....	88

6.3.1. Визначення білкових фракцій сироватки крові нефелометричним (турбідиметричним) методом	89
6.3.2. Визначення альбуміну в сироватці крові	91
6.4. Визначення загальної кількості імуноглобулінів	92
6.4.1. Визначення загальної кількості імуноглобулінів у сироватці крові за реакцією з натрію сульфідом	93
6.4.2. Визначення вмісту імуноглобулінів у сироватці крові за реакцією з цинку сульфатом (цинк-сульфатний тест – ЦСТ)	94
6.5. Колоїдно-осадові проби	95
6.6. Визначення залишкового азоту колориметричним методом	105
6.7. Визначення сечовини в сироватці крові (за реакцією з діацетилмонооксимом)	107
6.8. Визначення сечовини у сироватці крові та сечі (за методом Марш)	109
6.9. Визначення сечової кислоти в сироватці крові	111
6.10. Визначення креатиніну (за колірною реакцією Яффе)	113
6.11. Визначення креатиніну в сироватці крові (метод Поппера)	115
6.12. Визначення молекул середньої маси (СМ)	115
Розділ 7. МЕТОДИ ВИЗНАЧЕННЯ АКТИВНОСТІ ФЕРМЕНТІВ	117
7.1. Визначення активності аланінамінотрансферази (АлАТ) і аспартат-амінотрансферази (АсАТ) (за методом Райтмана-Френкеля)	117
7.2. Визначення активності гамма-глутамілтранспептидази (ГГТП) у сироватці крові	119
7.3. Визначення α -амілази (за методом Каравея)	121
7.4. Визначення активності лужної фосфатази в сироватці крові (за Боданські)	123
7.5. Визначення активності лужної фосфатази (Вагнер В.К., Путилін М.В., Харабуга Г.Г.)	126
7.5.1. Визначення активності термостабільної лужної фосфатази	127
7.5.2. Визначення активності кишкового ізоферменту лужної фосфатази	127
7.6. Визначення активності лактатдегідрогенази в сироватці крові (за методом Севела, Товарека)	129
7.7. Визначення активності загальної креатинкінази (КК-НАС)	132
7.8. Визначення активності серцевого ізоферменту креатинкінази (КК-МВ)	133
7.9. Визначення активності холінестерази	134
Розділ 8. МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ ОБМІНУ ВУГЛЕВОДІВ	137
8.1. Визначення глюкози за колірною реакцією з ортолуїдином	137
8.2. Визначення глюкози у плазмі крові глюкозо-оксидазним методом	139
8.3. Визначення піровиноградної кислоти в крові (модифікований метод Умбрайта)	142
8.4. Визначення вмісту молочної кислоти в крові (за методом Балаховського І.С. і Наточина Ю.В., 1973)	143
8.5. Визначення вмісту глікопротеїнів і протеогліканів сполучної тканини	145
8.5.1. Визначення вмісту глікопротеїнів у сироватці крові (за методом Штейнберга-Доценка)	147
8.5.2. Визначення сілових кислот у сироватці крові (за методом Гесса)	148
8.5.3. Визначення вмісту хондроїтинсульфатів у сироватці крові (метод Nemeth-Csoka)	150
8.5.4. Визначення вмісту фракцій глікозаміногліканів (ГАГ) у сироватці крові (за Штерн М.П. зі співавторами)	150

Розділ 9. МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ ОБМІНУ ЛІПІДІВ	153
9.1. Визначення загальних ліпідів у сироватці крові (за реакцією з сульфофосфоганліновим реактивом)	154
9.2. Визначення триацилгліцеролів у сироватці крові (метод Флетчера)	155
9.3. Визначення β -ліпопротеїдів у сироватці крові (за методом Бурштейна і Самай)	156
9.4. Визначення загального холестеролу	158
9.4.1. Визначення загального холестеролу (за методом Златкіса-Зака)	158
9.4.2. Визначення загального холестеролу (за методом Ілька)	159
9.5. Визначення вмісту ефірозв'язаного холестеролу (за методом Балаховського)	161
9.6. Експрес-метод визначення кетонових тіл у сироватці (плазмі) крові	162
9.7. Визначення кетонових тіл у крові йодометричним методом	163
9.7.1. Визначення загальної кількості кетонових тіл	164
9.7.2. Визначення ацетону і ацетооцтової кислоти	165
9.7.3. Визначення бета-оксимасляної кислоти	165
9.8. Дифузійний метод визначення кетонових тіл у крові	167
9.8.1. Визначення ацетону й ацетооцтової кислоти у центрифугаті крові	169
9.8.2. Визначення загальної кількості кетонових тіл	170
9.9. Методи визначення продуктів пероксидного окиснення ліпідів	172
9.9.1. Визначення малонового діальдегіду в крові	174
9.9.2. Визначення малонового діальдегіду в сироватці крові	175
9.9.3. Визначення малонового діальдегіду в реакції з тіобарбітуровою кислотою в сироватці крові	175
9.9.4. Визначення дієнових кон'югатів (ДК) і кетодієнів (КД) поліненасичених жирних кислот у крові	176
9.9.5. Визначення дієнових кон'югатів і кетодієнів за УФ-поглинанням гептанових та ізопропанолових екстрактів	178
9.9.6. Визначення перекисного гемолізу еритроцитів	179
9.9.7. Визначення флуоресценційних основ Шіффа	179
9.10. Дослідження показників антиоксидантного стану	181
9.10.1. Визначення загальної антиоксидантної активності плазми або еритроцитів (ЗАА)	182
9.10.2. Визначення активності супероксиддисмутази	183
9.10.3. Визначення активності супероксиддисмутази еритроцитів (СОД)	183
9.10.4. Визначення активності каталази еритроцитів	185
9.10.5. Визначення активності каталази в крові	186
9.10.6. Визначення активності пероксидази у крові	187
9.10.7. Визначення активності глутатіонпероксидази	189
9.10.8. Визначення активності глутатіонредуктази в крові	191
9.10.9. Визначення відновленого глутатіону (GSH) у крові	193
9.10.10. Визначення відновленого глутатіону в еритроцитах крові (метод Батлера—Дюбона—Келлі)	194
Розділ 10. МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ ОБМІНУ МАКРО- І МІКРОЕЛЕМЕНТІВ	196
10.1. Визначення загального кальцію в реакції з кальційарсеназо III	196
10.2. Визначення вмісту загального, ультрафільтрувального, іонізованого та білокзв'язаного кальцію в сироватці крові	198
10.2.1. Визначення вмісту загального кальцію	199
10.2.2. Визначення вмісту білокзв'язаного кальцію в сироватці крові	200
10.2.3. Визначення вмісту іонізованого кальцію в сироватці крові	200

10.3	Визначення загального кальцію (за реакцією з о-крезол-фталеїнкомплексом)	202
10.4.	Визначення загального кальцію у сироватці крові трилонометричним методом	203
10.5.	Визначення неорганічного фосфору.....	204
10.5.1.	Визначення неорганічного фосфору в сироватці (плазмі) крові (за методом Пулса у модифікації Коромислова В.Ф. і Кудрявцевої Л.А.)	204
10.5.2.	Визначення вмісту неорганічного фосфору в сироватці крові (за методом УФ-детекції фосфомолібдатного комплексу)	206
10.6.	Визначення магнію в сироватці крові	208
10.6.1.	Визначення магнію в сироватці крові (з індикатором кальмагітом).....	208
10.6.2.	Визначення магнію в сироватці крові (за реакцією з титановим жовтим).....	209
10.6.3.	Визначення магнію в сироватці крові за кольоровою реакцією з титановим жовтим (метод Кункеля в модифікації Петрухіна І.В.).....	211
10.6.4.	Визначення магнію методом атомно-абсорбційної спектрофотометрії	213
10.7.	Визначення хлоридів у сироватці крові	213
10.8.	Визначення натрію у крові	215
10.8.1.	Визначення натрію в сироватці крові.....	215
10.8.2.	Визначення натрію методом атомно-абсорбційної спектрофотометрії.....	217
10.9.	Визначення калію в крові.....	218
10.9.1.	Визначення калію в сироватці (плазмі) крові.....	218
10.9.2.	Визначення калію методом атомно-абсорбційної спектрофотометрії	220
10.10.	Визначення феруму (заліза) в сироватці крові.....	222
10.10.1.	Визначення феруму в сироватці крові (за реакцією з бета-фенантроліном)	222
10.10.2.	Визначення феруму в сироватці крові (за реакцією з ферозином)	223
10.10.3.	Визначення феруму методом атомно-абсорбційної спектрофотометрії	225
10.10.4.	Визначення загальної ферумозв'язувальної здатності сироватки крові (ЗФЗЗ)	227
10.11.	Визначення купруму (міді).....	229
10.11.1.	Визначення купруму (міді) в сироватці крові (за реакцією з бетакупріоном)	230
10.11.2.	Визначення купруму (міді) (за реакцією з батокупреїном)	231
10.11.3.	Визначення купруму (міді) в сироватці крові (за методом Шмідта)	232
10.11.4.	Визначення купруму (міді) методом атомно-абсорбційної спектрофотометрії	233
10.11.5.	Визначення активності церулоплазміну в сироватці крові (метод Ревіна у модифікації Бестужева С.В. і Колб В.Г.).....	235
10.12.	Визначення цинку	236
10.12.1.	Визначення цинку спектрофотометричним методом.....	237
10.12.2.	Визначення цинку методом атомно-абсорбційної спектрофотометрії	238

Розділ 11. ДОСЛІДЖЕННЯ ОБМІНУ ВІТАМІНІВ.....	239
11.1. Визначення каротину в сироватці крові фотометричним методом.....	239
11.2. Визначення вітаміну А і каротину в сироватці крові, молозиві, жовтку яєць та печінці (за методом Бессей О. в модифікації Левченка В.І. зі співавт., 1998).....	240
11.3. Визначення вмісту 25ОНD ₃ імуноферментним методом.....	243
11.4. Визначення активного метаболіту вітаміну D ₃ в сироватці (плазмі) крові.....	247
11.5. Визначення вітаміну Е у біологічному матеріалі	253
11.5.1. Визначення вітаміну Е в сироватці крові	255
11.5.2. Визначення вітаміну Е у печінці і жовтках яєць.....	256
11.5.3. Визначення вітаміну Е в молоці (молозиві).....	257
11.5.4. Експрес-метод визначення вітамінів А і Е в плазмі крові.....	258
11.6. Визначення вітаміну В ₂ в яйцях	259
11.6.1. Визначення вітаміну В ₂ у білку	260
11.6.2. Визначення вітаміну В ₂ у жовтку	260
11.7. Визначення аскорбінової кислоти у плазмі (за реакцією з 2,2-дипіридиллом)	261
Розділ 12. ДОСЛІДЖЕННЯ ПІГМЕНТНОГО ОБМІНУ.....	263
12.1. Визначення білірубіну в сироватці крові (за методом Ієндрашика, Клеггорна і Грофа у модифікації Левченка В.І., Влізла В.В., 1988)	264
12.2. Визначення білірубіну (за методом Ієндрашика, Клеггорна і Грофа)	267
12.3. Визначення концентрації метгемоглобіну (геміглобіну) у крові (метод Горячковського А.М., Моїсеєвої К.В., 1989)	269
Розділ 13. ДОСЛІДЖЕННЯ ГЕМОСТАЗУ	271
13.1. Короткі відомості про фізіологію системи гемостазу	272
13.2. Лабораторний посуд та його підготовка до гемостазологічних досліджень.....	277
13.3. Забір крові та отримання плазми	278
13.4. Визначення адгезивно-агрегаційної активності тромбоцитів (кількісний метод із використанням ФЕК за М.А. Howard)	279
13.5. Визначення концентрації фібриногену в плазмі крові (Беліцер В.О., Варецька Т.В., Веремеєнко К.М. та ін., 1997)	281
13.6. Визначення продуктів розщеплення фібриногену/фібрину (ПРФ) методом затримки полімеризації мономерного фібрину (Беліцер В.О., Варецька Т.В., Єна Я.М., 1987).....	282
13.7. Визначення розчинного фібрину (РФ) шляхом осадження за допомогою фосфатного буфера (Варецька Т.В., Михайловська Л.І., Світальська Л.О., Єна Я.М., 1992).....	284
13.8. Визначення тромбінового часу (ТЧ) (за уніфікованим методом)	285
13.9. Визначення протромбінового часу (ПЧ) (за уніфікованим методом)	286
13.10. Визначення активності фактора XIII (за уніфікованим методом)	287
13.11. Визначення антитромбіну III у плазмі (за уніфікованим методом, набором Simko-LTD, Україна).....	288
13.12. Визначення активності системи протеїну С плазми крові	289
13.13. Визначення фібринолітичної активності плазми (метод фібринових пластин за Аструп)	291
Розділ 14. ДОСЛІДЖЕННЯ МОЛОЗИВА.....	293
14.1. Визначення відносної густини молозива.....	293
14.2. Визначення кислотності молозива.....	294
14.3. Отримання сироватки молозива.....	296

14.4. Визначення загальної кількості імуноглобулінів у сироватці молозива	296
14.5. Визначення вмісту загального білка у сироватці молозива	298
14.6. Визначення в молозиві (молоці) кетонівих тіл	299
Розділ 15. ДОСЛІДЖЕННЯ СЕЧІ	300
15.1. Одержання та зберігання сечі.....	301
15.2. Фізичні властивості сечі	302
Розділ 16. ХІМІЧНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ СЕЧІ.....	307
16.1. Визначення білка в сечі.....	307
16.1.1. Якісні реакції на білок у сечі	307
16.1.2. Кількісне визначення білка в сечі.....	308
16.1.3. Діагностичне значення протеїнурії	310
16.2. Визначення вмісту глюкози в сечі.....	311
16.2.1. Якісні реакції визначення глюкози в сечі.....	312
16.2.2. Кількісне визначення цукрів у сечі.....	313
16.3. Визначення кетонівих тіл у сечі	316
16.4. Визначення білірубину в сечі.....	317
16.5. Визначення уробіліногену і уробіліну та жовчних кислот у сечі	319
16.6. Визначення вмісту крові і кров'яних пігментів у сечі	321
16.6.1. Якісні реакції на кров	322
16.6.2. Визначення вмісту гемоглобіну в сечі	323
16.7. Визначення продуктів залишкового азоту в сечі.....	325
16.7.1. Визначення залишкового азоту в сечі колориметричним методом із реактивом Неслера	325
16.7.2. Визначення сечовини в сечі (за колірною реакцією з діацетилмонооксимом)	327
16.7.3. Визначення сечовини в сечі (за методом Марш).....	328
16.7.4. Визначення креатиніну в сечі (за колірною реакцією Яффе)	330
16.7.5. Визначення індикану в сечі	333
16.8. Визначення макроелементів у сечі.....	334
16.8.1. Визначення хлоридів у сечі (за Фольгардом).....	334
16.8.2. Визначення хлоридів у сечі наборами реактивів.....	336
16.8.3. Визначення кальцію в сечі	337
16.9. Визначення ферментів у сечі	339
16.9.1. Визначення активності гамма-глутамілтранспептидази в сечі	340
16.9.2. Визначення α -амілази (за методом Каравея).....	343
16.9.3. Визначення активності лужної фосфатази в сечі.....	344
Розділ 17. ОСОБЛИВОСТІ ОДЕРЖАННЯ І ДОСЛІДЖЕННЯ СЕЧІ В КОНЕЙ.....	347
Розділ 18. ДОСЛІДЖЕННЯ ОСАДУ СЕЧІ.....	351
18.1. Організовані компоненти осаду сечі	351
18.2. Неорганізовані компоненти осаду сечі	355
Розділ 19. ДОСЛІДЖЕННЯ ВМІСТУ РУБЦЯ.....	359
19.1. Методи відбору вмісту рубця	359
19.2. Органолептичне дослідження вмісту рубця.....	362
19.3. Визначення реакції та величини рН вмісту рубця	364
Розділ 20. ВИЗНАЧЕННЯ ФУНКЦІОНАЛЬНОЇ АКТИВНОСТІ МІКРОФЛОРИ РУБЦЯ.....	367
20.1. Проба з метиленовим синім (за G. Dirksen)	367
20.2. Проба зі зброджуванням глюкози	368

20.3. Проба з відновленням нітритів.....	368
20.4. Визначення целюлазної активності мікрофлори	369
20.5. Визначення амілазної активності мікроорганізмів вмісту рубця (за методом Коравця).....	370
20.6. Визначення активності α -амілази (за методом Каравея).....	371
20.7. Визначення протеолітичної активності вмісту рубця.....	373
20.8. Визначення ліполітичної активності вмісту рубця	376
Розділ 21. ХІМІЧНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ ВМІСТУ РУБЦЯ.....	378
21.1. Визначення загальної кислотності вмісту рубця.....	378
21.2. Визначення загальної кількості летких жирних кислот (ЛЖК).....	379
21.3. Хроматографічний аналіз летких жирних кислот.....	381
21.4. Визначення концентрації молочної кислоти	384
21.5. Визначення загального азоту в рідині рубця	384
21.6. Визначення небілкового (залишкового) і білкового азоту в рідині рубця.....	386
21.7. Визначення аміаку (амонійного азоту) з реактивом Неслера.....	387
21.8. Визначення аміаку мікродифузійним методом.....	387
21.9. Визначення нітритів у вмісті рубця	390
Розділ 22. МІКРОСКОПІЧНІ МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ ВМІСТУ РУБЦЯ	392
22.1. Методика підрахунку мікроорганізмів у вмісті рубця	392
22.2. Підрахунок загальної кількості інфузорій	394
22.3. Підрахунок кількості бактерій.....	395
ДОДАТКИ.....	397
ПРЕДМЕТНИЙ ПОКАЖЧИК	416
ЛІТЕРАТУРА.....	422

Навчальне видання

Левченко Володимир Іванович,
Головаха Володимир Іванович,
Кондрахін Іван Петрович,
Рубленко Михайло Васильович,
Цвіліховський Микола Іванович,
Апуховська Лариса Іванівна,
Безух Василь Михайлович,
Вовкотруб Наталія Володимирівна,
Кібкало Дмитро Вікторович
Москаленко Валерій Петрович,
Розумнюк Андрій Вікторович,
Сахнюк Володимир Володимирович,
Слівінська Любов Григорівна,
Тишківський Михайло Ярославович,
Чуб Олександр Васильович

МЕТОДИ ЛАБОРАТОРНОЇ КЛІНІЧНОЇ ДІАГНОСТИКИ ХВОРОБ ТВАРИН

Навчальний посібник

Редагування	Л.М. Талюта Н.В. Крошко
Макетування	І.О. Серова

Підписано до друку 25.10.2010. Формат 60×84/16.
Папір офсет. № 1. Гарнітура Times New Roman. Друк офс.
Наклад 1000 примірників, Зам. № 147

Редакційно-видавничий відділ
Науково-методичного центру аграрної освіти
Київ-151, вул. Смілянська, 11
Тел. 249-94-04

Фірма «Інтас»