

МИНИСТЕРСТВО СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА РФ

ФГОУ ВПО «БРЯНСКАЯ ГОСУДАРСТВЕННАЯ
СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННАЯ АКАДЕМИЯ»

Кафедра нормальной и патологической морфологии и физиологии животных

КЛИНИЧЕСКАЯ БИОХИМИЯ

МЕТОДИЧЕСКОЕ УКАЗАНИЕ К ЛАБОРАТОРНО-ПРАКТИЧЕСКИМ ЗАНЯТИЯМ
ДЛЯ СТУДЕНТОВ ФАКУЛЬТЕТА ВЕТЕРИНАРНОЙ МЕДИЦИНЫ И БИОТЕХНОЛОГИИ
ПО СПЕЦИАЛЬНОСТИ 310800-«Ветеринария»

Брянск — 2009 г

УДК 636.02 (07)

ББК 28.672

К 47

Методическое указание составлено доктором биологических наук, профессором кафедры нормальной и патологической морфологии и физиологии животных Крапивиной Е. В.

Клиническая биохимия. Методическое указание к лабораторно-практическим занятиям для студентов факультета ветеринарной медицины и биотехнологии по специальности 310800-«Ветеринария». / Сост. Крапивина Е.В. Изд-во – БГСХА., - 2009. – 52 с.

Рекомендовано к изданию методической комиссией факультета ветеринарной медицины и биотехнологии Брянской государственной сельскохозяйственной академии протокол № 8 от 03.06.2009 г.

Рецензент: зав. кафедрой химии Брянской государственной сельскохозяйственной академии,
доктор биологических наук Т.Л. Талызина.

© Брянская ГСХА, 2009

© Крапивина Е. В., 2009

Введение

Клиническая биохимия - это клинико-диагностическая наука, в задачи которой входят разработка и использование стандартных методов диагностики, контроля над течением заболевания с позиции биохимии. Она позволяет существенно облегчить научно-обоснованную постановку диагноза, выбор лечения и методов предупреждения заболевания. Клиническая биохимия базируется на биохимических основах патологических состояний, исходящих из положения, что все заболевания имеют биохимическую основу и являются проявлением нарушений:

- в структуре молекул;
- в ходе химических реакций и процессов.

Необходимо учитывать, что не любые изменения в первичной структуре молекул и не любые частичные изменения в механизме превращения тех или иных веществ обязательно вызовут нарушения процессов жизнедеятельности.

В то же время любые нарушения нормальных функций организма обязательно в своей основе имеют нарушения процессов обмена на молекулярном уровне. Нет болезней молекул, а есть патологические состояния организма, выражающиеся в нарушении функций отдельных органов или целого организма.

К основным положениям, которые позволяют рассматривать заболевание с биохимических позиций, относятся следующие.

1. Многие болезни детерминированы генетически.
2. Все классы биомолекул, найденные в клетке, могут изменять свою структуру, функцию или количество при том, или ином заболевании; биомолекулы могут вовлекаться в процесс первично или вторично.
3. Заболевания могут вызываться дефицитом или избытком определенных молекул (витаминов, гормонов).
4. Различные биохимические механизмы могут приводить к сходным патологическим, клиническим и лабораторным проявлениям.

У организма имеется ограниченный набор процессов реагирования на па-

тогенные факторы. Эти процессы реагирования можно назвать патологическими. К ним относят: воспаление (острое и хроническое), склероз, фиброз, дегенерацию, гипертрофию и атрофию органа, неоплазию, смерть клетки, образование камней и др.

При переходе от состояния здоровья к состоянию болезни редко происходят резкие изменения в системах организма. При этом в латентной стадии еще могут быть незаметны клинические, а в большинстве случаев и субъективные, признаки, но уже есть регистрируемые изменения биохимических параметров (например, глюкозотолерантный тест при сахарном диабете).

При патологии наблюдаются изменения, вызванные как самим патологическим процессом, так и возникающими метаболическими нарушениями. Эти изменения отражаются в биохимических показателях, которые могут увеличиваться или снижаться, появляться или исчезать, может изменяться динамика роста или снижения того или иного показателя.

Назначение и трактовка результатов биохимических исследований - это неотъемлемая составная часть врачебной деятельности.

Для различных патологических состояний (кроме генетически обусловленных) биохимические сдвиги не являются строго специфическими, и поэтому учитываются главным образом такие критерии, как «больше-меньше», «продолжительнее-быстрее», «наличие-отсутствие» органоспецифических показателей, изоферментов и т.п. По сути дела, оцениваются, по сравнению с показателями у здоровых особей, степень и время возникновения в организме изменения уровня того или иного показателя, продолжительность развившихся нарушений. Поэтому диагностическая чувствительность того или иного теста тем больше, чем адекватнее его выбор, чем больше различия между показателями у здоровых и больных, чем продолжительнее период изменений, отражающих динамику болезни. Обнаружение соответствующих изменений и является целью биохимических исследований.

Правильно выбрать биохимический тест - значит, учесть совокупность анамнестических и клинических данных, которые могли бы ориентировать на

предполагаемый диагноз, а в ходе дальнейших наблюдений позволили бы учитывать особенности динамики того или иного избранного показателя, связанного как с самим патологическим процессом, так и с особенностями больного, возможным влиянием факторов, в том числе лекарственных препаратов.

Одними из наиболее информативных показателей являются: содержание общего белка, уровень мочевины, креатинина, количество глюкозы, билирубина и проба на коллоидоустойчивость белков в сыворотке крови.

СУБСТРАТ – ОБЩИЙ БЕЛОК СЫВОРОТКИ КРОВИ

Определение содержания общего белка в сыворотке крови (рефрактометрически и колориметрически)

Определение общего белка в сыворотке крови рефрактометрическим методом

Принцип метода. В основу рефрактометрических методов анализа положено определение показателя (коэффициента) преломления исследуемого вещества - отношения синуса угла падения луча света к синусу угла его преломления. В сыворотке крови величина рефракции в первую очередь зависит от количества белков.

Для определения общего белка в сыворотке крови рефрактометрическим методом необходимо: рефрактометр (ИРФ-4546, УРЛ, RL и др) и смесь этилового спирта с эфиром 1:1.

Ход определения. Устанавливают прибор на нуль по дистиллированной воде при температуре 20 °С. Предварительно верхнюю и нижнюю камеры протирают марлевой салфеткой, смоченной смесью спирта с эфиром, и насухо - ватным тампоном. Поверхность призм при установке прибора на нуль и исследовании образца сыворотки крови должна быть чистой и сухой, от этого во многом зависит результат анализа.

Окуляр шкалы коэффициентов преломления ставят в крайнее положение на себя. Опускают нижнюю половину камеры, на призму наносят 1 - 2 капли

дистиллированной воды. Камеру закрывают, окуляр шкалы и окуляр зрительной трубы устанавливают на резкость. Дисперсию в окуляре зрительной трубы устраняют вращением винта лимба дисперсии.

Линию окуляра шкалы устанавливают на цифру 1,3330 (показатель преломления воды) и в зрительную трубу наблюдают границу светотени по отношению к точке пересечения двух взаимно перпендикулярных линий. Если граница светотени проходит через точку пересечения линий, то прибор установлен на нуль. Если этого нет, то при помощи ключа и маленького винта на корпусе зрительной трубы ставят границы светотени на точку пересечения линий. Поверхность призм досуха вытирают мягкой марлевой салфеткой и ватным тампоном.

Приступают к исследованию образцов крови. Автоматической или обычной пипеткой наносят на нижнюю призму 100 мкл (2 капли) сыворотки крови и плотно закрывают камеру. Зеркалом направляют свет в окно камеры и поворачивают винт до тех пор, пока граница светотени не достигнет пересечения двух визирных линий. Через окуляр по шкале отсчета показателя преломления дважды отсчитывают показатель преломления. Вычисляют среднее показание. Марлевой салфеткой удаляют с поверхности призм сыворотку, протирают поочередно ватными тампонами, сухим и смоченным спиртово-эфирной смесью до чистого сухого состояния. В случае использования стеклянной палочки ее после каждого образца сыворотки крови промывают и высушивают марлей. Исследуют следующую пробу.

Расчет. Содержание белка (г/л) определяют по таблице 10 с учетом величины показателя преломления рефрактометра. Если температура в камере во время исследования не соответствует 20 °С, то вводят поправку 0,0001 на каждый градус: в случае низкой температуры поправку вычитают, при более высокой - прибавляют.

Вычисление общего белка в сыворотке крови по показателю преломления

Показатель преломления	Белок, г/л	Показатель преломления	Белок, г/л	Показатель преломления	Белок, г/л
------------------------	------------	------------------------	------------	------------------------	------------

1,3431	41,6	1,3492	76,8	1,3532	99,9
1,3435	43,8	1,3493	77,3	1,3533	100,5
1,3439	46,0	1,3494	77,9	1,3534	101,0
1,3443	48,1	1,3495	78,3	1,3535	101,7
1,3446	50,3	1,3496	79,1	1,3536	102,3
1,3450	52,5	1,3497	79,6	1,3537	102,8
1,3454	54,7	1,3498	80,2	1,3538	103,3
1,3458	56,8	1,3499	80,8	1,3539	103,9
1,3460	59,2	1,3500	81,4	1,3540	104,4
1,3461	59,7	1,3501	82,0	1,3541	104,9
1,3462	60,2	1,3502	82,6	1,3542	105,4
1,3463	60,7	1,3503	83,3	1,3543	106,0
1,3464	61,2	1,3504	83,8	1,3544	106,4
1,3465	61,8	1,3505	84,4	1,3545	107,8
1,3466	62,3	1,3506	84,9	1,3546	107,5
1,3467	62,9	1,3507	85,5	1,3547	108,0
1,3468	63,4	1,3508	86,1	1,3548	108,6
1,3469	64,0	1,3509	86,7	1,3549	109,2
1,3470	64,5	1,3510	87,3	1,3550	109,8
1,3471	65,0	1,3511	88,0	1,3551	110,4
1,3472	65,5	1,3512	88,6	1,3552	110,9
1,3473	66,0	1,3513	89,2	1,3553	111,5
1,3474	66,5	1,3514	89,7	1,3554	112,1
1,3475	67,1	1,3515	90,3	1,3555	112,6
1,3476	67,7	1,3516	90,8	1,3556	113,2
1,3477	68,2	1,3517	91,4	1,3557	113,7
1,3478	68,8	1,3518	92,0	1,3558	114,2
1,3479	69,3	1,3519	92,6	1,3559	114,7
1,3480	70,4	1,3520	93,2	1,3560	115,2
1,3481	71,0	1,3521	94,0	1,3561	115,7
1,3482	71,5	1,3522	94,6	1,3562	116,2
1,3483	72,0	1,3523	95,1	1,3563	116,7
1,3484	72,5	1,3524	95,7	1,3564	117,1
1,3485	73,1	1,3525	96,3	1,3565	117,7
1,3486	73,6	1,3526	96,8	1,3566	118,2
1,3487	74,2	1,3527	97,3	1,3567	118,7
1,3488	74,8	1,3528	97,8	1,3568	119,3
1,3489	75,4	1,3529	98,4	1,3569	119,8
1,3490	75,9	1,3530	98,9	1,3570	120,4
1,3491	76,3	1,3531	99,4	1,3571	121,0

Примечание. Рефрактометрический способ измерения концентрации общего белка несовершенен, поскольку на показатель преломления влияют небелковые компоненты сыворотки крови, например минеральные вещества, пигменты, углеводы, липиды, фракции остаточного азота. При некоторых патологических состояниях их содержание увеличивается, что приводит к значительным

ошибкам в определении. Это касается исследования желтушных и хилезных сывороток, а также сывороток больных сахарным диабетом и страдающих уре-мией. Рефрактометрический метод дает ошибку в случаях использования сыво-ротки со следами гемолиза. Недостаточное промывание линз между анализами приводит к контаминации последних и завышению результатов.

Определение общего белка в сыворотке крови колориметрическим методом с биуретовым реактивом

Принцип метода. В щелочной среде ионы меди образуют с белками ком-плексы фиолетового цвета. При отщеплении атома водорода от энольной группы пептидной связи появляется отрицательный заряд, обеспечивающий связывание атома кислорода с ионом меди (в формировании комплекса имеет значение и связь иона меди с атомами азота за счет свободных электронных пар). При этом различие в интенсивности окрашивания комплексов, образованных альбумином и глобулинами, незначительно. Биуретовую реакцию дают не только белки, но и пептиды, состоящие из 3 и более аминокислот. Предел чувствительности биуре-тового метода, то есть предел обнаружения белка в пробе, ограничивается кон-центрацией 300 мг/л, что в большинстве случаев делает невозможным его ис-пользование для определения концентрации белка в нативной моче.

Для определения общего белка в сыворотке крови (колориметрическим методом с биуретовым реактивом) необходимо: набор реактивов (Ольвекс ди-агностикум), ФЭК, кюветы (10 мм) дозаторы (на 0,1 и 5 мл), колба (на 100 мл), пробирки, вода бидистиллированная.

Состав набора реактивов (Ольвекс диагностикум): биуретовый реактив (200 мл); калибратор - раствор БСА 70 г/л (2 мл).

Подготовка реагентов к процедуре анализа.

Для исследования приготовьте рабочий реагент: разведите необходимое количество биуретового реактива бидистиллированной водой в соотношении 1:4. Рабочий реагент стабилен при температуре 18-25°C в течение 12 месяцев при хранении в полиэтиленовой таре в защищенном от света месте.

Калибратор готов к применению: после вскрытия флакона калибратор стабилен не менее 6 месяцев при хранении в защищенном от света месте при температуре 2-8°C. Плотно закрывайте флаконы сразу после каждого использования реагентов.

Стабильность реагентов. Невскрытые реагенты стабильны не менее 12 месяцев при хранении в защищенном от света месте при температуре 18-25°C. Дата изготовления, серия и номер по каталогу указаны на упаковке.

Процедура анализа.

Подготовьте пробы следующего состава: ↓	Опытная проба	Калибровочная проба	Контрольная проба
Рабочий реагент, мл	5,0	5,0	5,0
Сыворотка, мл	0,1	-	-
Калибратор, мл	-	0,1	-
Вода дистиллир., мл	-	-	0,1

Пробы тщательно перемешайте и инкубируйте при комнатной температуре в течение 30 мин или 15 мин при 37°C. Измерьте оптические плотности опытной и калибровочной проб против контрольной пробы при длине волны 540 нм. Интенсивность окраски пропорциональна концентрации белка в пробе. Интенсивность окраски стабильна не менее часа.

Расчёт концентрации белка (С) в исследуемом материале проведите по формуле:

$$C = (E \text{ пробы} / E \text{ калибр.}) \times 70 \text{ г/л}, \text{ где:}$$

E пробы - оптическая плотность опытной пробы, E калибр. - оптическая плотность калибровочной пробы, 70 г/л - концентрация белка в калибраторе.

Аналитические характеристики набора: линейность - до 120 г/л., значение коэффициента вариации - не более 3%.

Примечания. 1. Для выполнения такого исследования лучше использовать сыворотку, хотя можно применять и плазму. Правда, результаты, полученные в последнем случае, оказываются несколько выше, чем при определении содержания общего белка в сыворотке: на величину до 4 г/л.

2. Описанным способом (без предварительной концентрации) белок в моче и ликворе не определяется.

3. При использовании измерительного оборудования типа ФЭЖов калибровочная кривая для данного метода показывает линейную зависимость до $A = 0,5$ (это значение абсорбции соответствует концентрации белка до 100 г/л). Поэтому при более высоком содержании общего белка сыворотку разводят физиологическим раствором (1:1), отбирают 0,1 мл смеси и полученный результат умножают на коэффициент разведения - 2.

4. Все используемые реактивы следует готовить на прокипяченной дистиллированной воде.

5. Ряд сопутствующих белку соединений мешает точному определению его содержания.

Известно, что находящиеся в сыворотке крови декстраны при взаимодействии с биуретовым реактивом дают помутнение вследствие образования содержащего медь комплексного соединения. Чтобы предотвратить этот нежелательный эффект, используют различные приемы, состоящие, в частности, в добавлении к биуретовому реактиву мочевины (до конечной концентрации 6 моль/л), внесении в пробу 1,2-пропандиола, растворяющего медно-белковый комплекс. Предложен также модифицированный биуретовый реактив, содержащий маннит. Как и другие полигидроксисоединения (глицерин, сорбит и др.), он способен растворять декстран и образовывать с медью комплексные соединения. Некоторые другие соединения также могут искажать результаты исследования (трис-буфер, глицерин, сульфат аммония и др.).

Присутствие в образцах большого количества липидного материала может вызывать выраженное помутнение раствора, которое устраняется встряхиванием проб с диэтиловым или петролейным эфиром и последующим центрифугированием.

Если анализируемые пробы биологической жидкости оказываются непрозрачными (при использовании, например, липемической сыворотки), ее, как правило, рекомендуется разбавить изотоническим раствором хлорида натрия в

соотношении 1:1, а результат умножить на 2. Можно выполнить и «бланк» пробы путем внесения исследуемого образца биологической жидкости (в объеме, применяемом для постановки опытных проб) в изотонический раствор хлористого натрия (взятый в объеме рабочего реагента).

6. Поскольку гемоглобин, высвобождающийся при гемолизе из эритроцитов, тоже может вступать в биуретовую реакцию, гемолизированные сыворотки для определения содержания общего белка не пригодны.

Интервалы нормальных значений общего белка в сыворотке крови:

<i>Показатели сыворотке</i>	<i>Крупный рогатый скот</i>	<i>Мелкий рогатый скот</i>	<i>Свинья</i>	<i>Лошадь</i>	<i>Собака</i>	<i>Кошка</i>
Общий белок, г/л	60-80	60-80	65-85	65-78	54-71	60-110

Клинико-диагностическое значение содержания общего белка в сыворотке крови

Увеличение или уменьшение содержания общего белка плазмы крови и отдельных фракций может быть обусловлено многими причинами, причем это касается как количественного, так и качественного состава белков. Эти изменения не являются специфичными, а отражают общий патологический процесс (воспаление, некроз, новообразования), динамику, тяжесть заболевания. С их помощью можно оценить эффективность лечения. Поэтому определение общего белка имеет важное клинико-диагностическое значение.

Изменения нормального содержания белка могут проявляться в виде гиперпротеинемии и гипопропротеинемии.

Изменение концентрации белка может носить абсолютный или относительный характер и зависит от объема циркулирующей крови. Гидремия приводит к относительной гипопропротеинемии, дегидратация — к гиперпротеинемии (дегидратация может скрыть абсолютную гипопропротеинемия, поскольку при данном сочетании концентрация белка в плазме крови не всегда отличается от

нормы). Поэтому при определении общего количества белка необходимо знать объем циркулирующей крови или величину гематокрита.

При абсолютной гипер- и гипопроотеинемии гематокрит в большинстве случаев нормальный, как и при диспротеинемии.

Содержание белков плазмы снижается чаще, чем повышается. Уменьшение количества общего белка крови в основном осуществляется за счет фракции альбуминов.

Гипопроотеинемии чаще всего носят абсолютный характер, то есть изменения касаются количества белка.

Абсолютная гипопроотеинемия — наблюдается при:

- *недостаточности поступления белков в организм* - при отрицательном азотистом балансе сначала мобилизируются структурные белки мышц, печени, костной ткани, кишечника. Следующее за этим истощение приводит при истощении этих резервов к снижению синтеза белков плазмы;

- *недостаточности переваривания и всасывания пищевых белков* (при диспепсии, дизентерии, гастроэнтеритах), несбалансированности их аминокислотного состава;

- *нарушении синтеза белков печени* (вследствие дефицита ферментов синтеза белков при группе наследственных гипопроотеинемий, при заболеваниях печени — токсических гепатитах, хронических и острых гепатитах, циррозах печени, особенно портальных циррозах и жировой дистрофии печени), а также при интоксикациях, обусловленных длительными нагноительными процессами, злокачественными новообразованиями, тиреотоксикозом, действием некоторых химических веществ. В результате изменения процесса синтеза и ресинтеза протеинов при перитоните происходит прогрессирующее снижение общего количества белка в сосудистом русле, притом в течение очень короткого промежутка времени;

- *потере белка организмом с кровью* при острых и хронических кровотечениях, с мочой при нефротическом синдроме (нефрозе, амилоидозе почек). Содержание белка при этом может снижаться до 25—30 г/л. При нефрозах, со-

провожающихся нарушением реабсорбции белка в канальцах, количество белка особенно низкое;

- *повышенном распаде белка в организме*, вызванным потребностью в возмещении больших энергетических затрат, связанных с дефицитом пластических ресурсов. Отмечается при термических ожогах, злокачественных новообразованиях, затяжном сепсисе, индуративной и терминальной форме туберкулёза, острой форме тейлериоза с тяжелым течением, при паратуберкулезе, нарушении эндокринного баланса вследствие гиперкортизолемии, гипертиреозидизма и т.д. (усиленный распад белка вместе с его повышенными потерями постоянно сопровождает развитие кишечной непроходимости);

- *перемещении в другие ткани* при резко увеличенной проницаемости капиллярной стенки: образовании обширных отеков, переход в третье пространство — при формировании экссудатов, выпотов в серозные полости, в просвет кишечника (при завороте кишок, перитоните). Отмеченное при остром панкреатите уменьшение количества циркулирующего в сосудистом русле белка плазмы также во многом связано с его переходом в забрюшинную клетчатку, серозные и другие полости;

- *дефектопротеинемии*, т. е. при сравнительно редко встречающихся наследственно обусловленных (генетически детерминированных) нарушениях в синтезе белков крови. К ним относятся аналбуминемия, агаммаглобулинемия, врожденное отсутствие или недостаточное содержание в плазме крови церулоплазмينا (болезнь Вильсона) и т.д. Связанная с врожденным нарушением биосинтеза белка первичная идиопатическая (эссенциальная) гипопропротеинемия сопровождается анемией, отеками, поносами;

- *особенностях физиологического состояния организма*. Пониженное содержание белка в плазме крови отмечено и при некоторых физиологических состояниях: например, у животных в последние месяцы беременности и в период лактации. Уровень белка в плазме крови зависит от породы, так у коров джерсейской породы он ниже, чем у черно-пестрой. При этом у животных с низкой живой массой и продуктивностью содержание общего белка в сыворотке крови

ниже, чем у имеющих высокую живую массу и продуктивность. На содержание общего белка в сыворотке крови влияет и время года – весной у коров оно ниже.

Относительные гипопроteinемии. Известно, что обильные перфузии раствора глюкозы и других физиологических жидкостей, а также анурия приводят к уменьшению концентрации белка вследствие увеличения объема жидкой части крови. То же наблюдается и в случае «водного» отравления, нарушения нейрогуморальной регуляции водного обмена, вызванного гиперсекрецией антидиуретического гормона и альдостерона, при сдвигах в регуляции кислотно-основного состояния (метаболический ацидоз).

Гиперпротеинемия - чаще всего развивается относительная, однако при ряде патологических состояний может наблюдаться и абсолютная гиперпротеинемия, обусловленная увеличением уровня глобулинов плазмы крови.

Относительная гиперпротеинемия наблюдается при нарушении гемодинамики и сгущении крови, потере жидкости при дегидратациях: профузных поносах, неукротимой рвоте, несахарном диабете, холере, в первые дни тяжелых ожогов, в послеоперационном периоде, гипертермии.

Абсолютная гиперпротеинемия — такое нарушение у животных, за исключением хищников, встречается редко и развивается вследствие усиления биосинтеза глобулинов в клеточных элементах системы фагоцитирующих мононуклеаров (вследствие их инфекционного или токсического раздражения) при длительно текущих хронических воспалительных процессах, в том числе при хронических полиартритах, проявляющееся образованием иммунных комплексов в почках, печени и других органах (например, алеутская болезнь норки), при острых воспалениях (в начальных стадиях пневмонии, сепсиса, при флегмоне). Значительное (до 120 г/л) увеличение концентрации общего белка в плазме наблюдается в случае появления очагов образования парапротеинов, например при миеломной болезни (плазмоцитоме), макроглобулинемии Вальденстрема.

Гиперпротеинемия обнаруживается при некоторых формах хронических гепатитов и циррозов печени, обычно в виде небольшого увеличения общего

белка плазмы крови (90—100 г/л), при паразитарных заболеваниях. Например при токсоплазмозе содержание общего белка может достигать 100—120 г/л.

Абсолютные или относительные гиперпротеинемии развиваются без специфических симптомов. Абсолютная, как и относительная, гипопротеинемия приводит при длительном течении, вследствие сниженного онкотического давления в плазме крови, к задержке жидкости в интерстиции и развитию отеков.

Проба на коллоидоустойчивость белков сыворотки крови

Коллоидно-осадочные пробы. Осадочные пробы не специфичны, однако позволяют устанавливать степень нарушения соотношений между альбуминами и глобулинами сыворотки крови. У здоровых животных белки в сыворотке крови находятся в коллоидном состоянии и отличаются высокой устойчивостью. При многих заболеваниях изменяется белковый спектр сыворотки крови, наступает диспротеинемия за счет снижения содержания альбуминов и повышения количества глобулинов, вследствие чего коллоидная устойчивость белков сыворотки крови снижается, под действием определенных веществ наступает преципитация, приводящая к помутнению.

Предложено много осадочных проб: сулемовая; тимоловая проба; кофеин-холестериновая проба; цинк-сульфатная проба; реакция Вальтмана; золото-коллоидная проба; проба с сульфатом меди и др.

Тимоловая проба

Тимоловая проба предложена в 1944 г. Маклаганом (иначе именуется пробой Маклагана). Ее химическая сущность состоит в образовании глобулин-тимол-липидного комплекса, содержащего 40% глобулинов, 32% тимола, 18% холестерина и 10% фосфолипидов. Все известные к настоящему времени варианты постановки пробы тимолового помутнения отличаются, главным образом, способом приготовления буферного раствора.

Принцип метода. В результате взаимодействия тимолового реактива с сывороткой крови при рН 7,55 появляется муть (глобулин-тимол-липопротеиновый комплекс). Оценка помутнения производится фотометрически.

Для проведения тимоловой пробы необходимо: диагностический набор (Агат); спектрофотометр (длина волны 630 нм) или фотоэлектроколориметр (длина волны 630-690 нм); кювета с длиной оптического пути 1,0 см; колбы мерные вместимостью 50, 250 и 500 мл; дозаторы на 50 и 1000 мкл; пробирки вместимостью 16-20 мл, дистиллированная вода.

Состав набора реактивов (Агат):

реагент 1. Концентрированный раствор тимола в трис-малеатном буфере - 1 флакон (12 мл) или 3 флакона (по 12 мл);

реагент 2. Раствор серной кислоты (2,5 моль/л) - 1 флакон (11 мл);

реагент 3. Раствор хлорида бария (48 ммоль/л) - 1 флакон (5,0 мл).

Необходимо соблюдать правила техники безопасности при работе с кислотами и ядовитыми веществами, так как реагент 2 содержит едкое вещество - серную кислоту, реагент 3 содержит ядовитое вещество - хлористый барий.

Подготовка реактивов к процедуре анализа.

1. Приготовление тимолового реактива.

В мерную колбу, вместимостью 500 мл, налить около 450 мл дистиллированной воды и при постоянном перемешивании, пипеткой постепенно внести 10 мл реагента 1. Носик пипетки должен быть погружен в воду в колбе. Раствор довести дистиллированной водой до метки и перемешивать еще 10 минут.

Тимоловый реактив можно хранить при температуре (18-25) °С. Раствор устойчив в течение 2 месяцев.

2. Приготовление рабочего раствора серной кислоты 0,1 моль/л (рабочий раствор 1).

В мерную колбу вместимостью 250 мл пипеткой внести 10 мл реагента 2, долить охлажденной точно до 8 °С дистиллированной водой до метки и перемешать.

3. Приготовление рабочего раствора бария хлористого (рабочий раствор 2).

В мерную колбу вместимостью 50 мл пипеткой внести 1,5 мл реагента 3 и долить до метки рабочим раствором серной кислоты, охлажденным точно до 10 °С. Содержимое колбы тщательно перемешать.

Процедура анализа.

К 3,0 мл тимолового реактива прибавить 0,05 мл сыворотки, оставить стоять 30 минут и затем измерить оптическую плотность при длине волны 630 (630-690) нм против тимолового реактива в кювете с длиной оптического пути 1,0 см. Реакцию проводить при температуре (18-25) °С. Расчет вести по калибровочному графику.

Построение калибровочной кривой.

Из рабочих растворов 1 и 2 разбавлением в пробирках приготовить растворы с помутнением, соответствующим 5-20 единицам помутнения (ед S-H).

№ пробирки	Состав раствора		Единицы помутнения, ед. S-H
	рабочий раствор 1 (мл)	рабочий раствор 2 (мл)	
1	4,50	1,50	5
2	3,00	3,00	10
3	1,50	4,50	15
4	-	6,00	20

После перемешивания выдержать 30 минут, еще раз перемешать и измерить оптическую плотность против дистиллированной воды. Измерение вести в тех же условиях, что для опытной пробы.

Если помутнение превышает 20 единиц S-H, анализ повторить с пробой, разведенной раствором натрия хлористого 154 ммоль/л (9 г/л) в соотношении 1:1.

Линейность калибровочного графика - до 20 ед S-H. Коэффициент вариации - 10 %.

Величины помутнения, характерные для здорового организма - 0 - 4 ед S-H.

Набор должен храниться в упаковке предприятия-изготовителя при температуре (18-25) °С в течение всего срока годности.

Примечания. 1. Точные данные могут быть получены при взятии крови натощак, поскольку алиментарная (связанная с приемом корма) гиперлипемия существенно влияет на результаты исследования.

2. Маклаган для получения более надежных результатов определения рекомендует параллельно ставить две пробы, в одну из которых вносят две капли концентрированного раствора хлористоводородной (соляной) кислоты (НС1), вызывающей растворение преципитата белка. При этом комплексы типичных липопротеинов остаются неизменными. Измерение оптической плотности производят относительно пробы с добавленной хлористоводородной кислотой.

3. Сыворотка для исследования может храниться в течение нескольких суток.

4. Умеренный гемолиз не отражается на результатах исследования.

Клинико-диагностическое значение теста

Осадочные пробы в сочетании с данными клинического состояния животных, наличием признаков заболевания печени, легких или других органов - ценные диагностические тесты.

Положительные коллоидно-осадочные пробы чаще обусловлены увеличением содержания глобулинов и уменьшением количества альбуминов. Ускорение коллоидно-осадочных реакций наблюдается также вследствие увеличения грубодисперсных белков - γ -глобулинов при нормальном коэффициенте альбуминов (глобулинов). Тимоловая проба положительна при коллагеновых заболеваниях, малярии и вирусных инфекциях. При экспериментальном мелодозе (псевдосапе) у морских свинок показатель мутности в тимоловом тесте повышался до 11 ед. S-H.

Чаще всего эту пробу используют как один из надежных тестов оценки функционального состояния печени. Благодаря ее применению удается диагно-

стировать «синдром воспаления», сопровождающий многие поражения печеночной паренхимы. По этой причине тимоловая проба относится к коллоидно-осадочным реакциям, наиболее часто применяемым для лабораторного подтверждения воспалительного поражения печени.

Тимоловая проба положительна при постгепатитном и постнекротическом, особенно желтушном, циррозе печени, в 90—100% случаев токсического, инфекционного (вирусного) гепатита и болезни Боткина (до 6 – 9 ед. S-N), причем еще в преджелтушной стадии заболевания и при безжелтушной его форме. При механической (обтурационной, застойной, холестатической) желтухе эта проба отрицательна (примерно в 75% случаев). На этом основывается использование теста для дифференциальной диагностики желтух. Однако, если процесс осложняется паренхиматозным гепатитом, то тимоловая проба становится положительной.

Важно отметить, что после перенесенного инфекционного гепатита, показатели тимоловой пробы оказываются повышенными в течение длительного времени (6 месяцев и более).

Следует отметить, что тимоловая проба раньше «реагирует» на воспаление печени, чем «печеночная» аланинаминотрансфераза.

СУБСТРАТ – МОЧЕВИНА СЫВОРОТКИ КРОВИ

Определение мочевины в сыворотке крови по реакции с диацетилмонооксимом

Принцип метода. В кислой среде в присутствии тиосемикарбазида (**ядовитое вещество!**) и ионов трехвалентного железа мочевины образует с диацетилмонооксимом комплексное соединение красного цвета, оптическая плотность которого при 510 нм пропорциональна концентрации мочевины.

Для определения мочевины в сыворотке крови по реакции с диацетилмонооксимом необходимо: набор реактивов (Агат), ФЭК, кюветы (10 мм) дозато-

ры (на 0,01 и 1 мл), колба (на 100 мл), пробирки, водяная баня с температурой 100°C, фольга, вода дистиллированная.

Состав набора реактивов (Агат).

1. Реакционная смесь сухая (диацетилмонооксим 1,0 ммоль; тиосемикарбазид 0,16 ммоль) - 4 пробирки;
2. Раствор соли железа трехвалентного (5 ммоль/л), 5 мл - 1 флакон;
3. Калибровочный раствор мочевины (8 ммоль/л), 2 мл - 1 флакон.

Вспомогательные реактивы (в состав набора не входят).

1. Кислота серная, концентрированная (96%), х.ч.;
2. Кислота трихлоруксусная, ч.

Состав рабочей реакционной смеси:

- диацетилмонооксим 5,0 ммоль/л;
- тиосемикарбазид 0,8 ммоль/л;
- железо треххлористое 25 мкмоль/л;
- кислота серная 0,9 моль/л.

Подготовка реагентов к процедуре анализа.

1. Раствор серной кислоты. В мерную колбу вместимостью 500 мл помещают около 300 мл дистиллированной воды и при постоянном помешивании добавляют 50 мл серной кислоты. После охлаждения доливают водой до метки. Раствор устойчив.

2. Раствор реакционной смеси. В мерную колбу вместимостью 100 мл количественно переносят содержимое одной пробирки сухой реакционной смеси и растворяют его примерно в 60 мл дистиллированной воды при нагревании до 40-50°C. После охлаждения добавляют 1 мл раствора соли железа трехвалентного и доливают водой до метки. Раствор стабилен при комнатной температуре в течение 2-х недель. Наличие небольшого количества нерастворимого осадка не мешает определению.

3. Рабочий раствор. Приготавливают смешиванием одной доли раствора реакционной смеси с одной долей раствора серной кислоты. Ежедневно готовят свежий рабочий раствор.

4. Раствор ТХУ 50 г/л (для депротеинирования). 10 г трихлоруксусной кислоты растворяют в 200 мл дистиллированной воды. Раствор устойчив.

Проведение анализа без депротеинирования.

(Без депротеинирования можно исследовать сыворотку или плазму крови без гемолиза, разведенную мочу. Мочу перед анализом разводят дистиллированной водой в соотношении 1:50-1:100. Результат умножают на разведение).

Процедура анализа: в пробирки внести реактивы по следующей схеме.

Подготовьте пробы следующего состава: ↓	Опытная проба, (Do)	Калибровочная проба, (Dk)	Контрольная (холостая) проба
Образец, мл	0,01	-	-
Калибровочный раствор мочевины, мл	-	0,01	-
Рабочий раствор, мл	2,00	2,00	2,00

Содержимое пробирок тщательно перемешивают, отверстие закрывают алюминиевой фольгой и пробирки помещают точно на 10 минут в кипящую водяную баню. Затем пробирки быстро охлаждают в потоке холодной воды и измеряют оптическую плотность при 510 нм (490-540 нм, зеленый светофильтр) против контрольной (холостой) пробы в кювете с толщиной поглощающего слоя 1,0 или 0,5 см. Параллельно обрабатывают калибровочный раствор. Окраска устойчива в течение 15 минут.

Проведение анализа с депротеинированием.

С депротеинированием проводят определение мочевины в липемической или гемолизированной сыворотке (плазме) крови, а также в цельной крови.

Процедура анализа: в пробирки вносят реактивы по следующей схеме.

Подготовьте пробы следующего состава: ↓	Опытная проба, (Do)	Калибровочная проба, (Dk)	Контрольная (холостая) проба
Раствор ТХУ, мл	0,50	0,50	0,10
Образец, мл	0,05	-	-

Калибровочный раствор мочевины, мл	-	0,05	-
Перемешать и центрифугировать 10 мин при 3000			об/мин.
Надосадочная жидкость, мл	0,10	0,10	-
Рабочий раствор, мл	2,00	2,00	2,00

Далее проводят определение, как при анализе без депротенирования.

Расчет содержания мочевины производят по формуле:

$$C = (D_0 / DK) \cdot 8,0$$

где: С - содержание мочевины в опытной пробе, ммоль/л;

D₀ - оптическая плотность опытной пробы;

DK - оптическая плотность калибровочной пробы;

8,0 - содержание мочевины в калибровочном растворе, ммоль/л.

Аналитические характеристики набора: линейность - до 17 ммоль/л., воспроизводимость - коэффициент вариации в серии - 5%. Для оценки правильности определения можно использовать контрольные сыворотки, аттестованные данным методом. Набор следует хранить в упаковке предприятия-изготовителя при температуре не выше 2-8° С в течение всего срока годности. Срок годности набора - 3 года.

Нормальные величины концентрации мочевины в сыворотке крови

Показатели сыворотке	Крупный рогатый скот	Мелкий рогатый скот	Свинья	Лошадь	Собака	Кошка
Мочевина, ммоль/л	3,3-5,0	1,33-3,33	3,3-5,0	1,5-4,0	1,65-4,65	3,30-5,00

Если имеются данные по уровню мочевины в мг%, то их следует умножить на 0,1665 для получения в ммоль/л (20 мг% • 0,1665 = 3,33 ммоль/л).

Примечания. 1. Ввиду неустойчивости получаемой окраски измерение абсорбции следует проводить не позже чем через 15 мин после охлаждения проб.

2. Из-за неустойчивости окрашенного комплекса мочевины с диацетилмонооксимом и зависимости окраски от условий нагревания калибровочный график строить не рекомендуется.

3. При содержании мочевины в пробе свыше 17 ммоль/л пробу следует развести дистиллированной водой и анализ провести повторно. Результат умножить на разведение.

4. При использовании биохимических полуавтоматизаторов (типа РV 1251-С «СОЛАР») объемы реагентов и анализируемой биологической жидкости могут быть уменьшены в несколько раз.

5. Пересчет показателей мочевины на содержание азота в мочеvine осуществляют путем умножения на 0,466 (или делением на 2,14).

6. При использовании кюветы другого объема расход реактивов может быть пропорционально изменен при сохранении соотношения проба/рабочий раствор 1:100.

Клинико-диагностическое значение содержания мочевины в плазме (сыворотке) крови

Мочевина является основной частью азотистых компонентов крови и составляет большую часть всего остаточного азота. Понятие резидуальный азот относится к разности между остаточным азотом и азотом мочевины.

Увеличение (обычно в несколько раз относительно верхнего показателя нормы) концентрации мочевины, сопровождающееся, как правило, выраженным клиническим синдромом интоксикации, называется уремией. Уремия бывает абсолютной и относительной, продукционной и ретенционной.

Относительная уремия возникает при дегидратации: при обезвоживании организма вследствие повышенного потоотделения, неукротимой рвоты, стенозе привратника, профузных поносах, при кровотечении, диабете. Азотемия этой группы заболеваний не достигает больших значений, содержание мочевины обычно не превышает 13 ммоль/л. Резкую уремию (до 33 ммоль/л) наблюдают у тяжело больных диспепсией телят.

Абсолютная продукционная уремия обусловлена поступлением в кровь продуктов распада тканевых белков: при перитоните, закупорке кишок, ожогах,

острой желтой атрофии печени, опухолях предстательной железы, гемолитической желтухе, злокачественной анемии, лейкемии, тяжелых инфекционных заболеваниях, шоке в сочетании с повышенным катаболизмом белка (к чему приводят желудочно-кишечные кровотечения, острый инфаркт миокарда, пролонгированный стресс), при кахексии, обширных ранениях, лечении глюкокортикоидами отравлении, сулемой. Функция почек при этом не нарушена. В этих случаях скорость образования мочевины отстает от скорости образования аминокислот при распаде белка. При этом в крови повышается и содержание аминокислот, аммиака, пептидов, мочевой кислоты, креатинина и креатина. Но мочевина может быть в пределах нормальных значений, если функция печени не нарушена.

Печень обладает большими функциональными резервами, способность ее к дезаминированию и синтезу мочевины сохраняется при исключении из процессов обмена до 85% ее ткани. Синтез мочевины нарушается только при очень тяжелых поражениях печени (остром некрозе печени, печеночной коме, циррозах, отравлениях фосфором, мышьяком).

Продукционную уремию наблюдали при высоком содержании в корме белка (но чаще до верхних границ нормы), в частности, при скармливании животным большого количества гороха, зеленых бобовых кормов (вико-овсяная смесь, горохо-овсяная смесь), при алкалозе рубца, возникающего при кормлении животных испорченными кормами (за счет гнилостной микрофлоры), при минеральном голодании и изменении видового состава микроорганизмов в рубце.

Абсолютная ретенционная почечная уремия возникает за счет снижения экскреторной функции почек. Этот тип азотемии встречается при гломеруло-нефритах, пиелонефрите, туберкулезе почек, амилоидно-сморщенной почке.

При хронических заболеваниях почек степень нарушения их функции отражается на содержании мочевины в крови, которое в начальный период не превышает 13 ммоль/л. В поздние сроки хронической почечной недостаточности, когда резко нарушается фильтрационная и концентрационная функции по-

чек, клиренс мочевины снижается до 50%. Количество азота мочевины во фракции ОА резко повышается и может составлять 95%.

Особенно высокое содержание мочевины (49,8—81,0 ммоль/л и выше) наблюдается при острой почечной недостаточности. При этом резко снижается выделение мочевины с мочой.

Задержка азотистых соединений в крови наблюдается обычно при гломерулонефритах и почти не обнаруживается при нефрозах.

Абсолютная ретенционная внепочечная уремия возникает при нефролитиазе, рефлексорной анурии, опухолях предстательной железы, опухолях и камнях в выводных мочевых путях, сердечной декомпенсации (из-за нарушения фильтрации мочи вследствие ухудшения гемодинамики в почках).

Уровень мочевины в биологических жидкостях может изменяться и под влиянием приема лекарственных веществ. К его увеличению в сыворотке крови приводят: анаболические стероиды, бутадиион, допегит, альдомет, препараты железа, алкалоиды раувольфии. Выраженное возрастание концентрации мочевины в крови происходит под влиянием нефротоксичных лекарственных препаратов.

Уменьшение содержания мочевины в крови бывает при длительном белковом недокорме, несбалансированности рациона по аминокислотному составу, нарушении всасывания в кишечнике (целиакия), парентеральном питании, акромегалии (вызванной гиперсекрецией соматотропного гормона), комбинированных поражениях почек и печени (гепаторенальный синдром), при нарушении мочевинообразовательной функции печени, наблюдаемой при кетозе коров, во время беременности (до уровня ниже 3,33 ммоль/л).

Показатели концентрации мочевины в крови у здоровых животных уже сами по себе являются важными диагностическими тестами, поскольку дают представление о процессах образования этого вещества в печени, о выделительной функции почек и о состоянии белкового обмена как основного источника азота, аминокислот и продуктов их распада для биосинтеза мочевины. Важно определение концентрации азота мочевины в крови еще и потому, что эта фракция составляет, как уже было отмечено, большую часть всего остаточ-

ного азота. В клинике внутренних болезней определение концентрации мочевины приобрело наибольшее значение для диагностики заболеваний почек, способных обусловить ретенционную (абсолютную) уремию.

СУБСТРАТ – БИЛИРУБИН СЫВОРОТКИ КРОВИ

Билирубин — желто-красный пигмент; представляет собой линейный тетрапиррол. Большая часть его в организме образуется в ретикулоэндотелиальной системе печени и селезенки при распаде гемоглобина, миоглобина, цитохромов. В сыворотке крови содержится билирубин, связанный с глюкуроновой кислотой, или прямореагирующий (диглюкуронид и моноглюкуронид); и билирубин, не связанный с глюкуроновой кислотой, или непрямореагирующий. Обе фракции билирубина в сыворотке крови могут находиться в свободной форме или в виде комплексов, соединенных с фосфолипидами или альбумином (связывающая способность альбумина сыворотки составляет 2 моля билирубина на 1 моль альбумина).

Свойства связанного билирубина обуславливают появление желтухи при значительно более низких цифрах его в крови по сравнению с концентрацией несвязанного билирубина.

Диазометоды определения билирубина основаны на взаимодействии билирубина с диазотированной сульфаниловой кислотой с образованием азопигментов, этими методами определяются количественно две основные фракции билирубина. Связанный билирубин дает быструю (прямую) реакцию азосочетания. Реакция несвязанного билирубина значительно медленнее. Ее ускоряют вещества-акселераторы: гидроокись натрия, желчные кислоты и их соли, некоторые органические кислоты и их соли, мочевины, кофеин, ацетамид, смесь HCl и диметилсульфоксида, смесь антипирина, мочевины и ацетата натрия, этиленгликоль и другие вещества. Акселераторы освобождают билирубин из белковых комплексов и тем самым ускоряют реакцию азосочетания. **Связанный**

билирубин соединен с альбумином значительно менее прочно, чем несвязанный, что обуславливает характер реакции.

Азокраситель, образовавшийся при азосочетании билирубина с диазотированной сульфаниловой кислотой, ведет себя как кислотнo-основной индикатор с несколькими цветными переходами. В сильно кислой среде раствор азокрасителя окрашен в фиолетовый цвет, в слабокислой и слабощелочной среде - в розовый, в сильно щелочной среде - в синий. Определение билирубина в сильно щелочной среде значительно повышает чувствительность метода. Азобилирубин обладает свойствами комплексообразования, что повышает интенсивность окраски.

Наиболее распространенными и приемлемыми являются диазометоды с применением в качестве акселераторных веществ смеси кофеина с бензоатом натрия и ацетатом натрия.

Определение концентрации общего и прямого билирубина в сыворотке крови методом Йендрассика-Грофа

Принцип метода. При взаимодействии сульфаниловой кислоты с азотистокислым натрием образуется диазофенилсульфоновая кислота, которая, реагируя со связанным билирубином сыворотки (конъюгированный с глюкуроновой кислотой), дает розово-фиолетовое окрашивание. По интенсивности его судят о концентрации билирубина, вступающего в прямую реакцию. При добавлении к сыворотке крови кофеинового реактива свободный билирубин переходит в растворимое диссоциированное состояние, благодаря чему он также вызывает розово-фиолетовое окрашивание раствора со смесью diazo-реактивов. Интенсивность окраски реакционной среды пропорциональна концентрации билирубина и измеряется фотометрически при длине волны 535 (500-560) нм. По разнице между содержанием общего и связанного билирубина находят количество свободного.

Для определения содержания билирубина в сыворотке крови используется негемолизированная сыворотка. Пробы стабильны 2 часа при комнатной температуре в защищенном от света месте. Хранить исследуемый материал при температуре 2-8°C, в защищенном от света месте не более 5 дней.

Для определения содержания билирубина в сыворотке крови методом Йендрассика-Грофа необходимо: набор реактивов (Ольвекс диагностикум), ФЭК, кюветы (10 мм) дозаторы (на 0,02 и 0,1 - 1 мл), пробирки, вода дистиллированная.

Состав набора реагентов для определения концентрации общего и прямого билирубина в сыворотке крови методом Йендрассика-Грофа (Ольвекс диагностикум).

1. Реагент № 1. Кофеиновый реагент (200 мл).
2. Реагент № 2. Сульфаниловая кислота (55 мл).
3. Реагент № 3. Натрия нитрит (2 мл).
4. Реагент № 4. Физиологический раствор (250 мл).
5. Калибратор - 85,5 мкмоль/л (в 2 мл дистил. воды) 1 флакон.

Подготовка реагентов к процедуре анализа и их стабильность:

Для исследования приготовьте diazo-реагент: смешайте необходимые количества реагентов № 2 и № 3 в соотношении 100 : 2,5 (800 мкл : 20 мкл). Diazo-реагент стабилен не менее 10 дней при температуре 2-8°C в плотно закрытой посуде из темного стекла.

Содержимое флакона с калибратором растворите в 2 мл дистиллированной воды. После полного растворения концентрация билирубина - 85,5 мкмоль/л. Растворенный калибратор стабилен в течение 5 дней при температуре 2-8°C в защищенном от света месте.

Срок хранения всех реагентов год при комнатной температуре. Реагент № 3 и калибратор светочувствительны - хранить в защищенном от света месте.

Процедура анализа:

Подготовьте пробы следующего	Опытная проба		Контрольная проба	Калибровочная проба
	общий	прямой		

состава: ↓	билирубин	билирубин		
Сыворотка, мл	0,2	0,2	0,2	-
Реагент № 1, мл	1,4	-	-	1,4
Реагент № 4, мл	0,2	1,6	1,8	0,2
Калибратор, мл	-	-	-	0,2
Диазореагент, мл	0,2	0,2	-	0,2

Пробы тщательно перемешайте.

Для определения прямого билирубина **точно** через 5 мин (при комнатной температуре) измерьте величину экстинкции опытной пробы против соответствующей контрольной пробы при длине волны 535 нм (500 - 560 нм).

Для определения общего билирубина через 20 мин (при комнатной температуре) измерьте величину экстинкции опытной пробы против соответствующей контрольной пробы при длине волны 535 нм (500 - 560 нм).

Экстинкцию калибратора измерьте против дистиллированной воды через 20 мин (комнатная температура) при длине волны 535 нм (500-560 нм).

Расчёт концентрации билирубина в пробе (С) проведите по формуле:

$C = E \text{ пробы} / E \text{ калибр.} \cdot 85,5 \text{ мкмоль/л}$, где:

E пробы - экстинкция опытной пробы;

E калибр - экстинкция калибровочной пробы;

85,5 - концентрация билирубина в калибраторе, мкмоль/л.

Нормальные значения:

Показатели плазмы	Крупный рогатый скот	Мелкий рогатый скот	Свинья	Лошадь	Собака	Кошка
Билирубин общий, мкмоль/л	1,71-8,00	1,71-7,20	1,71-10,25	1,70-25,6	1,70-5,13	1,20-7,90

Аналитические характеристики набора: линейность - до 220 мкмоль/л., значение коэффициента вариации - не более 5 %.

Примечания. 1. Определение содержания билирубина рекомендуется выполнять сразу же после взятия проб, чтобы избежать его окисления на свету:

воздействие прямого солнечного света может быть причиной 50% падения содержания билирубина уже к исходу первого часа.

2. Пробы должны анализироваться в течение 2 ч с момента взятия крови, если они хранятся при комнатной температуре и в темноте, или в течение 12 часов при хранении в условиях охлаждения при температуре 2—8°C в темноте.

3. Гемолиз сыворотки снижает количество определяемого билирубина пропорционально присутствию в пробе гемоглобина. Следовательно, сыворотка крови не должна быть гемолизирована: это приводит к ошибочному занижению результатов. Напротив, выраженная липемия обуславливает завышение результатов.

Клинико-диагностическое значение содержания билирубина в сыворотке крови

Повышение в крови содержания неконъюгированного (непрямого, свободного) билирубина происходит в ряде ситуаций.

1) (гемолитическая форма) Повышенное образование из гемоглобина при усиленном разрушении эритроцитов в селезёнке или в крови, как зрелых клеток, так и их предшественников (неэффективный эритропоэз). Разрушение зрелых клеток может быть результатом гемолиза или следствием утилизации крови после внутренних кровотечений, например в поврежденных мягких тканях. Неэффективный эритропоэз имеет место при пернициозной (злокачественной) анемии (нарушение созревания эритроцитов) или талассемии (аномальная структура гемоглобина). Гемолитическая гипербилирубинемия обычно достигает 75 мкмоль/л. Развитие гемолитической желтухи может происходить даже на фоне усиленной конъюгационной активности печени. При этом возрастает поступление билирубина из печени в кишечник, продуцируется большое количество уробилиногена, уровень которого в моче повышается.

2) Конкурентное вытеснение неконъюгированного билирубина из связи с альбумином (салицилаты, сульфаниламиды, тетрациклины, желчные кислоты, неэтерифицированные жирные кислоты при ацидозе).

3) (гепатоцеллюлярная и/или гемолитическая форма) Нарушение захвата, связывания и выведения билирубина гепатоцитами неконъюгированного билирубина из крови. Причиной возникновения такой желтухи является накопление в крови различных токсинов и продуктов обмена.

4) (гепатоцеллюлярная форма) Недостаточная активность уридиндифосфат-глюкуронилтрансферазы гепатоцитов, которая осуществляет конъюгирование билирубина. Различают наследственную и приобретенную недостаточность глюкуронилтрансферазы. Если гипербилирубинемия вызвана нарушением конъюгации, билирубин не конъюгируется и отсутствует усиление потока билирубина через печень. Следствием этого является то, что уровень уробилиногена в моче не повышен. Генерализованная гепатоцеллюлярная дисфункция может иметь место при гепатитах и декомпенсированных печеночных циррозах. Лекарственные вещества могут вызывать гепатоцеллюлярные повреждения в связи со своей дозозависимой гепатотоксичностью (например парацетамол) или идиосинкратической чувствительностью (например изониазид).

Повышение в крови конъюгированного билирубина обусловлено двумя факторами:

- 1) снижением активности экскреции пигмента при внутриклеточном холестазах;
- 2) холестатическими процессами с гипертензией в жёлчных протоках и затруднением выхода пигмента из гепатоцитов против градиента концентрации (внепечёночный холестаз).

Внутрипеченочный холестаз часто является результатом генерализованной гепатоцеллюлярной дисфункции, развивающейся, например, при гепатите или декомпенсированном циррозе печени. Некоторые лекарственные препараты, такие, как анаболические стероиды, фенотиазины и сульфонилмочевина также могут приводить к внутрипеченочному холестазу. При гепатоцеллюлярном поражении конъюгированная фракция составляет меньшую долю общего билирубина, чем при внеклеточном блоке.

Внепеченочная обструкция часто является результатом воспалительных процессов (холангит, холецистит), опухолей главных желчевыводных путей,

опухоли головки поджелудочной железы и увеличения лимфоузлов в воротах печени. К обструкции желчных протоков также могут приводить желчные камни, закупорка желчных путей паразитами (аскаридами, фасциолами, эхинококками и т.д.) или склерозирующий холангит.

В любом из названных случаев возникает затруднение оттока желчи, что ведет к повышению давления в желчных путях, к увеличению проницаемости желчных капилляров или их разрыву. Для механической желтухи характерно наличие в крови как прямого, так и непрямого билирубина. Однако в моче исчезает уробилиноген, кал у плотоядных приобретает белый цвет из-за отсутствия стеркобилина. У жвачных животных кал практически не меняет окраску, т. к. в кормах содержится много хлорофилла, который придает специфичную окраску.

Считается, что гипербилирубинемия имеет печёночное (холестатическое) происхождение, если более 80% общего билирубина составляет конъюгированный билирубин.

Гипербилирубинемии рассматривают как гемолитическую, если более 80% общего билирубина представлено неконъюгированным пигментом, однако это может быть и при гепатоцеллюлярной желтухе.

СУБСТРАТ – КРЕАТИНИН СЫВОРОТКИ КРОВИ

Определение креатинина в сыворотке крови методом Яффе с депротеинизацией

Принцип метода. Суть реакции сводится к тому, что при добавлении к креатинину пикриновой кислоты в щелочной среде появляется оранжево-красное окрашивание, обусловленное образованием таутомера пикрата креатинина. Эту реакцию внедрил в биохимическую практику Фолин в 1904 г. С тех пор она широко применяется во многом благодаря простоте исполнения анализа. Скорость образования окрашенного комплекса креатинина с пикриновой кислотой в щелочной среде пропорциональна концентрации креатинина в пробе.

Для определения креатинина в сыворотке крови методом Яффе с депротеинизацией необходимо: набор реактивов (Ольвекс диагностикум), ФЭК, кюветы (10 мм) дозаторы (на 0,5 и 1 мл), пробирки, вода дистиллированная.

Состав набора реактивов (Ольвекс диагностикум):

реагент № 1. Пикриновая кислота (100 мл);

реагент № 2. Натр едкий (100 мл);

реагент № 3. Депротеинизатор (100мл);

калибратор - раствор креатинина 177 мкмоль/л, согласно процедуре анализа (10 мл).

Кроме сыворотки этим методом можно исследовать плазму крови (липидная или гемолизирующая сыворотка и плазма крови для анализа непригодны), а также свежую мочу, разведенную дистиллированной водой в 100 раз (например 0,01 мл мочи и 0,99 мл дистиллированной воды).

Процедура анализа.

1. Подготовка образцов к анализу – депротеинизация и получение супернатанта.

Подготовьте пробы следующего состава: ↓	Опытная проба	Контрольная проба
Сыворотка, плазма, разведенная моча, мл	0,5	-
Вода дистилл., мл	1,0	1,5
Реагент № 3, мл	0,5	0,5

Содержимое пробирок опытных проб тщательно перемешайте и через 10 минут центрифугируйте при 900 G в течение 15 минут. Для дальнейшего анализа используйте прозрачную надосадочную жидкость (супернатант). Содержимое пробирки контрольной пробы перемешайте, центрифугировать необязательно. Поставляемый в составе набора калибратор в данной процедуре не нуждается, так как она уже была проведена на предприятии-изготовителе.

2. Проведение анализа:

Подготовьте пробы сле-	Опытная проба	Калибровочная	Контрольная
------------------------	---------------	---------------	-------------

дуящего состава: ↓		проба	проба
Супернатант, мл	1,0	—	—
Калибратор, мл	—	1,0	—
Контрольный раствор, мл	—	—	1,0
Реагент № 2, мл	0,5	0,5	0,5
Реагент № 1,мл	0,5	0,5	0,5

Содержимое пробирок тщательно перемешивайте после добавления каждого реагента и инкубируйте при температуре 18-25°C точно! 20 минут. Измерьте оптические плотности опытной (Е пробы) и калибровочной (Б калибр.) проб против контрольной пробы при длине волны 505 нм (490 - 520 нм).

Расчет концентрации (С) креатинина проведите по формулам:

Креатинин сыворотки (плазмы крови):

$$C = E \text{ пробы} / E \text{ калибр.} \cdot 177 \text{ мкмоль/ л.}$$

Креатинин мочи:

$$C = (E \text{ пробы} / E \text{ калибр.}) \cdot (177 / 1000) \cdot 100 =$$

$$= (E \text{ пробы} / E \text{ калибр.}) \cdot 17,7 \text{ мкмоль/ л}$$

$$\text{или } C = (E \text{ пробы} / E \text{ калибр.}) \cdot V \cdot 17,7 \text{ мкмоль/сутки}$$

где:

Е пробы - оптическая плотность исследуемой пробы,

Е калибр. - оптическая плотность калибровочной пробы,

177 мкмоль/л - концентрация креатинина в калибраторе,

100 - разведение мочи,

1000 - перевод мкмоль в ммоль,

V - объем суточной мочи, л.

Аналитические характеристики набора: линейность - до 440 мкмоль/л, воспроизводимость - коэффициент вариации не более 5%.

Стабильность реагентов: реагенты № 1, № 2 и № 3 стабильны при комнатной температуре в течение года, реагент № I - в темноте. Калибратор готов к

применению; после вскрытия флакона калибратор стабилен не менее 6 месяцев при температуре 2-8°C.

Невскрытые реагенты и калибратор стабильны не менее года при хранении в защищенном от света месте при температуре 18 - 25°C. Плотнo закрывайте флаконы непосредственно после каждого использования. Дата изготовления, серия и номер набора по каталогу указаны на упаковке.

Нормальные величины концентрации креатинина в сыворотке крови

<i>Показатели сыворотки</i>	<i>Крупный рогатый скот</i>	<i>Мелкий рогатый скот</i>	<i>Свинья</i>	<i>Лошадь</i>	<i>Собака</i>	<i>Кошка</i>
Креатинин, мкмоль/л	88,4-176,8	106,0-168,0	88,4-238,6	106,0-168,0	44,0-132,5	50,0-160,0

У кур – 120-350 мкмоль/л (1,4-4,0 мг%).

Примечания. 1. Если концентрация креатинина превышает 880 мкмоль/л в сыворотке/плазме или 44,2 ммоль/л в моче, разведите исследуемые образцы в 5 раз физиологическим раствором и повторите определение; результат умножьте на 5.

2. Антикоагулянты, за исключением гепарина, искажают показатели содержания креатинина.

3. Если используется несвежий раствор щелочи, желательно проверить pH реакционной смеси.

4. Температура в продолжение измерения также не должна колебаться более чем на 3°C ($\pm 1,5^\circ\text{C}$), она должна быть одинаковой при измерении опытной, контрольной и стандартной пробы. При температуре выше 25°C усиливается влияние мешающих определению веществ.

5. Оптимальная длина волны - 505 нм. Допускается фотометрировать пробы и при других длинах волн, но лучше, чтобы они не превышали 505 нм (Hg 546 нм). Желательно, чтобы ширина спектрального диапазона была не более 10 нм, самое лучшее 1-2 нм.

6. Величину рН реакционной смеси нужно поддерживать в интервале $12,4 \pm 0,1$. Если правильность полученных результатов вызывает сомнение, следует проверить в первую очередь рН реакционной смеси.

7. В качестве консервантов для мочи применяют тимол и толуол, тем более что они не влияют на определение уровня креатинина.

8. При исследовании содержания креатинина в сыворотке или плазме крови пробы сохраняют стабильность в охлажденном виде в течение суток (для длительного хранения заморозить), при исследовании в моче - до 4 сут. (для более длительного хранения заморозить).

9. Белок не мешает исследованию содержания креатинина в моче при концентрации до 15 г/л. При большем уровне белка его необходимо предварительно удалить.

10. Если величина абсорбции опытных проб при фотометрии на обычной измерительной аппаратуре типа ФЭКов превышает 0,22 - 0,25, мочу следует разводить с последующим учетом показателя разбавления.

11. Креатинин-стандарт при длительном хранении (сверх указанного срока годности) способен прорасти (из-за размножения микробной флоры), вследствие чего при построении калибровочной кривой отмечаются низкие значения абсорбции.

12. Особой осторожности требует определение креатинина у больных сахарным диабетом. При концентрации глюкозы свыше 15 ммоль/л результаты, полученные с использованием реакции Яффе, недостаточно надежны.

13. При исследовании мочи можно избежать интерференции, если предварительно прокипятить мочу.

***Клинико-диагностическое значение содержания креатинина
в плазме (сыворотке) крови***

Увеличение уровня креатинина в плазме (сыворотке) крови обусловлено как усиленным образованием (продукционная креатининемия), так и задержкой этого метаболита в организме (ретенционная креатининемия).

Продукционная гиперкреатининемия (креатининемия) отмечается при кишечной непроходимости, острой желтой атрофии печени, хлоропривной азотемии (т.е. компенсаторной гиперазотемии, обусловленной уменьшением содержания осмотически активных ионов хлора), декомпенсации деятельности сердечно-сосудистой системы, пневмонии, лихорадочных состояниях. Возрастающее содержание креатинина в плазме (сыворотке) крови может быть вызвано изменением эндокринного баланса: при тяжело протекающем сахарном диабете, акромегалии и гигантизме, гипертиреозе, гипофункции надпочечников, а также голодании, усиленной мышечной работе.

Ретенционная гиперкреатининемия (почечная и внепочечная) обусловлена нарушением (острым и хроническим) функции почек любого происхождения и обычно наблюдается при уменьшении клубочковой фильтрации, поражении воспалительным (и другим) процессом паренхимы почек, обтурации мочевых путей ниже уровня почек.

По мнению большинства авторов, гиперкреатининемия не может служить показателем ранней диагностики заболеваний почек. Вместе с тем полагают, что содержание креатинина при остром нефрите и начинающейся на почве нефросклероза недостаточности почек может быть повышено в крови прежде, чем зафиксируется возрастание уровня остаточного азота. Это дает основание рассматривать гиперкреатининемию как ранний показатель развивающейся недостаточности почек. Устойчивое повышение уровня креатинина в крови, как и возрастание концентрации мочевины в ней, указывает на нарушение функции почечного фильтра и развития почечной недостаточности. При этом определение содержания креатинина - более надёжный тест, так как повышение концентрации его в крови происходит раньше, чем повышение концентрации мочевины.

Снижение уровня креатинина в плазме (сыворотке) крови коррелирует с обусловленным возрастом уменьшением мышечной массы, оно также наблюдается в первой половине беременности.

СУБСТРАТ – ГЛЮКОЗА СЫВОРОТКИ КРОВИ

Определение глюкозы в сыворотке крови глюкозооксидазным методом

Принцип метода. Ферментативное с колориметрическим завершением определение содержания глюкозы состоит в том, что она в присутствии фермента глюкозооксидазы (ГО) окисляется кислородом воздуха с образованием перекиси водорода, при разрушении которой под влиянием пероксидазы (ПО) происходит конденсация фенола и р-аминоантипирина в окрашенное соединение. Этот энзимный (глюкозооксидазный) метод обладает высокой специфичностью и чувствительностью. Содержащиеся в плазме (сыворотке) крови мочевая кислота, глутатион, креатинин и другие вещества не мешают определению глюкозы энзимным методом (лишь аскорбиновая кислота и цистеин в больших концентрациях могут оказывать влияние на ход анализа).

Глюкоза распределена почти равномерно между плазмой и эритроцитами, поэтому с равным успехом может определяться в цельной крови, плазме или сыворотке, но надо иметь в виду, что в уже взятой пробе крови, особенно если сгусток для получения сыворотки формируется в термостате или если материал взят нестерильно, идет интенсивный гликолиз и содержание глюкозы быстро падает. Часто принимают, что в венозной крови содержится на 0,5 ммоль/л (10 мг в 100 мл) меньше глюкозы, чем в капиллярной, но эта величина условная.

Для определения глюкозы в сыворотке крови глюкозооксидазным методом необходимо: набор реактивов (Ольвекс диагностикум), ФЭК, кюветы (10 мм) дозаторы (на 0,02 и 1 мл), пробирки, вода дистиллированная.

Состав набора реактивов (Ольвекс диагностикум).

1. Ферментно-хромогенная смесь - 1 таблетка.

2. Антикоагулянт (оксалат натрия, фторид натрия) - 1 таблетка.
3. Калибратор (раствор глюкозы с концентрацией 10 ммоль/л) -1 флакон.

Подготовка реагентов к анализу.

Приготовление рабочего раствора.

Таблетку «ферменты-хромогены» растворить в 100 мл дистиллированной воды, тщательно перемешивая, не встряхивая (!). Допускается наличие мелких нерастворимых частиц.

Приготовление раствора антикоагулянта.

Таблетку антикоагулянта растворить в 50 мл дистиллированной воды.

Стабильность реагентов. Хранить набор при +2-8°C в темном месте в течение всего срока годности (1 год). Допускается хранение при температуре +18-25°C не более 20 дней.

Рабочий раствор хранить при +2-8°C в плотно закупоренном флаконе из темного стекла, используя в течение 7 дней. При расходе рабочего раствора менее 100 мл в неделю следует после растворения таблетки «ферменты-хромогены» разлить рабочий раствор в чистые плотно закупориваемые флаконы темного стекла дозами, необходимыми на неделю - это позволит использовать рабочий раствор в течение месяца. Появление слабой розовой окраски не влияет на результаты исследования при выполнении условий калибровки.

Раствор антикоагулянта можно хранить при +2-8°C в течение 30 дней.

Калибратор после вскрытия флакона рекомендуется хранить при +2-8°C в темном месте не более 3 месяцев.

Для определения содержания глюкозы в сыворотке крови используется негемолизированная сыворотка или плазма крови. Содержание билирубина до 324 мкмоль/л не влияет на правильность анализа.

Процедура анализа.

Внести в пробирки образцы сыворотки крови и реагенты по схеме:

Для кювет →	С длиной оптического	С длиной оптического
-------------	----------------------	----------------------

Подготовьте пробы следующего состава: ↓	пути 10 мм			пути 5 мм		
	опытная проба, мл	калибр, проба, мл	холостая проба, мл	опытная проба, мл	калибр. проба, мл	холостая проба, мл
Рабочий раствор, мл	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
Сыворотка крови, мл	0,02	—	—	0,04	—	—
Калибратор, мл	—	0,02	—	—	0,04	—
Вода дистиллиров., мл	—	—	0,02	—	—	0,04

Пробы тщательно перемешать и инкубировать в течение 15 мин. при +37°C (термостат) или в течение 25 мин при 18-25°C («на столе»). Через 5-10 мин после начала инкубации пробирки с пробами интенсивно встряхнуть вручную.

После окончания инкубации измерить величину оптической плотности опытной и калибровочной проб против холостой пробы в кюветах с длиной оптического пути 5 или 10 мм при длине волны 500 (490-540) нм.

Окраска проб стабильна более 4 ч после окончания инкубации.

Расчет концентрации глюкозы в пробах провести по формуле:

$C = (E_0/E_K) \cdot 10$, где: C - концентрация глюкозы, ммоль/л;

E_0 - оптическая плотность опытной пробы, ед. опт. плотн.;

E_K - оптическая плотность калибровочной пробы, ед. опт. плотн.;

10 - концентрация глюкозы в калибраторе, ммоль/л.

Для определения глюкозы в плазме крови глюкозооксидазным методом необходимо в центрифужную пробирку внести 0,9 мл раствора антикоагулянта, добавить 0,1 мл крови (или 0,45 мл и 0,05 мл соответственно), тщательно перемешать и центрифугировать при 1000 об/мин в течение 15 мин. Надосадочную жидкость перенести в чистую пробирку и использовать для анализа.

Для приготовления калибровочной пробы в пробирку внести 1 часть калибратора и 9 частей раствора антикоагулянта, тщательно перемешать. Полученную калибровочную смесь использовать для анализа.

Анализ проводить аналогично определению содержания глюкозы в сыворотке крови.

При получении значения концентрации глюкозы выше 20 ммоль/л пробы разбавляют дистиллированной водой в 10 раз и повторяют анализ, при этом полученный результат следует умножить на коэффициент разведения 10.

Аналитические характеристики набора: отклонение от линейности при концентрации глюкозы 2-20 ммоль/л не более 5%, чувствительность - не более 1 ммоль/л, коэффициент вариации - не более 5%.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ГЛЮКОЗЫ В МОЧЕ.

При проведении серийных анализов мочи проводится *качественный* скрининг. В лунки иммунологического планшета вносят 0,005 мл мочи и 0,2 мл рабочего реактива. Пробы мочи, вызывающие в течение 2 мин. покраснение реакционной смеси, считаются положительными и для них должно быть проведено количественное определение содержания глюкозы.

Количественное определение глюкозы в моче проводят аналогично определению содержания глюкозы в сыворотке крови.

Нормы содержания глюкозы в плазме крови:

<i>Показатели плазмы</i>	<i>Крупный рогатый скот</i>	<i>Мелкий рогатый скот</i>	<i>Свинья</i>	<i>Лошадь</i>	<i>Собака</i>	<i>Кошка</i>
Глюкоза, ммоль/л	2,50-3,88	2,70-4,40	4,70-5,20	4,20-5,55	3,90-6,50	4,00-10,0

Примечание. 1. Стабильность глюкозы в пробах (опытных и стандартных) во многом определяется возможностью микробного заражения биологических жидкостей и зависит от интенсивности гликолиза в них.

2. Эффект гликолиза может быть ограничен или благодаря центрифугированию крови, осуществляемому немедленно после ее взятия (причем с выдерживанием пробы крови на льду перед центрифугированием), или путем преципитации (осаждения) белка.

3. Другой путь ограничения гликолиза — добавление к пробе ингибиторов этого процесса, таких как фторид натрия, оксалат натрия, йодацетат.

4. Однако рутинное использование ингибиторов не позволяет достичь полного эффекта: даже в этом случае через 2 ч после взятия крови содержание глюкозы в ней оказывается на 5—10% ниже исходного.

5. Поэтому для того, чтобы получить точные результаты, необходимо немедленное центрифугирование крови, сохранение ее до анализа на льду и осаждение белков.

6. Из всех приведенных способов подготовки биологического материала к исследованию наилучшим является *немедленное центрифугирование крови*, хотя на эту процедуру уходит достаточно много времени.

7. Для ингибирования гликолиза кровь следует собирать в пробирки, содержащие фторид натрия (100 мг/л крови). При этом сыворотка и плазма должны быть освобождены от клеток крови как можно скорее (присутствие эритроцитов ускоряет гликолиз: падение концентрации глюкозы составляет около 7% в час).

8. Следует иметь в виду, что глюкоза в пробах сыворотки или плазмы крови стабильна в течение 4 ч при 30°C и 24 ч — при 4°C.

9. Концентрация глюкозы в крови уменьшается на 3—6% за 1 ч при комнатной температуре и на 10—30% за 4 ч. Это происходит вследствие гликолиза, протекающего в лейкоцитах и эритроцитах крови.

10. С целью длительного хранения пробы необходимо поместить в герметические контейнеры и заморозить при -10°C.

11. Глюкоза в пробах мочи стабильна при 4°C в течение 1 сут.

***Клинико-диагностическое значение содержания глюкозы
в плазме (сыворотке) крови***

Гипергликемия может быть инсулярной и экстраинсулярной. Причиной инсулярной гипергликемии является недостаточность инсулина (сахарный диабет 1 типа), которая возникает в результате следующих процессов.

1. Сниженной секреции инсулина: а) уменьшении биосинтеза инсулина; б) нарушении выделения инсулина; в) нарушении в системе аденилциклазы; г) первичном повреждении и атрофии бета-клеток.

2. Биосинтеза инсулина ненормального строения: а) с иммунологическими свойствами нормального инсулина; б) с отличающимися (по сравнению с нормальным инсулином) иммунологическими свойствами.

3. Ускоренной инактивации инсулина: а) образовании белковых ингибиторов (синальбумин и др.); б) ускорении распада молекулы инсулина; в) замедлении освобождения инсулина из комплексов с белком.

4. Снижении чувствительности тканей к инсулину: а) нарушение функции капилляров (прежде всего утолщение основной мембраны); б) уменьшение чувствительности клеток к инсулину, что может быть, например, при генетически обусловленном усиленном использовании клетками жирных кислот; при этом тормозится влияние инсулина на утилизацию глюкозы.

Следует иметь в виду, что при лабильном течении сахарного диабета, которое наблюдается у длительно болеющих гипергликемия может сменяться гипогликемией. Вместе с тем при тяжелом течении сахарного диабета, осложненном развитием диабетического гломерулосклероза (нефросклеротическая стадия заболевания), уровень глюкозы в моче и крови может снижаться вплоть до нормы, несмотря на прогрессирующие расстройства углеводного обмена. Нормогликемия в таких случаях вызвана нарушением проницаемости мембран клеток и другими факторами, способствующими переходу глюкозы из плазмы крови в клетки.

Причинами экстраинсулярной гипергликемии являются очень многие процессы. Чаще всего эта группа гипергликемий связана с гиперфункцией эндокринных желез, продуцирующих гормоны - антагонисты инсулина. Она наблюдается при таких заболеваниях, как синдром и болезнь Иценко - Кушинга,

акромегалия, тиреотоксикоз, феохромоцитома, глюкагонома. При синдроме Иценко - Кушинга (опухоли коры надпочечников) ГГК умеренная и редко бывает высокой. При болезни Иценко - Кушинга, вызванной повышенной стимуляцией глюкокортикоидной функции коры надпочечников кортикотропином вследствие опухоли передней доли гипофиза, ГГК может быть выраженной. Секретируемые в кровь глюкокортикоиды усиливают глюконеогенез, обуславливают развитие так называемого стероидного диабета.

При феохромоцитоме (опухоль мозгового слоя надпочечников) отмечается преходящая гипергликемия, которая наиболее часто выявляется во время гипертонического криза в результате значительного выброса катехоламинов в кровь. Реже (10% случаев) возникает постоянная гипергликемия. Стимулируемый катехоламинами распад гликогена в печени является основной причиной повышения содержания глюкозы в крови (если опухоль норадреналиновая, то выраженность ГГК в 4 раза меньше, чем при адреналиновой опухоли).

Гипергликемия при тиреотоксикозе наблюдается в 1 - 8% случаев вследствие усиленного всасывания глюкозы в кишечнике и гиперфункции симпатoadrenalовой системы (гликогенолиз). При тяжелом течении тиреотоксикоза (тиреотоксическом кризе) гипергликемия может перейти в гипогликемию.

Усиленно секретирующие глюкагон альфа-клетки островковой ткани (при глюкагономах) вызывают нарушения толерантности к глюкозе или гипергликемию натощак.

Уровень глюкозы в крови повышается также *при некоторых заболеваниях печени* (10 - 30% при циррозе печени), гемохроматозе (пигментном циррозе печени).

У больных уреимией на фоне легкой гипергликемии натощак отмечается высокая гипергликемия после еды.

Выделяют гипергликемии центрального происхождения - вследствие механического, токсического, гипоксического раздражения клеток головного мозга, особенно продолговатого, на дне IV желудочка которого расположен «сахарный» центр. Неврогенные ГГК наблюдаются при травме головного мозга,

тромбозе мозговых сосудов, внутричерепном кровоизлиянии, энцефалите, шоке, а также при наркозе, тяжелой интоксикации, лихорадке, эклампсии беременных, энцефалопатиях и некоторых других состояниях. К группе неврогенных относится и «эмоциональная, стрессовая» гипергликемия.

Повышение концентрации глюкозы в крови отмечается в результате парентерального введения углеводов (например, внутривенного вливания раствора глюкозы), а также при введении гормональных препаратов - кортикостероидов, кортикотропина; диуретиков, гипотензивных средств, салицилатов и других препаратов, блокирующих процессы фосфорилирования глюкозы.

При острых расстройствах кровообращения (в частности, при инфаркте миокарда) иногда возникает значительная гипергликемия.

Гипогликемия (ГПГ) - снижение содержания глюкозы в крови — чаще всего связана с абсолютным или относительным повышением уровня инсулина в крови, то есть может быть инсулярной и экстраинсулярной.

Гиперинсулинемия ингибирует гликогенолиз и тормозит процессы глюконеогенеза. Снижение продукции глюкозы в условиях продолжающейся утилизации ее мозгом и другими тканями приводит к гипогликемии.

Первичная гиперинсулинемия (абсолютная, инсулярная) наблюдается при заболеваниях поджелудочной железы, сопровождающихся гиперсекрецией инсулина (гиперплазия бета-клеток островков Лангерганса, инсулинпродуцирующие опухоли островков поджелудочной железы - инсулиномы). *Гипогликемические состояния отмечаются у детей, рожденных от женщин, страдающих сахарным диабетом. Причиной этого является то, что повышение содержания глюкозы в крови матери передается плоду, и это вызывает у него гиперплазию бета-клеток островков Лангерганса (гиперинсулинизм, инсулинома), сохраняющуюся после рождения и вызывающую усиленную продукцию инсулина.*

Вторичная гиперинсулинемия (относительная, экстраинсулярная) развивается при недостаточной выработке контринсулярных гормонов, к ней приводят превышенная дозировка инсулина в процессе лечения (быстрое снижение

концентрации глюкозы в крови больного приводит к развитию гипогликемической комы, тогда как при медленном уменьшении ее коматозное состояние не возникает даже при таких низких концентрациях глюкозы, как 1,1 ммоль/л.), нарушение режима кормления.

Нередко нервные и физические перегрузки, интеркуррентные заболевания, нарушения функции печени, желудочно-кишечного тракта, гипоталамуса, надпочечников при сахарном диабете изменяют чувствительность тканей к инсулину, обуславливая снижение уровня глюкозы в крови.

Внепанкреатическая гипогликемия отмечается в результате нарушения баланса между выраженностью процессов гликогенолиза и глюконеогенеза в печени при острых и хронических гепатитах, циррозах, острой и подострой дистрофии печени, гликогенозах (гепатомегалия), отравлениях мышьяком, фосфором, при длительной механической желтухе, первичном или метастатическом раке печени. Ослабление реакции на адреналин и глюкагон позволяет отделить печёночную гипогликемию от непечёночной, при которой печень реагирует на эти гормоны подъемом глюкозы в крови.

Снижение концентрации глюкозы в крови часто наблюдается при раке пищевода и других злокачественных опухолях внепанкреатической локализации (фиброма, фибросаркома, нейрома и т.д. - эти опухоли или продуцируют инсулиноподобное вещество, или стимулируют β -клетки, или слишком интенсивно поглощают глюкозу для гликолиза), а также при неукротимой рвоте, анорексии, почечном диабете, обильной лактации и глюкозурии у беременных. Гипогликемия может возникать при поражении желудка и кишечника, она часто обнаруживается после резекции желудка в случаях развития демпинг-синдрома, когда вследствие быстрого всасывания пищи из кишечника сначала обнаруживается кратковременная гипергликемия, а затем, в результате выброса инсулина, - гипогликемия; при хирургическом удалении части тонкого кишечника; при нарушении всасывания глюкозы в кишечнике (энтериты, энтероколиты, синдром мальабсорбции, целиакия, муковисцидоз, дисбактериозы, длительные поносы), лихорадке, интенсивной физической работе, голодании, переохлажде-

нии. При непереносимости сахаров (в частности, фруктозы) из-за врожденного дефицита ферментов тормозится процесс печеночного глюконеогенеза и подавляется гликогенолиз, что приводит к развитию гипогликемии.

Гипогликемия сопровождается многие эндокринные заболевания, в том числе гипопитарную и надпочечниковую недостаточность, гиподисфункцию щитовидной железы (микседема), патологию вилочковой железы.

Гипогликемия может быть центрального происхождения вследствие перенесенных психических травм, энцефалита, субарахноидального кровоизлияния, опухоли мозга.

Встречается и спонтанная гипогликемия, возникающая после кратковременной алиментарной гипергликемии, вызванной обильным потреблением пищи, богатой углеводами и т. д..

Гипогликемия, сопровождающаяся кетозом, обнаруживается у новорожденных вследствие дефицита аминокислоты аланина, при непереносимости аминокислоты лейцина, индуцирующей секрецию инсулина.

Выраженные нарушения углеводного обмена наблюдаются, в частности, при кетозах у крупного рогатого скота. При этом отмечается снижение концентрации глюкозы в крови (гипогликемия) с повышением концентрации кетонных тел (гиперкетонемия). Гипогликемия отмечается также и при родильном парезе, атониях преджелудков у коров.

ТАБЛИЦА ПЕРЕВОДА ТРАДИЦИОННЫХ БИОХИМИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ СЫВОРОТКИ КРОВИ ЖИВОТНЫХ В СИСТЕМУ СИ

<i>Показатели</i>	<i>Традиционные единицы</i>	<i>Коэффициент, перевода</i>	<i>Единицы СИ</i>
Глюкоза	мг%	0,0565	ммоль/л
Общий белок	г%	10	г/л
Билирубин общий	мг%	17,104	мкмоль/л
Холестерин общий	мг%	0,0259	ммоль/л

щий			
Кальций общий	мг%	0,2495	ммоль/л
Фосфор неорганический	мг%	0,3229	ммоль/л
Магний	мг%	0,4113	ммоль/л
Железо	мкг%	0,1791	мкмоль/л
Каротин	мкг%	0,0186	мкмоль/л
Витамин А	мкг%	0,0349	мкмоль/л
Кетоновые тела	мг%	0,01	г/л
Пировиноград- ная кислота	мг%	113,6	мкмоль/л
Лимонная кислота	мг%	52,05	мкмоль/л
Молочная кислота	мг%	0,111	ммоль/л
Мочевина	мг%	0,1665	ммоль/л
Креатинин	мг%	88,4	мкмоль/л
Индикан	мг%	39,79	мкмоль/л
Общие липиды	мг%	0,01	г/л
Триацилглице- риды	мг%	0,011	ммоль/л
Фосфолипиды	мг%	0,01	г/л
Фибриноген	мг%	0,0293	мкмоль/л
Церулоплазмин	мг%	0,066	мкмоль/л
Медь	мкг%	0,157	мкмоль/л
Цинк	мг%	0,153	мкмоль/л
Калий	мг%	0,255	ммоль/л
Натрий	мг%	0,435	ммоль/л
Тироксин	мкг/л	1,3	нмоль/л
Кортизол	мкг/л	2,8	нмоль/л
Тестостерон	мкг/л	3,5	нмоль/л
Прогестерон	мкг/л	3,2	нмоль/л
Адреналин	мкг/л	5,5	нмоль/л

Использованная литература

1. Цыганенко А.Я., Жуков В.И., Мясоедов В.В., Завгородний И.В. Клиническая биохимия (Учебное пособие для студентов медицинских вузов). - Москва. «Триада-Х». – 2002. -504 с.
2. Клиническая биохимия / Под ред. В.А. Ткачука. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2002, 2004 – 360 с.
3. Никулин Б.А. Пособие по клинической биохимии / Под ред. Л.В. Акуленко. - М.: ГЭОТАР-Медиа, 2007. - 256 с.
4. Методы ветеринарной клинической лабораторной диагностики: Справочник / Под ред. И.П. Кондрахина. – М.: КолосС, 2004. – 520 с.
5. Справочник по клиническим лабораторным тестам. М.: «Агат-МЕД», 2001. - 256 с.
6. Назаренко Г.И., Кишкун А.А. Клиническая оценка результатов лабораторных исследований. 2-е изд., стереотипное. – М.: Медицина, 2002, - 544 с.
7. Камышников В.С. Клинико-биохимическая лабораторная диагностика: Справочник в 2-х томах. 2-е изд. – Мн.: Интерпрессервиз, 2003. –т.1 – 495 с., т. – 463 с.
8. Зайцев С.Ю., Конопатов Ю.В. Биохимия животных. Фундаментальные и клинические аспекты: Учебник. – СПб.: Изд-во «Лань» , 2004. – 384 с.
9. Внутренние незаразные болезни крупного рогатого скота / Под ред. П.С. Ионова. – 4-е изд., перераб. и доп. – М.: Агропромиздат, 1985. – 383 с.
10. Лабораторные методы исследования в клинике: Справочник / Меньшиков В.В. Делекторская Л.Н., Золотницкая Р.П. и др. / Под ред. В.В. Меньшикова. – М.: Медицина, 1987. – 368 с.

11. Алиев А.А. Обмен веществ у жвачных животных – М.: НИЦ «Инженер», 1997. – 419 с.
12. Бикхард К. Клиническая ветеринарная патофизиология. / Пер. с нем. В. Пулинец. – М.: «Аквариум ЛТД», 2001. – 400 с.
13. Патологическая физиологии. Учебник / Под ред. А.Г. Савойского, В.Н. Байматова. –Уфа: Информреклама, 2004. – 496 с.
14. Уша Б.В., Беляков И.М., Пушкарев Р.П. Клиническая диагностика внутренних незаразных болезней животных: Учебник. - М.: КолосС, 2003. – 478 с.
15. Долгов В.В., Ованесов Е.Н., Щетникович К.А. Фотометрия в лабораторной практике. СПб.: «Витал Диагностикс СПб», 2004. – 192 с.
16. Болезни собак и кошек. Комплексная диагностика и терапия собак и кошек: учебное пособие/ Т.К. Донская и др.; под рук. С.В. Старченкова, СПб.; Специальная литература, 2006. – 655 с.

СОДЕРЖАНИЕ

Введение.....	3
СУБСТРАТ – ОБЩИЙ БЕЛОК СЫВОРОТКИ КРОВИ.....	5
Определение общего белка в сыворотке крови рефрактометрическим методом.....	5
Определение общего белка в сыворотке крови колориметрическим методом с биуретовым реактивом.....	8
Проба на коллоидоустойчивость белков сыворотки крови.....	15
СУБСТРАТ – МОЧЕВИНА СЫВОРОТКИ КРОВИ.....	19
Определение мочевины в сыворотке крови по реакции с диацетилмонооксимом.....	19
СУБСТРАТ – БИЛИРУБИН СЫВОРОТКИ КРОВИ.....	26
Определение концентрации общего и прямого билирубина в сыворотке крови методом Йендрассика-Грофа.....	27
СУБСТРАТ – КРЕАТИНИН СЫВОРОТКИ КРОВИ.....	32
Определение креатинина в сыворотке крови методом Яффе с депротеинизацией.....	32
СУБСТРАТ – ГЛЮКОЗА СЫВОРОТКИ КРОВИ.....	38
Определение глюкозы в сыворотке крови глюкозооксидазным методом.....	38
Таблица перевода традиционных биохимических показателей сыворотки крови животных в систему СИ.....	48

Учебное издание

Крапивина Елена Владимировна

Клиническая биохимия

МЕТОДИЧЕСКОЕ УКАЗАНИЕ К ЛАБОРАТОРНО-ПРАКТИЧЕСКИМ ЗАНЯТИЯМ
ДЛЯ СТУДЕНТОВ ФАКУЛЬТЕТА ВЕТЕРИНАРНОЙ МЕДИЦИНЫ И БИОТЕХНОЛОГИИ
ПО СПЕЦИАЛЬНОСТИ 310800-«Ветеринария»

Редактор Лебедева Е.М.

Подписано к печати 28.09.2009 г. Формат 60 x 84 1/16.
Бумага офсетная. Усл. п. л. 3,02. Тираж 100 экз. Изд. № 1485.

Издательство Брянской государственной сельскохозяйственной академии
243365, Брянская обл. Выгоничский район, с. Кокино, Брянская ГСХА