

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ  
ЗАКЛАД ВИЩОЇ ОСВІТИ «ПОДІЛЬСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ УНІВЕРСИТЕТ»  
ФАКУЛЬТЕТ ВЕТЕРИНАРНОЇ МЕДИЦИНИ І ТЕХНОЛОГІЙ  
У ТВАРИННИЦТВІ

*Кафедра гігієни тварин та ветеринарного  
забезпечення кінологічної служби НПУ*

## **МЕТОДИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ**

до практичних занять з дисципліни

### **«СУЧАСНІ БІОХІМІЧНІ МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ У ВЕТЕРИНАРНІЙ МЕДИЦИНІ»**

для здобувачів вищої освіти III (освітньо-наукового) рівня вищої освіти за  
спеціальністю 211 «Ветеринарна медицина»

освітня кваліфікація: Доктор філософії з ветеринарної медицини



**м. Кам'янець-Подільський**

**2023**

**УДК 619:616**

**Укладач:**

**Тетяна СУПРОВИЧ,**

доктор сільськогосподарських наук, професор; завідувачка кафедри гігієни тварин та ветеринарного забезпечення кінологічної служби НПУ

*Рекомендовано до друку науково-методичною радою  
Закладу вищої освіти «Подільський державний університет»  
(протокол № 9 від 21.11. 2023 р.)*

**Рецензенти:**

**Микола КУХТИН,**

доктор ветеринарних наук, професор, завідувач кафедри харчової біотехнології і хімії Тернопільського національного технічного університету імені Івана Пулюя.

**Юлія ГОРЮК,**

доктор ветеринарних наук, доцент, доцент кафедри ветеринарного акушерства, внутрішньої патології та хірургії Закладу вищої освіти «Подільський державний університет»

Методичні рекомендації до практичних занять з дисципліни «Сучасні біохімічні методи досліджень у ветеринарній медицині» для здобувачів вищої освіти III (освітньо-наукового) рівня вищої освіти за спеціальністю 211 «Ветеринарна медицина». Освітня кваліфікація: Доктор філософії з ветеринарної медицини / Т.М. Супрович. Кам'янець-Подільський, ЗВО ПДУ. 2023. 52 с.

Методичні рекомендації розроблені з метою закріплення практичних навичок з проведення клініко-лабораторних досліджень різноманітного біологічного матеріалу, отриманого від хворих тварин, та вірної інтерпретації результатів цих досліджень.

© ЗВО ПДУ, 2023

## ЗМІСТ

Вступ .....	4
ТЕМА1. Обмін білків при патології внутрішніх органів.....	5
ТЕМА2. Дослідження активності ферментів .....	14
ТЕМА3. Дослідження вуглеводного обміну .....	27
ТЕМА 4. Дослідження мінерального обміну .....	35
Список використаних джерел .....	54

## ВСТУП

Дисципліна «Сучасні біохімічні методи досліджень у ветеринарній медицині» є вибірковою компонентою науково-фахового спрямування освітньо-наукового ступеня «Доктор філософії» на базі ОС «Магістр» за спеціальністю 211 «Ветеринарна медицина».

Мета вивчення предмету є формування цілісного уявлення про біохімічні та молекулярно-біологічні механізми функціонування організму тварин в нормі та при патологічних процесах, методи діагностики та шляхи корекції патологічних процесів за допомогою біомолекул та фізіологічно-активних речовин.

Предметом вивчення навчальної дисципліни є біохімічні процеси в організмі в нормі та при різних захворюваннях, молекулярні механізми формування патологічних станів, на яких базуються принципи та методи їх лабораторної діагностики, прогнозування та контролю перебігу захворювань, новітні досягнення в галузі клінічної біохімії та лабораторної діагностики.

В результаті вивчення дисципліни здобувачі мають поглибити професійні знання, підвищити рівень умінь та навичок, формування досвіду науково-дослідницької роботи з ветеринарної клінічної біохімії.

## ТЕМА1. ОБМІН БІЛКІВ ПРИ ПАТОЛОГІЇ ВНУТРІШНІХ ОРГАНІВ

***Мета:** Вивчити клінічну лабораторну діагностику при порушеннях білкового обміну. Розширити знання про кінцевий обмін білка та його значення для діагностики захворювань.*

Білки є основною і найбільш важливою структурною частиною живих організмів. Порушення обміну білків спричинюється різними факторами: недостатнім протеїновим живленням; надмірною білковою годівлею, особливо на фоні нестачі інших компонентів живлення, зокрема цукру; порушенням перетравлювання білків у шлунку, кишечнику і всмоктування амінокислот; порушенням синтезу білків в організмі та виділення кінцевих продуктів їх обміну – аміаку, сечовини, креатиніну, сечової кислоти; порушенням обміну білків між печінкою і кров'ю; підвищеною потребою в білках при вагітності, лактації, стрес-факторах та різних хворобах; втратою білків при різних хворобах; порушенням обміну амінокислот в органах і тканинах.

Для діагностики порушень білкового обміну досліджують уміст загального білка та його фракцій у сироватці крові, визначають наявність білка в сечі, уміст сечовини і креатиніну в сироватці крові. Досить показовими є колоїдно-осадові проби, які можуть вказувати на зниження стабільності сироваткових білків унаслідок збільшення вмісту грубодисперсних глобулінів і білків, не властивих здоровому організму. Тому при додаванні до сироватки крові сольових розчинів виникає помутніння, а в осад випадають грубодисперсні глобуліни. Найбільш поширеними при вивченні диспротеїнемії, особливо за наявності гіпоальбумінемії, є проби із сулемою, міді сульфатом, формолова, тимолова, Вельтмана, Гайєма.

### Визначення фракцій білків

***Метод горизонтального електрофорезу на пластинах поліакриламідного гелю***

***Принцип методу.*** Електрофорез – це процес розділення заряджених частин в електричному полі. Принцип електрофорезу оснований на тому, що біологічні макромолекули в розчині можуть існувати в зарядженій формі у вигляді катіонів («+») та аніонів («-»). Поділ білків на типи базується на тому, що суміш молекул білків у пробі під дією електричного поля розділяється на декілька фракцій залежно від електричного заряду, молекулярної маси, розміру та форми білків.

Розмір білкових молекул, розчинність білків, електричний заряд та інші фізико-хімічні властивості визначають участь білків у процесах обміну речовин і функціях організму.

Для визначення молекулярної маси мономерів використовують електрофорез у поліакриламідному гелі в присутності додецилсульфату натрію, який забезпечує розділення олігомерного білка на окремі мономери (субодиниці), оскільки досліджуваний білок може бути лише в незначній кількості у складі супутніх білків і продуктів їх деградації або містити білки з подібними властивостями. Додецилсульфат натрію додають з метою лізису клітинних мембран. Також він інтенсивно порушує водневі та гідрофобні зв'язки в молекулах білків, розчиняє нерозчинні білки. Комплекси білка з додецилсульфатом натрію набувають значного негативного заряду завдяки сульфогрупам іона додецилсульфату. Використання стандартних маркерів дає можливість одержані фракції білків порівнювати зі стандартними білками.

Сьогодні найчастіше використовується електрофорез у поліакриламідному гелі (ПААГ). Це метод розділення білків, у якому в якості носія використовується розділяюча система з поліакриламідом. Вміст білка в пробі повинен бути: ~ 150–250 мкг при проведенні електрофорезу без детергентів; ~ 75–100 мкг при проведенні електрофорезу з детергентами.

#### *Приготування реактивів для гель-електрофорезу в ПААГ*

1. 40 % розчин акриламідом (АА) – 38,6 г акриламідом розчиняють при температурі 60–70 °С у невеликій кількості води, додають 1,4 г N<sub>1</sub>N<sub>1</sub>'-метиленабісакриламідом, охолоджують до температури 20-22 °С і доводять об'єм водою до 100мл.

2. 1,5 М Тріс-НСІ – 36,6 г Тріса розчиняють у невеликій кількості води при температурі 60-70 °С; охолоджують до температури 20-22 °С, встановлюють рН 8,9 (8,8-9,0) шляхом додавання НСІ (концентрованої, 0,6-0,8 мл), доводять об'єм водою до 100 мл.

3. 0,5 М Тріс-НСІ – 5,98 г Тріса розчиняють в 50-60 мл води при температурі 60-70 °С; охолоджують до температури 20-22 °С, встановлюють рН 6,8 (6,7-6,9) шляхом додавання НСІ (концентрованої, 0,3-0,4 мл), доводять об'єм водою до 100 мл.

4. Амонію або калію персульфат 10 % (ПСА) – 100 мг амонію або калію персульфату розчиняють в 0,7-0,8 мл води, доводять об'єм до 1 мл. Розчин амонію персульфату готують безпосередньо перед початком приготування гелю, оскільки реактив у розчині не стійкий; розчин калію персульфату стійкий, однак при пониженій температурі швидко кристалізується.

5. 40 % розчин сахарози або гліцерину – 40 г сахарози розчиняють в 70-80 мл води при температурі 80-90 °С, охолоджують до температури 20-22 °С, доводять об'єм водою до 100 мл; 40 мл гліцерину розчиняють в 60 мл води.

6. Електродний буфер (рН 8,3) – 0,6 г Тріса і 2,88 г гліцину розчиняють в 1 л води.

7. 1,0 % розчин амідочорного 10 Б – 1 г амідочорного 10 Б розчиняють в 100 мл 5-7 % оцтової кислоти; 0,1 % розчин брильянтового голубого – 100 мг брильянтового голубого розчиняють в 100 мл 5-7 % оцтової кислоти.

8. 0,01 % розчин бромфенолового синього – 10 мг бромфенолового синього в 1 мл електродного буфера.

ДСН, 2-МЕ використовують при потребі встановлення молекулярних мас білків, розділенні макромолекул на складові.

#### *Техніка формування гелю*

Товщина пластини гелю 1 мм, об'єм камери для формування гелю — 22–25 мл.

Таблиця 1 – Схема приготування гелю

Реактиви (мл)	концентруючий гель	% концентрація розділяючого гелю			
		7,5	10	12,5	15
АА	0,5	4,125	5,5	6,86	8,25
Тріс 1,5	0,5	4,125	5,5	6,86	8,25
ТЕМЕД	0,005	0,0136	0,0176	0,022	0,027
ПСА	0,1	0,136	0,176	0,22	0,27
ДСН	0,05	—	—	0,25	—
Вода	3,8	13,6	10,76	7,8	5,2

Приготовані реактиви змішують у пропорціях, відповідно до прописів, завдання і мети досліджень. Для уникнення передчасної полімеризації гелю ПСА або ТЕМЕД вносять у суміш реактивів в останню чергу. Реактиви перемішують і заливають в камеру для формування гелю. Оскільки полімеризація гелю відбувається без доступу повітря на рідкий гель нашаровують воду (~ 0,5мл). Тривалість полімеризації ~ 30–45 хв. Гель полімеризується швидше при інтенсивному освітленні та підвищеній температурі. При появі чіткої межі між сформованим гелем і водою, останню відсмоктують. Наносять концентруючий гель (швидко полімеризується!). Послідовність внесення реактивів така ж як для розділяючого гелю. В концентруючому гелі формують лунки для внесення проб білка за допомогою гребінки, вставляючи її в рідкий гель. Після полімеризації гелю, гребінку витягують. Камера з гелем готова для розділення білків.

#### *Підготовка проб білка*

Вміст білка в пробі повинен бути:

- ~ 150-250 мкг при проведенні електрофорезу без детергентів;
- ~ 75-100 мкг при проведенні електрофорезу з детергентами.

*Приклад.* Сироватку крові з вмістом білка 6,0-7,0 г% (60–70 г/л) розводять електродним буфером 1:10-12. Відбирають 0,1 мл суміші і додають таку ж кількість 40 % сахарози і 0,02 мл 0,01 % розчин бромфенолового синього. В лунки концентруючого гелю вносять 0,04–0,05 мл проби.

Для проведення електрофорезу у 12,5 % ДСН–ПААГ до супернатанту з досліджуваних тканин (0,1 мл) додають 0,1 мл 10 % ДСН і 0,01 мл 2-меркаптоетанолу та інкубують 10 хв при  $t$  100 °С, охолоджують та додають 0,1 мл 40 % розчину сахарози. У лунки концентруючого гелю вносять по 0,07 мл приготовлених зразків і маркерний барвник — 0,01 % розчин бромфенолового синього.

#### *Техніка проведення електрофорезу*

Камеру для електрофорезу збирають таким чином, щоб з двох боків від камери з сформованим гелем були відділення для внесення електродного буфера.

Досліджувані проби вносять:

1. зразу в сформовані лунки і зверху нашаровують електродний буфер;
2. заповнюють сформовані лунки електродним буфером, а потім підшаровують під нього досліджувані проби.

В електродні камери додають буфер до такого рівня, щоб він забезпечував проходження струму через гель. Підготовлену таким чином електрофоретичну камеру підключають до джерела живлення.

На пластину гелю подають:

- під час проходження проби білка через концентруючий гель ~ 25-30 мА;
- при проходженні проби білка через розділюючий гель ~ 45-50 мА.

Тривалість електрофорезу 90–120 хв. Закінчують електрофорез при досягненні маркерного барвника (бромфенолового синього) краю гелю. Виключають джерело живлення, витягують камеру з гелем, відділяють гель від скляних стінок камери, фіксують і фарбують розділені білки.

#### *Виявлення білкових зон*

Білкові зони, окремі білки виявляють шляхом фарбування фореграм з наступним вимиванням надлишку барвника. На фореграмі залишаються зафарбовані білкові смуги та прозорий не зафарбований гель. Фореграми перед фарбуванням доцільно фіксувати в 12,5 % трихлороцтовій кислоті для фіксації білків у гелі.

Фарбування білкових фракцій і білків:



- у 1,0 % розчин амідочорного 10 Б занурюють фореграму на 15–20 хв. Вимивають надлишок барвника шляхом вимочування фореграм у 5–7 % оцтовій кислоті.
- у 0,1 % розчин брильянтового голубого занурюють фореграму на 25–30 хв. Вимивають надлишок барвника шляхом вимочування фореграм у 5–7 % оцтовій кислоті. Чутливість методу в 100 раз вища від попереднього.

#### *Кількісний аналіз білкового спектру*

Найбільш простим та стандартизованим методом визначення вмісту білків у загальному спектрі є аналіз фореграм за допомогою приладу АФ-1.

Крім цього способу, існують:

- елюції барвника, зв'язаного з білком – вирізання білкових смуг та вимивання барвника, зв'язаного з білком лугом і наступне визначення екстинції проб;
- визначення вмісту білків шляхом комп'ютерної обробки фореграм і використання спеціалізованого програмного забезпечення для підрахунку вмісту білків.

*Інтерпретація.* При електрофорезі білків сироватки крові в 7,5 % ПААГ залежно від заряду, величини молекул і рухливості виділяють до 30 фракцій, серед яких найінформативнішими є альбуміни та глобуліни (альфа-, бета-, гамма-). Альбуміни синтезуються у печінці і становлять значну частину білків протоплазми майже всіх клітин. Молекулярна маса альбумінів складає 67000–70000 дальтон. Альбуміни виконують важливу роль у транспорті різних речовин, зокрема тих, які погано розчинені у воді. Вони регулюють вміст іонів  $\text{Ca}^{2+}$ , стероїдних гормонів, триптофану, деяких лікарських препаратів (дикумарину, пеніциліну, аспірину), утворюючи комплекси з цими речовинами. Альбуміни можуть зв'язувати токсичні речовини (феноли, похідні індола, лізолецитин та інші) і сприяти їх виведенню з організму.

Молекулярна маса глобулінів 900000-1500000 дальтон. Вони більш грубодисперсні та менш гідрофільні, ніж альбуміни, що пояснюється меншою стійкістю їх колоїдних розчинів. За хімічним складом глобуліни містять більше гліцину і меншу кількість сірковмісних амінокислот. Вони виявляються не тільки в плазмі, але й в інших рідинах та тканинах організму: сечі, лікворі, лімфатичних вузлах, селезінці та інших. У мозку виявляють альбуміни та глобуліни, які за своїми фізико-хімічними властивостями дещо відрізняються від аналогічних білків сироватки крові, тому називаються нейроальбумінами і нейроглобулінами. У складі  $\alpha$ -глобулінів виявлено  $\alpha_1$ -антитрипсин, який є сироватковим інгібітором трипсину і хімотрипсину, а також  $\alpha_1$ -антихімотрипсин

і  $\alpha$ -трипсинінгібітор, церулоплазмін — білок  $\alpha_2$ -глобулінової фракції, містить у своєму складі 0,34 % міді, є медіатором вмісту і транспорту цього елемента, має оксидазну активність. Бета-глобулінова фракція містить, як основний компонент, трансферин, який бере участь у регуляції вмісту вільного заліза в плазмі, запобігаючи надмірному нагромадженню його в тканинах і втраті з сечею. Це також протеїни переносу ліпідів, вуглеводів, стероїдних гормонів, деяких вітамінів і мінеральних речовин. Вважається, що 2 % антитіл знаходяться в групі бета-глобулінів, що пояснює злиття піків бета- та гамма-глобулінів на електрофоретичній кривій. Гамма-глобулінова фракція містить 98 % антитіл сироваткових білків, які відіграють важливу роль у процесах імунітету. Гамма-глобуліни і антитіла мають ідентичні фізико-хімічні властивості тому їх вважають фракцією імуноглобулінів. Відносне збільшення в сироватці крові кількості цієї фракції може бути показником наявності в ній антитіл.

Таблиця 2 – Вміст білкових фракцій у сироватці крові тварин (%)

Білкові фракції	Велика рогата худоба		Коні	Вівці	Кози	Свині	Собаки	Коти
	дорослі тварини	телята						
Альбуміни	40–50	40–60	35–45	40–50	38–50	35–45	45–57	45–60
$\alpha$ -глобуліни	10–20	7–13	12–18	13–20	7–18	15–22	10–16	8–15
$\beta$ -глобуліни	8–16	5–10	15–25	7–12	10–19	16–20	18–25	10–20
$\gamma$ -глобуліни	25–40	15–35	16–24	20–35	20–34	18–25	10–14	8–18

Співвідношення між альбумінами і глобулінами в організмі людини і тварин завжди є важливою характеристикою його фізіологічного стану. Альбуміно-глобуліновий коефіцієнт (А/Г-коефіцієнт) дорівнює 0,7–1,0.

При проведенні електрофорезу у 12,55 ДСН–ПААГ ідентифікацію білків проводять за допомогою стандартного набору маркерів з відомими молекулярними масами (кДа).

*Збільшення кількості альбумінів у крові буває рідко, носить відносний характер і пов'язано з дегідратацією.*

*Зменшення кількості альбумінів (гіпоальбумінемія) буває при білковому голодуванні, гастроентеритах, нефрозах та нефритах, хворобах печінки (гепатитах, гепатодистрофіях, абсцесах, цирозах, пухлинах), крововтратах, ракових кахексіях, при гарячках, травмах та після хірургічних втручань.*

*Збільшення кількості  $\alpha$ -глобулінів спостерігається при гострих запальних процесах і загостренні хороб з хронічним перебігом.*

*Зменшення кількості  $\alpha$ -глобулінів* буває при такому перебігу хвороб печінки, зляжкісних утвореннях, зокрема лімфолейкозах.

*Збільшення кількості  $\beta$ -глобулінів* спостерігається при хронічних запальних процесах, хворобах нирок (нефроз, гломерулонефрит), хворобах печінки (цироз, токсичне ураження печінки), крупозній пневмонії, ендокардитах, кахексії.

*Зменшення кількості  $\beta$ -глобулінів* буває при тяжких перебігах хвороб печінки.

*Збільшення кількості  $\gamma$ -глобулінів* відмічено при хворобах печінки (гепатит, гепатоз, цироз), хворобах органів сечовиділення (пієлонефрит, пієліт, цистит), тривалому перебігу септичного процесу та імунологічних реакціях після вакцинації чи бактеріальній інфекції, інфекційних хворобах.

*Зменшення кількості  $\gamma$ -глобулінів* реєструється у новонароджених (фізіологічний імунодефіцит), ураженні імунної системи (лімфолейкоз), інтоксикації, лікуванні імунодепресантами, цистостатиками (вторинна гіпогаммаглобулінемія) при нефрозах, ентеритах, хронічній кровотечі.

### ***Нефелометричний метод***

*Принцип методу.* Різні білкові фракції сироватки крові здатні осаджуватись фосфатними розчинами певної концентрації. При цьому, утворюється дрібний осад і розчин мутніє. У залежності від ступеню мутності розчину за допомогою фотоелектроколориметра встановлюють концентрацію білка у досліджуваній пробі.

*Реактиви.* 1. Основний фосфатний розчин. 33,5 г гідроксиду натрію (ч. д. а., х. ч.) розчиняють у 400 мл дистильованої води, додають 226,8 г фосфату калію ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , ч. д. а., х. ч.). Після розчинення охолоджують до кімнатної температури і додають дистильовану воду до об'єму 500 мл.

2. Робочі фосфатні розчини. У мірні колби на 100 мл беруть 92,4 мл (№ 1), 74,9 мл (№ 2), 58,8 мл (№ 3), 48,7 мл (№ 4) основного фосфатного розчину і доводять об'єм дистильованою водою до мітки. Ретельно перемішують струшуванням. При зберіганні розбавлених розчинів для попередження бактеріального забруднення додають по одній краплі хлороформу на 100 мл розчину.

*Обладнання.* Фотоелектроколориметр; хімічні пробірки; піпетки на 1, 2, 5, 10 мл, бюретка; мірні колби на 100 і 500 мл.

*Хід визначення.* На кожену пробу сироватки крові в штатив встановлюють по 6 пробірок, які маркують № 0, 1, 2, 3, 4 і 5. У пробірку № 0 вносять 10 мл дистильованої води, у пробірки № 1, 2, 3 і 4 – по 5 мл відповідних робочих фосфатних розчинів (№ 1-4). У пробірку № 5 вносять 0,5 мл сироватки крові, 0,75

мл дистильованої води і 3,75 мл основного фосфатного розчину, закривають корками і перемішують шляхом її перевертання 5-6 разів. Після цього переносять по 0,5 мл суміші у пробірки № 1, 2, 3, 4 і 1 мл у пробірку № 0. Вмістиме пробірок ретельно перемішують, при цьому, запобігаючи утворенню пухирців повітря. Через 15 хв вимірюють на фотоелектроколориметрі оптичну щільність (E) розчинів при червоному світлофільтрі в кюветі з товщиною оптичного шару 1 см проти контролю (проба № 0). Вимірювання проводять у зворотній послідовності – спочатку в пробірці № 4, а потім у пробірках № 3, 2 і 1.

Розрахунок проводять за формулою:

$$\begin{aligned} E \text{ пробірки } \# 1 - E \text{ пробірки } \# 2 &= E \text{ альбумінів,} \\ E \text{ пробірки } \# 2 - E \text{ пробірки } \# 3 &= E \alpha\text{-глобулінів,} \\ E \text{ пробірки } \# 3 - E \text{ пробірки } \# 4 &= E \beta\text{-глобулінів,} \\ E \text{ пробірки } \# 4 &= E \gamma\text{-глобулінів.} \end{aligned}$$

Приймаючи суму E альбумінів і E всіх глобулінових фракцій за 100 %, вираховують вміст кожної фракції у відсотках. Знаючи вміст загального білка сироватки крові, можна здійснити перерахунок в абсолютні величини.

### ***Визначення вмісту альбуміну в сироватці крові***

Сироватковий альбумін представляє собою білок, утворений довгим поліпептидним ланцюгом, який включає 582 амінокислотних залишки.

Існуючі методи преципітації та кількісного визначення альбуміну ґрунтуються на особливостях фізико-хімічних та інших молекулярних властивостей: розчинності, електрофоретичної рухливості, специфічної взаємодії з антитілами та індикаторами.

Особливої уваги заслуговує методологічний підхід, що базується на здатності етанольного розчину трихлороцтової кислоти певної концентрації вибірково преципітувати і осаджувати всі глобуліни, залишаючи в надосадовій рідині фракцію альбуміну, який може бути визначеним з використанням біуретової реакції.

Сучасні методи кількісного визначення альбуміну є імунохімічними: імунопреципітація за Манчіні, імунотурбідиметрія, імунонефелометрія, електро- і радіоімунологічні методи.

*Метод імунопреципітації за Манчіні.* Метод базується на реакції «антиген–антитіло», дозволяє достовірно досліджувати вміст альбуміну сироватки крові при використанні антисироватки до альбуміну. Проте, точне вимірювання

діаметру кільця преципітації та переведення його у кількісні значення є проблематичним.

*Електроімунологічний метод.* Електроімунологічний метод або кількісний імуноелектрофорез є досить точним методом. Міжнародна федерація клінічної хімії (IFCC) затвердила його як референтний метод (відтворюваність в серії зазвичай не перевищує 1,5 %).

*Імунотурбідиметричний метод.* Реалізація принципів імунохімії та останніх досягнень аналітичного приладобудування дозволила встановлювати кінетику утворення комплексу «антиген–антитіло» безпосередньо в розчині, на чому ґрунтується імунотурбідиметричний метод визначення альбуміну. Метод імунохімії може бути реалізований на будь-якому спектрофотометрі, який дозволяє виконувати дослідження в режимі турбідиметрії при 340 нм. Швидкість визначення (2 хв), добра відтворюваність і легкість виконання роблять цей метод найбільш доступним для застосування в клінічній практиці.

При дослідженні рівня альбуміну за допомогою імунофлюоресцентних методів використовується принцип вимірювання інтенсивності свічення мітки, ковалентно пов'язаної з альбуміном. Зв'язування альбуміну з антисироваткою сприяє гасінню флюоресценції.

В останні роки значна увага приділяється використанню клініко-лабораторній практиці прямих колориметричних методів, в основі яких лежить утворення зафарбованого комплексу при взаємодії альбуміну із барвниками (індикаторами рН). Зміна інтенсивності зафарбування розчину при взаємодії таких барвників з альбуміном називають «білковим відхиленням індикатора». В якості барвників застосовують бромкрезоловий зелений, бромфеноловий голубий, конгорот, еозин, метилоранж, НАВА (два останніх для визначення альбуміну в наш час практично не використовують). Найбільш широкого застосування знайшов метод з бромкрезоловим зеленим.

### **Контрольні запитання**

1. Білок і його фізико-хімічні властивості.
2. Біологічна роль білка.
3. Потреба організму в білках. Азотистий баланс.
4. Білковий обмін та його порушення.
5. Регуляція білкового обміну.
6. Кількісне визначення сечовини та амоніаку в біологічних рідинах.
7. Гіпопротеїнемія та гіперпротеїнемія.

## ТЕМА 2. ДОСЛІДЖЕННЯ АКТИВНОСТІ ФЕРМЕНТІВ

**Мета:** Ознайомити здобувачів з методиками визначення індикаторних ферментів при патології тварин.

**Ферментодіагностика** – це дослідження активності ферментів у біологічних субстратах (сироватка та плазма крові, сеча, слина, ліквор, шлунковий та кишковий сік, кал, тканини органів і систем та інші) з метою постановки діагнозу. Ензимодіагностика є одним із найважливіших і об'ємних розділів клінічної ферментології.

Основні завдання ферментодіагностики – це дослідження активності ферментів для ранньої постановки діагнозу, контролю за перебігом лікувального процесу, визначення прогнозу хвороби. Найчастіше активність ферментів досліджують у сироватці або плазмі крові. У них виділяють три групи ферментів: *клітинні, секреторні, екскреторні*. *Клітинні* ензими потрапляють у кров внаслідок відмирання клітин, підвищення проникності клітинних мембран. Залежно від локалізації в органах і тканинах, клітинні ферменти діляться на дві групи: *органоспецифічні* та *неспецифічні*. Органоспецифічні (індикаторні) містяться лише в одному органі, а неспецифічні – у багатьох органах і системах. До індикаторних ензимів належать, зокрема, аргіназа, сорбітолдегідрогеназа (СДГ), які локалізуються у печінці, а до неспецифічних – лактатдегідрогеназа (ЛДГ), яка міститься у клітинах різних органів і систем організму. Інколи ферменти складаються із кількох ізоферментів. Це є різновиди ферменту, які мають одну й ту саму субстратну специфічність, але різняться між собою деякими фізичними, хімічними, каталітичними та імунологічними властивостями. Ізоферменти локалізуються в різних органах. Так, ЛДГ має п'ять ізоферментів, кожний з яких розміщений у клітинах лише одного органа чи системи і при їх ураженні збільшує свою активність у сироватці крові.

### Визначення активності амінотрансфераз за методом Райтман-Френкеля

**Принцип методу.** В результаті переамінування, яке проходить під дією АЛАТ і АсАТ, утворюються щавелево-оцтова і піровиноградна кислоти, які при додаванні 2,4-динітрофенілгідразину утворюють в лужному середовищі забарвлені гідразони, що мають максимум поглинання при довжині хвилі 500-560 нм.

**Реактиви.** 1. 0,1 моль/л фосфатний буфер рН 7,4. Змішують 840 мл 0,1 М/л розчин гідрофосфату натрію (розчиняють 17,4 г  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  і доводять

- до 1 л дистильованою водою) і 160 мл 0,1 М/л розчину дигідрофосфату калію (розчиняють 13,6 г  $K_2HPO_4$  і доводять до 1 л дистильованою водою).
2. Субстрат для визначення АсАТ. 29,2 мг  $\alpha$ -кетоглутарової і 1,33 г L-аспарагінової кислот розчиняють в 5 мл 1 н. розчину NaOH і доливають фосфатним буфером рН 7,4 до 100 мл. Додають 1 краплю хлороформу і заморожують. Розморожують перед використанням.
  3. Субстрат для визначення АлАТ. 29,2 мг  $\alpha$ -кетоглутарової кислоти і 0,89 г L-аланіну розчиняють в 5 мл 1 н. розчину NaOH і доливають фосфатним буфером рН 7,4 до 100 мл. Додають 1 краплю хлороформу і заморожують. Розморожують перед використанням.
  4. 0,4 М (16 г/л) розчин NaOH або 0,4 М (22,4 г/л) розчин КОН.
  5. Розчин 2,4-динітрофенілгідразину. 19,8 мг реактиву розчиняють в 10 мл 1 н. розчину соляної кислоти при нагріванні, після охолодження доводять соляною кислотою до 100 мл.
  6. Стандартний розчин пірувату натрію – 2 ммоль/л.

*Хід визначення.* У пробірку вносять 0,25 мл субстратного розчину для АлАТ (або АсАТ), нагрівають при 37 °С протягом 3 хв, додають 0,05 мл сироватки крові та інкубують на водяній бані при 37 °С 60 хв. Додають 0,25 мл розчину 2,4-динітрофенілгідразину і витримують протягом 20 хв при кімнатній температурі. Додають 2,5 мл 0,4 М розчину лугу, перемішують і залишають для розвитку забарвлення на 10 хв при кімнатній температурі. Вимірюють оптичну густину на спектрофотометрі при довжині хвилі 500–560 нм (зелений світлофільтр) у кюветі 1 см проти контролю. Контроль обробляють як дослід, тільки замість сироватки додають 0,05 мл фізіологічного розчину.

Розрахунок активності ферментів у сироватці крові проводять за калібрувальним графіком (табл. 1).

Таблиця 1 – Побудова калібрувального графіка

№ пробірки	Стандартний розчин пірувату натрію	Фізіологічний розчин	Субстратний розчин, АлАТ/АсАТ	Активність ферменту (АсАТ, АлАТ)	
	мл	мл	мл	мккат/л	15моль/годхмл
1	0,05	0,1	0,45	0,28	1,0
2	0,1	0,1	0,4	0,56	2,0
3	0,15	0,1	0,35	0,83	3,0
4	0,2	0,1	0,3	1,11	4,0
5*	—	0,1	0,5	—	—

*Примітка:* \* — контрольна проба

У кожен пробірник вносять по 0,5 мл розчину 2,4-динітрофенілгідразину, струшують і витримують 20 хв при кімнатній температурі. Додають по 5 мл 0,4 М луку, перемішують і залишають для розвитку забарвлення на 10 хв при кімнатній температурі. Вимірюють оптичну густину на спектрофотометрі при довжині хвилі 500–560 нм (зелений світлофільтр) у кюветі 1 см проти контролю (проба № 5). На осі ординат відкладають знайдену величину оптичної густини, на осі абсцис — вміст піровиноградної кислоти калібрувальної проби, вираженої в мккат/л або в ммоль/(годхмл). За калібрувальною кривою знаходять значення активності АлАТ або АсАТ у сироватці крові.

Нормальні величини: для АлАТ, АсАТ – 0,028-0,190 мккат/л або 0,1-0,68 ммоль/(годхмл) при 37 С.

При активності ферментів вище 0,56 мккат/л аналіз слід повторити, розвівши сироватку фізіологічним розчином (результат множать на розведення).

При користуванні міжнародною системою оцінки активності ферментів слід застосовувати коефіцієнти переведення – 1 одиниця активності за Райтман-Френкелем дорівнює 16,67 Од/л або 278 нкатал/л.

*Інтерпретація.* Аспартатамінотрансфераза та аланінамінотрансфераза локалізуються у клітинах більшості органів і систем. Вони переносять аміногрупи від аспарагінової кислоти (АСТ) та аланіну (АЛТ) на альфакетоглутарову кислоту. Трансмінази не є специфічними тестами для оцінки стану окремих органів, тому необхідно визначити точне місце елімінації ферменту в кров. Обидва ферменти мають високу активність в цитоплазмі клітин (АСТ також у мітохондріях) і навіть при незначному пошкодженні тканин збільшують свою активність у сироватці (плазмі) крові.

Дослідження активності АСТ та АЛТ у сироватці крові використовують для діагностики хвороб печінки (гепатиту, гепатозу та ін.). Для великої та дрібної рогатої худоби і коней показовими є дослідження активності АСТ у сироватці крові, а для свиней, собак і котів — АЛТ і АСТ. Це пояснюється ступенем активності вказаних ензимів у гепатоцитах тварин різних видів. АСТ має високу активність у клітинах великих тварин, а АЛТ – дрібних.

Трансмінази є досить чутливими та інформативними показниками ураження печінки. Найвища активність трансміназ у крові спостерігається при розвитку некрозу печінки і гострому паренхіматозному гепатиті, дещо нижча – при хронічному гепатиті та дистрофії. Зростання активності АСТ і АЛТ у сироватці крові починається за 3–8 днів до появи клінічних ознак захворювання і досягає максимуму в перші дні розвитку патологічного процесу. При розвитку жирової дистрофії печінки у корів зростання активності АСТ виникає вже при ультрамікроскопічних змінах органа, коли активність інших ферментів ще мало змінюється. Гіперферментемія залежить від кількості відкладеного жиру в



паренхімі. Активність АСТ у крові корів, хворих на жировий гепатоз, збільшується у 5–10 разів.

При діагностиці захворювань печінки у людей запропоновано визначати коефіцієнт Де Рітиса, що показує співвідношення активності АСТ до АЛТ (у нормі коефіцієнт Де Рітиса складає 1,33). У тварин із високою активністю АСТ він малоінформативний, але у собак і котів, подібно до людей, зростання коефіцієнта Де Рітиса свідчить про тяжкі ураження гепатоцитів, оскільки це є ознакою збільшення активності мітохондріальної фракції АСТ.

Таблиця 2 – Норми активності амінотрансфераз у крові тварин (од/л)

Фермент	ВРХ	Коні	Свині	Вівці	Кози	Собаки	Коти
АлАТ	10–30	5–15	5–40	5–25	5–30	10–55	10–50
АсАТ	10–50	50–200	10–35	10–65	10–70	10–25	10–30

### Визначення активності гамма-глутамілтрансфери (ГГТ)

*Принцип методу:* ГГТ каталізує перенесення глутамінової кислоти на акцептори такі як гліцилгліцин. Цей процес вивільняє 5-аміно-2-нітробензоат, який заміряється при довжині хвилі 405 нм. Зростання екстинкції при цій довжині хвилі прямо пропорційне активності ГГТ.

Тест придатний для визначення активності ГГТ, яка відповідає максимальному значенню  $\Delta E/xv$  — 0,20. При перевищенні цього значення, потрібно провести розведення проби 1:5 ізотонічним розчином хлориду натрію (9 г/л). При цьому результат визначень перемножують на 6.

*Реактиви:*

реактив (R<sub>1</sub>): Гліцилгліцин 150 ммоль/л;

реактив (R<sub>2</sub>): L-гамма-глутаміл-3-карбокси-4-нітроанлід 6 ммоль/л.

Реактиви зберігаються при 2–8 °С до дати, зазначеної на упаковці. Реактив 2 – світлочутливий і повинен зберігатись в темному місці.

*Додаткові матеріали:* NaCl – розчин 9 г/л.

*Досліджуваний матеріал:* Сироватка, плазма (ЕДТА).

*Тест-схема:* довжина хвилі – 405 нм (400–420 нм). Товщина кювети – 1 см. Температура –37 °С. Забір – проти повітря.

*Хід визначення.* Змішати досліджувану пробу у кількості 50 мкл та реактив 1 1000 мкл, проінкубувати (одна хвилинка), додати 200 мкл реактив 2. Через 1 хв заміряти екстинкцію. Використовуючи секундомір, повторно заміряти екстинкцію через 1, 2 та 3 хв.

*Підготовка робочого реактиву:* змішати 5 частин R<sub>1</sub> з 1 частиною R<sub>2</sub> (суміш може зберігатися в темному місці при 2-8 °С – 4 тижні, при 15–25 °С – 5 днів).

*Хід визначення.* Змішати 50 мкл досліджуваної проби та 1000 мкл реактиву для старту проби. Заміряти екстинкцію через хвилину. Після цього ще раз заміряти екстинкцію через 1, 2 та 3 хв.

*Обрахунок результатів:* Із заміряних екстинкцій розраховується  $\Delta E/\text{хв}$  і множиться на відповідний фактор:

$$\Delta E/\text{хв} \cdot \text{фактор} = \text{активність ГГТ (од/л)}.$$

Фактор: для субстрату – 2608; для проби – 2210.

*Інтерпретація.* Гамма-глутамілтрансфераза 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 каналні та жовчні протоки, а також у підшлунковій залозі. Зростання активності ГГТ у сироватці крові свідчить про патологічні процеси в гепатобілярній системі, а підвищення її активності в сечі – про ураження нирок. При панкреатитах активність ферменту в крові зростає незначно. Гіперферментемія є раннім надійним тестом інтрагепатитного стазу жовчі, пошкодження канікулярних мембран гепатоцитів біля біліарного полюса епітеліальних клітин, які вистилають простір жовчних протоків. Мікроскопічні дослідження біоптатів печінки показують, що локалізація патологічного процесу впливає на рівень активності ГГТ. Якщо ураження виявляються у клітинах паренхіми, то активність ензиму зростає незначною мірою (13,0-40,0 од/л). При холестази та пошкодженні внутрішньопечінкових жовчних протоків спостерігається яскраво виражена гіперферментемія (50,0-110,0 од/л), а при значних патологічних процесах у біліарній системі (холангіт, перихолангіт, холестаз, фасціольоз, дикроцеліоз) активність ферменту досягає понад 500,0 од/л. Отже, ГГТ є високочутливим тестом порушення жовчовиділення в печінці, який не лише діагностує, а й попереджає про початок ураження та прогнозує його глибину.

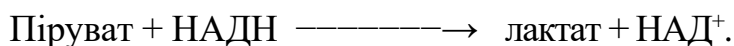
Структурні зміни в нирковій тканині, особливо в ниркових каналцях, спричиняють елімінацію ГГТ у сечу. Активність ферменту в сечі здорових корів коливається від 0 до 5 од/л, при ураженні нирок вона зростає у кілька разів, а коли пошкоджуються ниркові каналні – у десятки разів.

Таблиця 3 – Активність ГГТ у сироватці крові тварин, од/л

ВРХ	Коні	Свині	Вівці	Кози	Собаки	Коти
7–15	8–25	10–25	10–30	10–35	0–6	0–5

### Визначення активності лактатдегідрогенази

Лактатдегідрогеназа каталізує відновлення пірувату у лактат:



Лактат — кінцевий продукт гліколізу в анаеробних умовах.

*Принцип методу.* Рівновага цієї реакції сильно зміщена вправо, тому для визначення активності ферменту зручніше використовувати в якості субстратів піруват і НАДН.

Таблиця 4 – Реактиви та їх кількість, що використовуються при визначенні ЛДГ

Реактиви	Об'єм, внесений в кювету, мл
Трис-НСІ буфер 0,05 М (рН 7,5)	0,75
Піруват натрію 0,006 М	0,05
НАДН 0,005 М	0,05

*Хід визначення* У кювету спектрофотометра вносять усі реактиви (табл. 4) та 0,05 мл сироватки (плазми) крові або лізату клітин. Загальний об'єм розчину в кюветі спектрофотометра доводять бідистильованою водою до 3,0 мл. Реакція починається після додавання пірувату. Показники оптичної густини фіксують кожні 30 с протягом 3 хв.

$$A = \frac{\Delta E \cdot V}{6,22 \cdot c}$$

де:

$\Delta E$  – різниця оптичної густини між дослідною і контрольною пробами;

$V$  – об'єм інкубаційної суміші в кюветі;

$c$  – вміст білка в кюветі;

6,22 – коефіцієнт мілімолярної екстинкції нікотинамідних коферментів.

*Інтерпретація.* Лактатдегідрогеназа (ЛДГ) у цитоплазмі клітин і сироватці крові знаходиться у вигляді 5 ізоферментів. ЛДГ<sub>1</sub> необхідні для окиснення лактату в піруват у тканинах з аеробним типом метаболізму (міокард, мозок, нирки, лейкоцити). ЛДГ<sub>5</sub> є важливою для перетворення пірувату в лактат у тканинах з високим рівнем гліколізу (скелетні м'язи, печінка). ЛДГ<sub>3</sub> характерна

для лімфоїдної тканини, тромбоцитів і клітини пухлин. Активність ЛДГ зростає при гіпоксії, а інгібується піруватом.

Зростання активності ферменту або його окремих ізоформ виявляють при виході ферментів із пошкоджених або зруйнованих клітин. Наявність певної органоспецифічності ізоферментів ЛДГ дозволяє виявляти захворювання в окремих тканинах, зокрема:

- ЛДГ<sub>1</sub> і ЛДГ<sub>2</sub> зростають при хворобах міокарду та анеміях;
- ЛДГ<sub>3</sub> збільшується при рості пухлин і гострих хворобах легенів;
- ЛДГ<sub>4</sub> підвищується при гепатиті та гострих хворобах нирок;
- ЛДГ<sub>5</sub> зростає при гепатиті та хворобах м'язів.

Таблиця 5 – Активність ЛДГ та його ізоферментів у сироватці крові тварин, од/л

Показник	ВРХ	Коні	Свині	Вівці	Кози	Собаки	Коти
ЛДГ заг., од/л	500–1500	250–500	300–700	100–600	100–600	50–200	50–260
ЛДГ <sub>1</sub> , %	40–64	6–18	—	46–64	29–52	2–30	0–8
ЛДГ <sub>2</sub> , %	—	8–20	—	0–3	0–5	1,2–11,7	3–14
ЛДГ <sub>3</sub> , %	—	41–66	—	16–30	24–40	11–25	10–20
ЛДГ <sub>4</sub> , %	—	9–21	—	4–7	0–6	12–15,5	11–36
ЛДГ <sub>5</sub> , %	—	2–16	—	10–29	14–37	30–73	40–66

Для лабораторної діагностики виготовляють набори тестів для визначення двох окремих ізоферментів: термостабільної ЛДГ, яка є міокардіоспецифічною, і термолабільної ЛДГ – гепатоспецифічної. Це спрощує та прискорює дослідження, оскільки визначення окремих фракцій проводять шляхом електрофорезу на гельових пластинках.

### Визначення активності лужної фосфатази

*Принцип методу.* Під дією ферменту сироватки крові бета-гліцерофосфат натрію піддається гідролізу з вивільненням неорганічного фосфору. За його кількістю визначають активність ферменту.

*Реактиви.* 1. Гліцерофосфатний фосфат, рН  $9 \pm 0,1$ . Бета-гліцерофосфату натрію 2,15 г і 2,12 г 5,5-диетилбарбітурової кислоти натрієвої солі (мединал) розчиняють в дистильованій воді та доводять об'єм у мірній колбі на 500 мл до мітки. Визначають рН буферного розчину. Зберігають в холодильнику під шаром толуолу 7–10 днів.

2. 10 % розчин трихлороцтової кислоти (ТХОК).

3. Сірчана кислота концентрована густиною 1,84.

4. Розчин амонію молібденовокислого (ч. д. а.). 100 г речовини розчиняють у 500 мл води, підігрітої до 50 °С. Після охолодження доливають 100 мл

концентрованої сірчаної кислоти, знову охолоджують і переносять в мірну колбу на 1 л, доливають дистильованою водою до мітки.

5. Розчин амонію ванадієвокислого (ч. д. а.). 2,5 г речовини розчиняють в 500 мл киплячої води. Кип'ятіння продовжують до тих пір, поки розчин не забарвиться в жовтий колір. Після охолодження розчин переносять в мірну колбу на 1 л і доводять дистильованою водою до мітки.

6. Реактив на фосфор. Змішують розчини молібденату і ванадату амонію в рівних об'ємах. Реактив придатний 2 місяці.

7. Стандартний розчин фосфору основний. 0,439 г однозаміщеного фосфату калію (х. ч.), висушеного над концентрованою сірчаною кислотою, розчиняють в 100 мл дистильованої води. В 1 мл розчину міститься 1 мг фосфору. З нього готують робочий стандартний розчин — 5 мл основного розчину доводять дистильованою водою в мірній колбі до 100 мл.

*Обладнання.* Фотоелектроколориметр, термостат, ексикатор, електроплитка.

*Хід визначення.* У центрифужні пробірки вносять по 2,5 мл бета-гліцерофосфатного субстрату і ставлять в термостат при 37 °С на 15 хв. На кожну пробу беруть по 2 пробірки (№ 1 і 2) і на серію досліджень по 2 пробірки на контроль (№ 3 і 4) і по 2 пробірки на стандарт (№ 5 і 6). Через 15 хв у пробірку № 1 додають 0,5 мл сироватки і продовжують нагрівати всі пробірки в термостаті при 37 °С 60 хв. Проби охолоджують. У пробірку № 2 вносять 0,5 мл сироватки, № 3 і 4 – по 0,5 мл дистильованої води, № 5 і № 6 – по 0,5 мл робочого стандартного розчину фосфору.

У всі пробірки наливають по 2 мл 10 % розчину трихлороцтової кислоти, ретельно перемішують скляною паличкою і центрифугують 20 хв при 1500 об/хв. Далі беруть 2,5 мл надосадової рідини, добавляють 2,5 мл реактиву на фосфор, перемішують скляною паличкою і дають постояти 2 год. Центрифугують 5 хв при 3000 об/хв.

Фотометрують проби і стандарт при довжині хвилі 436 нм (фіолетовий світлофільтр) у кюветі з товщиною шару 1 см проти контролю. Контроль ставлять, як дослід, але замість центрифугату беруть 2,5 мл ТХОК і 2 мл дистильованої води. Розрахунок проводять за формулою:

$$X_1 = A_1 / V \cdot 5; \quad X_2 = A_2 / V \cdot 5;$$

$$X_1 - X_2 = \text{активність лужної фосфатази в од,}$$

де:

$A_1$  – оптична густина досліджуваної проби після інкубації;

$A_2$  – оптична густина досліджуваної проби до інкубації;

$B$  – оптична густина робочого стандартного розчину фосфору;

5 – коефіцієнт (для 5 мг% стандартного розчину фосфору);

$X_1$  – кількість мг неорганічного фосфору, який міститься в 100 мл сироватки крові після її інкубації;

$X_2$  – кількість мг неорганічного фосфору, який міститься в 100 мл сироватки крові до її інкубації.

Різниця у вмісті неорганічного фосфору до і після інкубації умовно позначається одиницями Боданскі. За СІ активність ферменту виражають в мкмольх неорганічного фосфору на 1 мл сироватки за 1 год інкубації при 37 °С:

$$X = \frac{a \bullet 1000 \bullet 4}{31},$$

де:

$a$  – кількість мг неорганічного фосфору, знайденого за калібрувальним графіком;

1000 – перерахунок неорганічного фосфору в мкг;

4 – коефіцієнт перерахунку на 1 мл сироватки;

31 – маса 1 мкмольа неорганічного фосфору, мкг.

*Інтерпретація.* Лужна фосфатаза (ЛФ) бере участь у відщепленні залишку фосфорної кислоти від її органічних ефірних сполук. Фермент розміщується в клітинах у зв'язаному з плазматичними мембранами стані, тому разом із ГГТ, ЛАП, 5-нуклеотидазою належить до мембранозв'язаних. ЛФ складається із різних ізоферментів, які локалізуються переважно в епітелії жовчовидільних шляхів, плазматичних мембранах гепатоцитів і нейронів, кістках, кишечнику, плаценті, нирках. Визначення активності різних фракцій можливе шляхом електрофорезу досліджуваного субстрату. Проте, ізоферменти ЛФ не мають чіткої органної специфічності, а електрофоретична методика є складною. Тому для спрощення досліджень використовують методику, яка ґрунтується на різній чутливості ізоферментів до тепла. Кишкова ЛФ складає термостабільну фракцію, а ізоферменти із печінки та кісткової тканини – термолабільну. Найбільш чутлива до нагрівання кісткова фосфатаза.

Надходження ферменту з різних тканин у кров залежить від віку та фізіологічного стану (тільність, роди, інтенсивність лактації). Висока активність ЛФ у крові молодняку пояснюється інтенсивним функціонуванням остеобластів у кістковій тканині, що зумовлене процесами активного росту організму. У цей період активності ферменту в крові зростає за рахунок кісткового ізоферменту. У другій половині вагітності та під час родів активне зростання та руйнування плаценти спричиняють збільшення активності плацентарного ізоферменту.

Підвищення активності ЛФ у сироватці крові найчастіше реєструється при патології печінки та кісткової тканини. Ураження паренхіми печінки викликає незначне зростання активності ферменту в сироватці крові, оскільки ЛФ міцно зв'язана з клітинними мембранами. У клінічній гепатології печінковий ізофермент є показовим для діагностики холестазу. Це пов'язано з підвищеним синтезом ЛФ клітинами жовчних протоків і порушенням виділення ензиму в жовч. Особливо високою є гіперферментемія при розвитку патологічного процесу та стазу жовчі в позапечінкових жовчних протоках. Тоді активність ензиму в сироватці крові зростає в десятки разів. При пошкодженні внутрішньопечінкових жовчних шляхів та інтрагепатитному холестази активність ЛФ у крові збільшується лише у 2–3 рази.

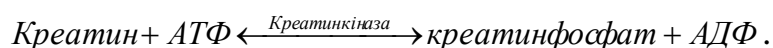
При патології кісткової тканини, коли має місце підвищена діяльність остеобластів, під час розвитку рахіту, остеодистрофії, гіперпаратиреоїдизмі у крові зростає активність кісткового ізоферменту ЛФ. У цих випадках активність загальної ЛФ у сироватці крові збільшується у 3–10 разів. Для ранньої діагностики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

Таблиця 6 – Активність ЛФ у сироватці крові тварин, од/л

ВРХ		Коні	Свині	Вівці	Кози	Собаки	Коти
дорослі	телята						
100–200	100–300	100–250	40–150	50–100	100–340	30–110	40–140

### Визначення активності креатинкінази (КК)

Креатинкіназа – фермент із групи фосфотрансфераз, що каталізує реакцію зворотного переносу залишку фосфорної кислоти з АТФ на креатин із утворенням креатинфосфату.



*Принцип методу.* Активність ферменту пропорційна кількості креатину, що утворився у результаті ферментної реакції. Креатин визначається кольоровою реакцією із  $\alpha$ -нафтолом.

*Реактиви:*

1. Трис-буфер, рН 7,4 (що містить 0,1 моль/л трису і 0,015 моль/л  $\text{Mg}^{2+}$ ). 1,2 г трису (х. ч.) і 0,180 г  $\text{MgSO}_4$  (ч. д. а.) поміщають в мірну колбу 100 мл і доводять об'єм до мітки водою. Розчин стабільний протягом місяця при зберіганні в холодильнику.

2. Розчин креатинфосфат динатрієвої солі, рН 7,4 (0,012 моль/л). Розчиняють 0,044 г креатинфосфату динатрієвої солі в 10 мл води. Розчин стабільний протягом тижня при зберіганні в холодильнику.
3. Розчин аденозин-5-дифосфорної кислоти натрієвої солі, рН 7,4 (0,004 моль/л). 0,017 г аденозиндифосфату натрію (мол маса 449) розчиняють в 100 мл води. Розчин стабільний протягом тижня при зберіганні в холодильнику.
4. Розчин гідроксиду барію 8-водного (50 г/л). Беруть 5 г гідроксиду барію безводного, або 8 г гідроксиду барію 8-водного, поміщають в мірну колбу на 100 мл і доводять об'єм до мітки водою, що не містить  $\text{CO}_2$ .
5. Розчин сульфату цинку (50 г/л). 5 г сульфату цинку (ч. д. а. або х. ч.) поміщають в мірну колбу на 100 мл і доводять об'єм до мітки водою, що не містить  $\text{CO}_2$ .
6. Розчин  $\alpha$ -нафтолу (10 г/л). 1 г  $\alpha$ -нафтолу (ч. д. а.), 16 г карбонату натрію (ч. д. а.) і 6 г гідроксиду натрію (ч. д. а.), поміщають в мірну колбу на 100 мл і доводять об'єм до мітки водою. Розчин готують не швидше ніж за 2 год до використання.
7. Основний розчин діацетилу – 0,2 мл діацетилу розчиняють у 20 мл етилового спирту.
8. Робочий розчин діацетилу. До 1 мл основного розчину діацетилу доливають 20 мл дистильованої води. Розчин зберігають у холодильнику.
9. Основний калібрувальний розчин креатину. 0,131 г креатину поміщають в мірну колбу на 100 мл і доводять об'єм до мітки водою. Розчин зберігають у холодильнику.
10. Робочий калібрувальний розчин креатину (150 мкмоль/л креатину). 1,5 мл основного калібрувального розчину поміщають в мірну колбу на 100 мл і доводять об'єм до мітки водою. Розчин зберігають у холодильнику.

*Обладнання:* спектрофотометр або фотоелектроколориметр, мірні колби, термостат, секундомір.

*Хід визначення.* Дослідна проба: 0,3 мл трис-буфера, 0,3 мл розчину креатинфосфату, 0,1 сироватки крові, нагрівають 5 хв при 37 °С. Додають 0,3 мл розчину аденозиндифосфату та інкубують 30 хв при 37 °С. Після інкубації додають по 0,5 мл розчинів гідроксиду барію і сульфату цинку, центрифугують 15 хв при 3000–4000 об/хв. До 1 мл центрифугату додають 1 мл води, 1 мл  $\alpha$ -нафтолу, 0,5 мл розчину діацетилу. Для розвитку забарвлення пробу поміщають у термостат на 30 хв (при 37 °С). Вимірювання проводять при довжині хвилі 520 нм (зелений світофільтр).



Сліпу пробу обробляють так як і дослідну, тільки замість розчину аденозиндифосфату додають воду.

Для калібрувальної проби беруть 0,3 мл трис-буфер, 0,3 мл розчину аденозиндифосфату, 0,4 мл робочого калібрувального розчину креатину і обробляють так як дослідну пробу. Вимірювання проводять проти сліпої проби. Сліпу пробу обробляють так як калібрувальну пробу, тільки замість креатину беруть воду.

Розрахунок проводять за формулою:

$$x = (E_d - E_{слп}) / (E_k - E_{слп}) \cdot 333,$$

де:

$x$  – активність креатинкінази, нмоль/с·л;

$E_d$  – екстинція дослідної проби;

$E_{слп}$  – екстинція сліпої проби;

$E_k$  – екстинція контрольної проби;

333 – коефіцієнт перерахунку креатинфосфату, перетвореного 1 л сироватки за 1 с на молі.

*Примітка.* Беруть свіжу вільну від гемолізу кров, або плазму з ЕДТА чи гепарином. Зразки крові в лабораторію доставляють якомога швидше. Сироватку зберігають у закритих пробірках у темноті протягом 2 днів при температурі не вище 20–25 °С.

*Інтерпретація.* Креатинкіназа (КК) каталізує зворотну реакцію фосфорилювання креатину. КК розміщується в м'язах скелету (90 %) та серця (2 %) і мозковій тканині (8 %). Фермент є високоспецифічним тестом пошкодження м'язових волокон скелету та серця, при його дослідженні у крові (сироватка, плазма), а також мозку — при визначенні у спинномозковій рідині (лікворі). Значна гіперферментімія (500–5500 од/л) спостерігається у хворих на м'язову дистрофію, при міозиті, ішемії, травматичному пошкодженні та метаболічному порушенні в м'язах, залежанні, фізичному навантаженні. При ураженні серцевого м'яза (інфаркт, міокардит, міокардіодистрофія, серцева недостатність) активність КК у сироватці крові зростає до 10 і більше разів. При виникненні інфаркту міокарда активність ензиму зростає через декілька годин і є високою протягом тижня.

Захворювання, які перебігають з ураженням головного та спинного мозку (крововилив, менінгоенцифаліт, менінгіт, енцефаліт, мієліт, некроз та ін.), спричиняють зростання КК у лікворі хворих органів. Локалізуючись у цитоплазмі нейронів, фермент елімінується у спинномозкову рідину навіть при незначному пошкодженні і зростає при деструкції клітин мозку. Наприклад, при

печінковій енцефалопатії активність КК у лікворі збільшується удвічі, а при печінковій комі – у 14 разів.

Підвищене значення активності ферменту виявляють у здорових тварин після значного фізичного навантаження, спортивних змагань, проведення хірургічних втручань.

Таблиця 7 – Активність КК у сироватці крові тварин, од/л

ВРХ	Коні	Свині	Вівці	Кози	Собаки	Коти
20–100	20–130	100–2000	10–25	20–65	10–90	30–130

### Контрольні запитання

1. Поясніть, які завдання у ензимодіагностики.
2. Принцип методу Райтман-Френкеля для визначення активності амінотрансфера.
3. Для діагностики яких хвороб досліджують активність аспаргатамінотрансферази та аланінамінотрансферази?
4. Для діагностики яких хвороб досліджують активність гамма-глутамілтрансферази?
5. Методика визначення активності лактатдегідрогенази.
6. Визначення активності лужної фосфатази.

### ТЕМА 3. ДОСЛІДЖЕННЯ ВУГЛЕВОДНОГО ОБМІНУ

***Мета:** Розширити комплексні знання про метаболічні шляхи синтезу і розпаду вуглеводів у нормі та при патології. Вивчити клінічну лабораторну діагностику при порушеннях вуглеводного обміну.*

Найбільш важливою функцією вуглеводів є енергетична: при окисненні 1 г вуглеводів виділяється в середньому 4,1 ккал (близько 17,2 кДж) енергії. Це в 1,25 і 2,25 рази менше, ніж при окисненні 1 г білків або жирів, відповідно. Незважаючи на це, тварини у першу чергу для отримання енергії використовують вуглеводи, а нервова тканина забезпечується енергією виключно за рахунок окиснення вуглеводів, оскільки метаболіти, які виникають при цьому, не накопичуються у тканинах і не спричинюють негативної дії на організм.

Вуглеводи беруть участь в утворенні складних хімічних сполук, до яких належать нуклеїнові кислоти, глікозаміноглікани, глікопротеїни, гліколіпіди. Ці сполуки відіграють важливу роль в організмі тварин. Так, наприклад, ДНК є генетичним матеріалом, РНК бере участь в біосинтезі білка. Інші речовини, що містять вуглеводи, є складовими частинами клітинних мембран, сполучної та нервової тканин.

Вуглеводи є вихідними речовинами для синтезу в тканинах біологічно активних похідних аскорбінової і глюкуронової кислот. При окисненні вуглеводів утворюється щавлевооцтова кислота (ЩОК), необхідна для завершення процесу окиснення жирів. Тому не випадково існує такий вираз: “Жири згорають у полум’ї вуглеводів”. Без достатнього забезпечення тварин вуглеводами організм змушений витратити для енергетичного забезпечення жири і білки, а це супроводжується надмірним утворенням великої кількості недоокиснених продуктів – кетонів тіл.

Зрештою, вуглеводи виконують і певну захисну функцію. Зокрема, глікозаміноглікани є складовою частиною слизу, який секретується різними залозами для попередження пошкодження внутрішніх стінок порожнистих органів; гіалуронова кислота оберігає від пошкоджень поверхню суглобів, знешкоджує в організмі токсичні речовини, регулює проникність тканин.

#### **Визначення вмісту глікогену**

***Принцип методу.** При гідролізі тканини розчином КОН із наступним промиванням осаду 2 об’ємами етилового спирту, глікоген при охолодженні, випадає в осад. Після чого його гідролізують до глюкози 60 % КОН, кількість якої визначають одним із загальноприйнятих методів.*

*Реактиви:* 30 і 60 % розчин КОН; 70, 80 і 96 % етиловий спирт; 2 н. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 0,5 і 5 н. NaOH.

*Хід визначення.* Наважку тканини (100–250 мг) поміщають у пробірку, що містить 0,5 мл розчину 30 % КОН, після чого додають 60 % розчин КОН у кількості 1–2,5 мл (у залежності від наважки тканини). Проби кип'ятять на водяній бані протягом 2 год. Після охолодження до вмісту пробірок додають 2 об'єми 70 % етилового спирту, старанно перемішують скляною паличкою і залишають на ніч у холодильнику. Вранці суміш центрифугують при 4000–5000 об/хв протягом 30 хв, у результаті чого глікоген випадає в осад. Надалі глікоген промивають 70, 80, 96 % етиловим спиртом із наступним центрифугуванням при зазначеному режимі. Отриманий осад глікогену підсушують на водяній бані при 80–90 °С.

Підсушений осад глікогену розчиняють у 1 мл гарячої води, додають до нього 3 мл H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Проби ставлять у кип'ячу водяну баню на 3 год. Потім гідролізат нейтралізують до рН 7,8 за допомогою 3 і 0,5 н. NaOH. Об'єм нейтралізованого гідролізату доводять дистильованою водою до 25 мл. Для визначення кількості глюкози використовують 0,1–0,5 мл гідролізату. Вміст глюкози визначають відповідно до методів, описаних нижче.

Кількість глікогену в тканині розраховують за формулою:

$$X = m \cdot V \cdot 0,927 \cdot 100 / V_1 \cdot P,$$

де:

m – кількість глюкози в аліквоті, у мг;

V – загальний об'єм гідролізату (25 мл);

V<sub>1</sub> — об'єм гідролізату, взятий для визначення, мл;

P – наважка тканини, г;

0,927 – коефіцієнт переведення глюкози в глікоген.

*Інтерпретація.* Глікоген є полісахаридом тваринного походження. Він побудований із залишків α-D-глюкози. Синтезується глікоген з глюкози (глікогенез) у печінці (40 %) та м'язах (45 %) тварин, де в основному, депонується. Крім глюкози, джерелом синтезу глікогену є й інші сполуки — аміно-, кето-, оксикислоти і низькомолекулярні жирні кислоти (гліконеогенез).

Розпад глікогену в організмі називається глікогенолізом. Глікогеноліз відбувається двома шляхами: фосфоролізом і гідролізом. Перший шлях (основний) проходить під впливом ферменту фосфорилази з утворенням глюкозо-1-фосфату; другий — під впливом ферменту амілази з утворенням декстринів і мальтози, і далі глюкози.

Синтез глікогену відбувається за дії інсуліну — гормону підшлункової залози. У розпаді глікогену бере участь підшлункова залоза (глюкоген) та надниркові залози (адреналін).

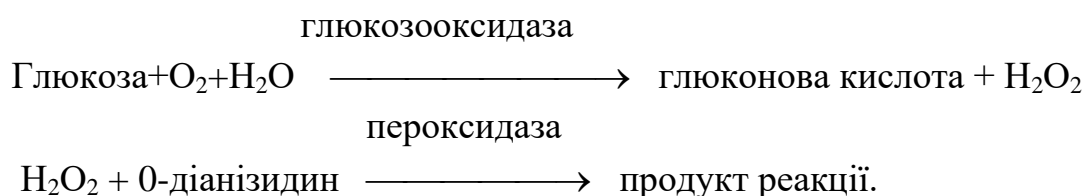
Зменшення глікогену в печінці та м'язах спостерігається при кетозі, гіпоглікемії поросят, цукровому діабеті, виснаженні.

Збільшення глікогену в тканинах є наслідком ферментопатій.

### Визначення концентрації глюкози

#### *Глюкозооксидазний метод*

*Принцип методу.* При окисненні глюкози глюкозооксидазою утворюється  $H_2O_2$ . Перекис водню у присутності пероксидази окиснює О-діанізидин, перетворюючи його у сполуку, забарвлену в синій колір.



*Реактиви:* 1 % розчин о-діанізидину в метиловому спирті; пероксидазна буферна система: 5 мг пероксидази + 59 мл 0,1 н. розчину NaOH + 125 мл 0,1 М  $KH_2PO_4$  змішують до розчинення пероксидази і доводять об'єм до 500 мл дистильованою водою, потім додають 5 мл 1 % розчину о-діанізидину і старанно розмішують; глюкозооксидазний реактив: 250 мг глюкозооксидази розчиняють у 25 мл дистильованої води, енергійно перемішують і фільтрують; стандартний розчин глюкози: 1 % розчин глюкози в 0,25 % бензойній кислоті; 50 % сірчана кислота.

*Хід визначення.* 0,02 мл плазми крові або тканинного екстракту переносять у пробірки, що містять 4,5 мл пероксидазного буфера і 0,5 мл глюкозооксидазного реактиву. Пробірки поміщають на 30 хв у водяну баню при температурі 37 °С і після охолодження проб додають 1,5 мл 50 % сірчаної кислоти. Інтенсивність забарвлення визначають фотометрично при довжині хвилі 530 нм. Кількість глюкози в мг% визначають за формулою:

$$X = E \cdot 320,$$

де:

E – оптична щільність досліджуваної проби;

320 – постійний коефіцієнт.

## **Визначення концентрації глюкози за допомогою о-толуїдину**

**Принцип методу.** Безбілковий фільтрат крові при нагріванні з о-толуїдином утворює характерне забарвлення обумовлене наявністю глюкози.

**Реактиви:** 3 % розчин ТХОК; розчин о-толуїдину: в 90 мл льодяної оцтової кислоти розчиняють 0,27 г тіосечовини і 19 мл о-толуїдину; льодяна оцтова кислота (96 %); бензойна кислота – 0,25 % розчин; стандартний розчин глюкози: 1 г глюкози в 0,25 % розчині бензойної кислоти.

Глюкозу висушують в ексікаторі над  $P_2O_5$ . 1 г висушеної глюкози розчиняють в 100 мл бідистильованої води. Піпеткою беруть по 40, 30, 20, 10 і 8 мл основного розчину стандарту та доливають до 100 мл бензойною кислотою. Отримані таким чином стандартні розчини містять відповідно від 400 до 800 мг% глюкози.

**Хід визначення.** До 2 мл 3 % розчину ТХОК краплями додають, постійно змішуючи, 0,2 мл крові та центрифугують. До 1 мл прозорої надосадової рідини додають піпеткою 5 мл о-толуїдинового реактиву. Контрольна проба містить 1 мл ТХОК і 5 мл о-толуїдинового реактиву. Суміш нагрівають протягом 15 хв при 95 °С, потім відразу охолоджують в льодяній ванні. Фотометрування проводять в 1 мл кюветі при 510 нм. Кількість глюкози в мг% визначають за формулою:

$$\frac{A}{B} \cdot 0,1 \cdot \frac{1}{0,1} 100 = \text{мг\% глюкози},$$

$$\frac{A}{B} \cdot 100 = \text{мг\% глюкози},$$

де:

*A* – оптична густина досліджуваної крові;

*B* – оптична густина робочого стандарту глюкози, в цьому випадку;

100 мг%, що містить 0,1 мг глюкози в об'ємі – 0,1 мл;

100 – коефіцієнт перерахунку у мг%.

**Інтерпретація.** Коефіцієнт перерахунку з мг% у ммоль/л для глюкози – 0,0555.

Дослідження вмісту глюкози в крові проводять відразу ж після взяття проб. Для обмеження гліколізу кров після взяття центрифугують (плазма) і здійснюють осадження білка. Інгібувати гліколіз можна шляхом додавання до крові фториду натрію. Позбавлення крові від еритроцитів є важливою умовою одержання точних результатів. Так, при зберіганні крові у присутності еритроцитів вміст глюкози у ній протягом 1–2 год знижується на 7–14 %. Визначати глюкозу можна також у сироватці крові.

Таблиця 1– Вміст глюкози в крові (плазмі) тварин (ммоль/л)

ВРХ	Коні	Свині	Вівці	Собаки	Коти	Кури
2,5–3,3	3,0–5,0	3,7–6,4	2,5–3,3	3,4–6,0	3,4–6,9	4,4–7,8

Підвищення вмісту глюкози в крові (гіперглікемія) спостерігається після споживання великої кількості вуглеводистих кормів, при дефіциті інсуліну, гострому панкреатиті, посиленні глікогенолізу в печінці та глюконеогенезі, цукровому діабеті, гіперфункції наднирникових залоз, тиреотоксикозі, хворобах центральної нервової системи (травми головного мозку, крововиливи в мозок, інтоксикації, стрес, сказ, хвороба Ауескі), важких ураженнях печінки.

Зниження вмісту глюкози в крові (гіпоглікемія) спостерігається при дефіциті у раціоні легкоперетравних вуглеводів, голодуванні та анорексії, порушенні перетравлення та всмоктування, при посиленні катаболізму у зв'язку з нестачею запасів глікогену та дефіциті енергії і субстратів для глюконеогенезу, втраті її з організму (хвороби нирок), кетозі, гіпоглікемії поросят, гепатиті, гепатозі, хворобах шлунково-кишкового тракту (блювання, пронос), гіпофункції наднирникових і щитоподібної залоз, гіперсекреції інсуліну та гіпосекреції глюкози підшлунковою залозою, передозуванні інсуліну.

### Визначення кількості цитрату в плазмі крові

*Принцип методу.* Найбільш поширеним методом кількісного визначення цитрату в тканинах є окиснення лимонної кислоти в пентабромацетон із наступною екстракцією останнього гептаном і фотометруванням кольорового комплексу з борною кислотою.

*Реактиви:* 18 н.  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ; 1 М  $\text{KBr}$  на бромній воді; 5 М  $\text{KMnO}_4$ ; 6 % розчин  $\text{H}_2\text{O}_2$ ; гептан; 4 % розчин тіосечовини з додаванням 2 г  $\text{H}_3\text{BO}_3$  на 100 мл.

*Хід визначення.* Досліджуваний об'єм рідини, що містить цитрат, доводять дистильованою водою до 3 мл і додають 0,1 мл 18 н.  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . Пробірки нагрівають на масляній бані (130–140 °С) протягом 5 хв. Після охолодження в пробірки вносять 5 крапель  $\text{KBr}$ , а потім 5 крапель 5 М  $\text{KMnO}_4$  і струшують їх. Реакційна суміш повинна зберігати червоне забарвлення не менше 10 хв. Потім пробірки переносять у льодяну баню і видаляють надлишок перманганату калію обережним додаванням  $\text{H}_2\text{O}_2$  до знебарвлення суміші. Далі додають 2,5 мл гептану і пробірки знову струшують протягом 10 хв. З верхньої фази відбирають 2 мл гептану в сухі пробірки і додають 4 мл розчину тіосечовини. У якості контролю беруть 2 мл гептану і 4 мл тіосечовини. Після розвитку забарвлення його інтенсивність визначають фотометрично, синій світлофільтр при довжині

хвилі 450 нм. Стандартну пробу, що містить 50 мкг лимонної кислоти, піддають аналогічній процедурі.

*Інтерпретація.* Цитрат – трикарбонова кислота. З утворення лимонної кислоти за допомогою цитратсинтази та КоА починається ЦТК. Це головна стадія регуляції всього циклу, яка активується катехоламінами. При діабеті, голодуванні та інших станах, при яких інтенсивно використовуються жири, як джерело енергії, в клітинах тканин вміст цитрату може підвищуватись в декілька разів. У цих умовах відбувається інгібування активності ФФК цитратом. Підвищення концентрації цитрату в крові відбувається внаслідок перевантаження ЦТК метаболічним паливом (після споживання вуглеводів, секреції в кров інсуліну, катехоламінів і т. д.), що створює умови для активації анаболічних процесів в організмі. Перетворення оксалоацетату і ацетил-КоА в цитрат активується оксалоацетатом, а інгібується цитратом, НАДН, АТФ, сукцинил-КоА, жирними кислотами. Цитрат сприяє процесу всмоктування цинку в кишечнику людини і тварин.

### **Визначення вмісту церулоплазміну**

*Принцип методу.* Метод базується на окисненні п-фенілендіаміну за участю церулоплазміну. Ферментативну реакцію зупиняють додаванням азиду натрію. Концентрація церулоплазміну прямо пропорційна до оптичної щільності продуктів реакції.

*Обладнання і реактиви.* Водяна баня.

1. 5 % п-фенілендіамін (використовується свіжоприготовленим);
2. 0,1 та 0,5 % розчини азиду натрію;
3. 0,2 М ацетатний буферний розчин рН 5,7 (отримують при змішуванні рівних об'ємів 0,2 М ацетату натрію і 0,02 М оцтової кислоти).

*Основна вимірвальна техніка.* Фотоелектроколориметр.

*Біологічний матеріал.* Сироватка крові.

*Хід визначення.* У дві пробірки вносять по 0,1 мл сироватки. В одну з них додають 1 мл 0,5 % розчину азиду натрію (контроль), по 8 мл ацетатного буферного розчину та по 1 мл 0,5 % розчину п-фенілендіаміну. Після цього проби інкубують на водяній бані при температурі 37 °С протягом 1 год. До дослідної проби додають 0,5 мл 0,1 % азиду натрію і охолоджують на льодяній бані протягом 30 хв для повної зупинки реакції.

Проби колориметрують на ФЕКу із зеленим світлофільтром (500–560 нм) або іншому, більш сучасному фотометрі в кюветах з шириною оптичного шару 10 мм. Результат фотометрії оцінюють з урахуванням оптичної щільності контрольної проби (блідо-рожевого забарвлення). Розрахунок результатів проводять за формулою:



$$C_{\text{цп}}(\text{мг \%}) = E_{\text{оп}} \times 87,5,$$

де:

$C_{\text{цп}}$  – це концентрація церулоплазміну в сироватці крові,

$E_{\text{оп}}$  – показники екстинції дослідних проб,

87,5 – сталий коефіцієнт.

*Примітка.* Помітною перешкодою до широкого впровадження в клініко-лабораторну практику методів дослідження такого білка як ЦП є відсутність чистих стандартів, які використовуються для оцінки результатів (у тому числі побудови калібрувального графіка) визначення. У зв'язку з цим деякі автори рекомендують виражати результати в одиницях абсорбції (або значеннях оптичної щільності, вирахованих до другого знаку після коми, помножених на 100). Равін, автор оригінального методу, пропонує множити значення оптичної щільності на коефіцієнт 87,5 при цьому результат буде представленим у розмірності мг/дл. Проте навіть при строгому дотриманні стандартних умов це призводить до спотворення результатів. Тому таке вираження результатів за цим методом слід вважати умовно точним, і таким що не задовольняє основним вимогам стандартизації.

*Інтерпретація.* Церулоплазмін є одним із факторів нейроендокринної регуляції і природного захисту організму при стресових ситуаціях, запальних, алергічних процесах та інших захворюваннях. Цей білок є купрумвмісним глікопротеїном, що належить до білків гострої фази. Бере участь в обміні заліза та кровотворенні, є антиоксидантом. Володіє оксидазною активністю, завдяки якій руйнує біогенні аміни та інші субстрати і тому має відношення до нейроендокринної регуляції.

Зміна активності церулоплазміну зазвичай корелює із зміною вмісту іонів міді. Різке порушення обміну міді спостерігається при анеміях, коли значно підвищується її концентрація в крові завдяки зменшенню вмісту деіонізованої міді в печінковій тканині.

Зниження вмісту церулоплазміну в крові (гіпоцерулоплазмінемія) виникає внаслідок трьох основних причин:

1. зниженого синтезу: при гепатоцеребральній дегенерації або хворобі Вільсона-Коновалова, при якій спостерігається різко виражене зниження рівня церулоплазміну, проте повністю цей глікопротеїн з плазми не зникає; синдромі Менкеса, важких захворюваннях печінки;

2. підвищеної його втрати: при ураженні шлунково-кишкового тракту через стінку кишечника та шлунка разом з фракціями загального білка плазми, нирок (з сечею при нефротичному синдромі);
3. зниження абсорбції міді: при важких порушеннях всмоктування, недостатня кількість міді в кормах.

Збільшення вмісту церулоплазміну в крові (гіперцерулоплазмінемія) спостерігається при хронічних запальних процесах, при гострому періоді інфекцій, що протікають з лихоманкою і розпадом клітинних елементів; при неспецифічній пневмонії, туберкульозі легень, інфекційному поліартриті, злоякісних новоутвореннях, ракових метастазах, лейкозах, лімфогрануломатозі, гепатитах, механічній (але не паренхіматозній) жовтяниці. Вміст церулоплазміну постійно зростає при меланомі та шизофренії (ознака характерна для цього захворювання). Відзначено значне збільшення церулоплазміну при інфаркті міокарда. Виявлена пряма залежність між активністю церулоплазміну в крові та обширністю вогнища інфаркту міокарда. В крові ВРХ вміст церулоплазміну становить 25,0–36,0 мг%.

### **Контрольні запитання**

1. Порушення катаболізму вуглеводів.
2. Якісні та кількісні визначення вуглеводів.
3. Кетоніві тіла.
4. Гіпо та гіперглікемія.
5. Цукровий діабет.

## ТЕМА 4. ДОСЛІДЖЕННЯ МІНЕРАЛЬНОГО ОБМІНУ

**Мета:** *Ознайомитися та засвоїти методики визначення вмісту загального кальцію, неорганічного фосфору, магнію, сірки, заліза в сироватці крові, селену, макро- та мікроелементів методом атомно-абсорбційної спектрофотометрії*

Мінеральні елементи поділяють на три групи: *життєво необхідні* (біогенні, біотичні, есенціальні); *умовно необхідні*; елементи, роль яких в організмі *вивчена мало або невідома*.

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

– вони постійно присутні в організмі тварин у кількості, яка є подібною в різних індивідуумів;

– синтетичний раціон, який не містить цього елемента, спричинює у тварин характерні симптоми недостатності і типові біохімічні зміни;

– симптоми і зміни можуть бути попереджені або усунені шляхом включення цього елемента в експериментальний раціон.

До хвороб тварин, спричинених порушенням обміну макроелементів, відносять остеодистрофію, рахіт, післяпологову гіпокальціємію та гіпофосфатемію, пасовищну тетанію. Остеодистрофія і рахіт розвиваються не лише внаслідок порушення обміну кальцію та фосфору, а й через нестачу в організмі вітаміну D. Окрім цих хвороб, у корів за патології внутрішніх органів – печінки, нирок, щитоподібної та прищитоподібної залоз – розвивається вторинна остеодистрофія, а в молодняку – ендогенний D-гіповітаміноз. Післяпологова гіпокальціємія належить до ендокринних хвороб, але основним у її патогенезі є зменшення вмісту кальцію в сироватці крові. Порушення обміну магнію призводить до розвитку пасовищної тетанії

### Визначення вмісту загального кальцію (Ca)

На сьогоднішній день велику увагу заслуговують прямі методи визначення вмісту загального кальцію: колориметричні, флюориметричні, полум'янофотометричні, титрометричні (комплексометричні), а також метод атомно-абсорбційної спектроскопії. Найпоширеніші методи з визначення кальцію базуються на утворенні зафарбованих комплексів кальцію з гліоксальбіс-(2-гідроксианіліном), о-крезилфталейном, сульфонатом алізарину, метилтимоловим голубим, металохромогенним «арсеназо III». У подальшому загальна кількість утвореного комплексу безпосередньо вимірюється або фотометрично, або зафарбований комплекс використовується лиш як індикатор кінця титрування (останній практично зараз не використовують).

Кальцієвий гомеостаз підтримується кишечником, нирками, печінкою, кістковою тканиною, а також гормонами прищитоподібних залоз – паратгормоном і щитоподібної – кальцитоніном.

Для визначення вмісту кальцію можна використовувати сироватку і гепаринізовану плазму (інші антикоагулянти: цитрат, оксалат, ЕДТА – непридатні), які не містять залишків гемолізу. Кальцій є стабільним у сироватці крові протягом 24 год при кімнатній температурі, один тиждень – при 2–8 °С, у замороженому стані – 5 місяців (розморозувати проби багатократно неможна).

### ***Визначення загального кальцію за кольоровою реакцією з орто-крезолфталейнкомплексом***

*Принцип методу.* Орто-крезолфталейнкомплексон (о-КФК) утворює з кальцієм у лужному середовищі комплекс червоно-фіолетового кольору, інтенсивність забарвлення якого пропорційна концентрації кальцію. У реакційну суміш додають 8-оксихінолін, який зв'язує інші метали, що заважають визначенню, але утворює з кальцієм менш міцний комплекс, ніж крезолфталейнкомплексон.

#### *Реактиви*

1. Боратний буфер. 200 г борної кислоти (ортоборної кислоти) розчиняють при нагріванні в 300 мл води, додають 580 мл 5 н. КОН, об'єм доводять водою в мірній колбі до 1 л.
2. Гліцин 2 моль/л: 7,5 г гліцину розчиняють в 40 мл води, переносять в мірну колбу і доводять об'єм до 50 мл. Для консервації додають 2 краплі хлороформу і зберігають в холодильнику.
3. 8-Оксихінолін (оксин), 1 % розчин: 500 мг препарату розчиняють в 50 мл абсолютного спирту.
4. Робочий буферний розчин. До 300 мл води додають 12,5 мл боратного буферу і 5 мл розчину гліцину, перемішують і встановлюють величину рН у межах 10,5–10,6 за допомогою 5 н. КОН, додають 50 мл 1 % розчину оксихіноліну, переносять в мірну колбу об'ємом 500 мл і доводять до мітки водою, після чого знову перевіряють рН.
5. О-Крезолфталейнкомплексон, 0,1 % розчин: 10 мг о-крезолфталейнкомплексону розчиняють в 100 мл основного буферного розчину.
6. Калібрувальний розчин. Основний калібрувальний розчин, який містить кальцій у концентрації 25 ммоль/л: 250 мг карбонату кальцію ( $\text{CaCO}_3$ ) розчиняють в 5 мл 1 н. НСІ. Розчин переносять в мірну колбу, об'ємом 100 мл і доводять водою до мітки. Для консервації додають 2

краплі хлороформу. Одночасно готують розчин солей магнію 3 мг/мл, розчиняючи 2,5 г хлориду магнію ( $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ ) в 100 мл води. Із цих розчинів готують робочі калібрувальні розчини, відповідно до таблиці 1.

Таблиця 1 – Приготування робочих калібрувальних розчинів

Основний калібрувальний розчин 25 ммоль/л Са, мл	Розчин магнію 3 мг/мл, мл	Вода, мл	Концентрація кальцію, ммоль/л
6,0	1,0	До 100	1,5
8,0	1,0	-«-	2,0
10,0	1,0	-«-	2,5
12,0	1,0	-«-	3,0
14,0	1,0	-«-	3,5

*Хід визначення.* До 3 мл робочого розчину о-крезолфталеїнкомплексону додають 0,05 мл досліджуваної сироватки і перемішують. Через 5 хв фотометрують в кюветі з довжиною оптичного шляху 0,5 см, при довжині хвилі 500–560 нм (зелений світлофільтр) проти робочого розчину о-крезолфталеїнкомплексону. Одночасно обов'язково ставлять хоча б одну калібрувальну пробу. Розрахунок ведуть за калібрувальною кривою або за правилом пропорцій.

#### **Визначення загального кальцію**

*Хід визначення.* До 1,0 мл бідистильованої води додають 0,04 мл сироватки крові, перемішують, після цього вносять 0,5 мл 0,4 моль/л розчину гідроксиду натрію, ретельно перемішують і через 5–10 хв додають 2 мл розчину гліюксальбіс-(2-оксианілу). Знову перемішують та у проміжку між 5 та 15 хв вимірюють оптичну густина при довжині хвилі 540 нм (зелений світлофільтр) у кюветі з товщиною шару 0,5–1,0 см відносно контрольного розчину.

Контрольний та стандартний розчини готують таким же чином, але замість сироватки крові додають по 0,04 мл бідистильованої води та по 0,04 мл робочого стандартного розчину кальцію (2,5 ммоль/л).

Розрахунок вмісту кальцію в сироватці крові виконують за формулою:

$$C_d \text{ (ммоль/л)} = \frac{E_d}{E_{ст}} \cdot C_{ст}$$

де:

$C_d$  і  $C_{ст}$  – концентрація кальцію в дослідній ( $C_d$ ) і стандартній ( $C_{ст}$ , 2,5 ммоль/л) пробах;

$E$  – екстинкція (оптична густина) дослідної (д) і стандартної (ст) проб.

### **Визначення білокзв'язаного кальцію**

*Хід визначення.* До 0,1 мл сироватки крові додають по 1,0 мл 96 % розчину етанолу, ретельно перемішують за допомогою автоматичного струшуюча і залишають при кімнатній температурі на 30 хв. Потім центрифугують впродовж 15 хв (3000 об/хв) до утворення щільного осадку. Зливають надосадову рідину та підсушують осад до остаточного видалення залишків етанолу. Щільний осад розчиняють у 0,5 мл 0,4 М розчину гідроксиду натрію і поміщають у киплячу водяну баню на 10 хв, а потім охолоджують до кімнатної температури. До гідролізату додають 1,0 мл бідистильованої води та 2 мл розчину гліоксаль-біс-(2-оксианілу). Оптичну густина вимірюють між 5 та 15 хв (540 нм, кювета з довжиною оптичного шляху 1,0 см).

Розрахунок виконують за формулою:

$$\text{Білокзв'язаний кальцій (ммоль/л)} = \frac{E_d}{E_{ст}}$$

Вміст ультрафільтрувального кальцію визначають за різницею концентрацій загального та білокзв'язаного кальцію сироватки крові.

### **Визначення неорганічного фосфору в сироватці крові за відновленням фосфорно-молібденової кислоти**

Для дослідження мінерального обміну важливе значення має визначення неорганічного фосфору.

*Принцип методу.* Після осадження білків у центрифугаті залишається неорганічний фосфор, який з молібденовою кислотою утворює фосфорно-молібденову кислоту. Остання відновлюється ейконогеном до синього фосфорно-молібденового комплексу. Інтенсивність забарвлення прямо пропорційна концентрації неорганічного фосфору в сироватці крові.

#### *Реактиви*

1. 10 % розчин трихлороцтової кислоти;
2. 5 % розчин молібденово-кислого амонію. 5 г молібденово-кислого амонію доводять до 100 мл 5 н. розчином сірчаної кислоти при постійному перемішуванні до повного розчинення;
3. 5 н. сірчана кислота. 140 мл концентрованої сірчаної кислоти питомою вагою 1,84 і 860 мл дистильованої води;
4. Розчин амінонафтолсульфонової кислоти (ейконогена). 6 г кислого сірчано-кислого натрію (бісульфіту натрію) або метабісульфіту натрію, розчиняють повністю в 20–25 мл води, після чого в розчин добавляють 0,1

г ейконогену. Ейконоген розчиняється повільно, необхідно помішувати скляною паличкою. Окремо в невеликій кількості води розчиняють 1,2 г безводного сірчистокиислового натрію (сульфіту натрію). Обидва розчини змішують і об'єм доводять до 50 мл дистильованою водою. Через 2–3 год розчин фільтрують. Зберігають в холодильнику, в посуді із темного скла;

5. Основний стандартний розчин однозаміщеного фосфорнокислого калію, висушеного до постійної ваги при 120 °С. 0,4389 г солі розчиняють у дистильованій воді в мірній колбі на 100 мл. 1 мл розчину містить 1 мг фосфору;

6. Робочий стандартний розчин. 2 мл основного стандартного розчину доливають в мірній колбі до 100 мл дистильованою водою. 1 мл робочого розчину містить 0,02 мг фосфору;

*Хід визначення.* 1 мл сироватки змішують з 4 мл дистильованої води і 5 мл трихлороцтової кислоти. Через 10 хв центрифугують. До 5 мл центрифугату додають 1 мл молібденово-кислого амонію, 0,2 мл розчину ейконогену і 1,8 мл дистильованої води. Залишають стояти 20 хв при кімнатній температурі, потім вимірюють на ФЕКУ проти контролю при довжині хвилі 630–690 нм (червоний світлофільтр) у кюветі з товщиною шару 1 см.

Контроль ставлять, як і дослід, але замість центрифугату беруть 2,5 мл трихлороцтової кислоти і 2,5 мл дистильованої кислоти.

Розрахунок проводять за калібрувальним графіком.

Таблиця 2 – Побудова калібрувального графіка

№ пробірки	Робочий стандартний розчин (мл)	Розчин трихлороцтової кислоти (мл)	Розчин молібденово-кислого амонію (мл)	Розчин ейконогену (мл)	Дистильована на вода (мл)	Вміст фосфору в пробі	
						(мг)	(мг%)
1	0,5	2,5	1,0	0,2	3,8	0,01	2
2	1,0	2,5	1,0	0,2	3,3	0,02	4
3	2,0	2,5	1,0	0,2	2,3	0,03	6
4	3,0	2,5	1,0	0,2	1,3	0,04	8
5	4,0	2,5	1,0	0,2	0,3	0,05	10

### Визначення вмісту магнію (Mg)

Магній плазми крові, подібно до кальцію, частково знаходиться в іонізованому стані, а частково зв'язаний з білками і низькомолекулярними комплексоутворювачами – лимонною і фосфорною кислотами. Діагностичне значення має визначення загального магнію.

Сучасні колориметричні методи визначення вмісту магнію різняться за способом осадження білків і використанню різних барвників: титанового жовтого, магону, еріохромчервоного Т, метилтимолового голубого, «колмагіте».

### ***Визначення загального магнію в сироватці (плазмі) крові за кольоровою реакцією з титановим жовтим***

*Принцип методу.* Магній з титановим жовтим у лужному середовищі утворює оранжево-червону сполуку, інтенсивність забарвлення якої пропорційна його концентрації.

#### *Реактиви*

1. 20 % розчин трихлороцтової кислоти. Беруть 20 г ТХОК і розчиняють у 80 мл дистильованої води.
2. 0,01 % розчин полівінілового спирту. Розчиняють 100 мг у 1 л бідистильованої води при підігріванні. Реактив стійкий.
3. 0,1 % розчин титанового жовтого. Реактив готують в день проведення аналізу на бідистильованій воді.
4. 2 н. розчин їдкого натрію. Розчиняють 80 г речовини в 1 л бідистильованої води.
5. Стандартний розчин магнію. 0,168 г прожженого окису магнію розчиняють спочатку в 2,5 мл концентрованої соляної кислоти і доводять бідистильованою водою в мірній колбі до 100 мл. У 1 мл розчину міститься 1 мг магнію. Для побудови калібрувальної кривої готують робочий розчин. Із основного стандартного розчину беруть 1 мл і доводять в мірній колбі до 100 мл бідистильованою водою. В 1 мл робочого розчину міститься 0,01 мг магнію.

*Матеріалом для дослідження є безбілковий фільтрат, отриманий шляхом змішування і наступного центрифугування гепаринізованої крові та 20 % розчину ТХОК у рівних об'ємах.*

*Хід визначення.* Вносять в стаканчик 0,5 мл безбілкового фільтрату крові, добавляють 1 мл 0,01 % розчину титанового жовтого, 1 мл 0,01 % розчину полівінілового спирту, 15,5 мл бідистильованої води і 2 мл 2 н. розчину їдкого натрію.

1. Ретельно перемішують скляною паличкою і через 6–10 хв фотометрують при зеленому світлофільтрі в кюветі з товщиною шару 0,5 см проти контролю.

2. У контрольну пробу замість 0,5 мл фільтрату крові вносять 0,25 мл бідистильованої води і 0,25 мл 20 % розчину ТХОК, далі згідно з п.1.



*Розрахунок результатів.* За результатами вимірювань стандартних розчинів магнію малюють калібрувальну криву.

1. Беруть 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,75; 1,0 мл робочого стандартного розчину магнію, аналізують, так само, як і зразки крові. Загальний об'єм до 20 мл доводять бідистильованою водою.

2. Розрахунок проводять за формулою:

$$Mg \text{ (мМ / л)} = \frac{a \cdot 2 \cdot 100}{v} \cdot 0,411,$$

де:

a – кількість магнію в мг за калібрувальним графіком;

v – кількість мл безбілкового фільтрату крові, взятого для аналізу;

2 – ступінь розведення крові;

100 – перерахунок на 100 мл крові.

3. При  $v = 0,5$  мл формула розрахунку наступна:

4.

$$Mg \text{ (мМ/л)} = a \cdot 164,4.$$

### **Визначення вмісту сірки (S)**

*Принцип методу.* Наважку біологічного матеріалу мінералізують у суміші хлорної кислоти і насиченого розчину нітрату магнію за температури 200 °С протягом 4 год. При цьому вся сірка переводиться у форму сульфату, який визначають у вигляді муті сульфату барію, стабілізованого гліцерином, на спектрофотометрі або фотоелектроколориметрі. Цей метод дозволяє визначати сірку у малій кількості, тому може бути кваліфікований як мікрометод.

*Реактиви.* 1. Хлорна кислота ( $\text{HClO}_4$ , х. ч., вміст основної речовини не менше 50 %).

2. Насичений при 25 °С розчин нітрату магнію ( $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ): приблизно 200 г нітрату магнію розчиняють у 100 мл дистильованої води і нагрівають на водяній бані до вказаної температури, частина солі при цьому має залишитися нерозчиненою. У випадку, якщо сіль розчинилася повністю, то її додають доти, поки вона не випаде в осад.

3. Розчин хлористого барію на гліцерині. У мірну колбу на 1 л вносять 100 г  $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , додають 500 мл дистильованої води і 1–2 мл концентрованої соляної кислоти. Після розчинення солі додають 250 мл гліцерину і доводять дистильованою водою до 1 л. При наявності каламуті або осаду фільтрують через паперовий фільтр (червона стрічка).

4. Сульфат барію безводний ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ).

*Хід визначення.* У колбочки об'ємом 25 мл вносять біологічний матеріал (1 мл сироватки крові, молока, 10 мг волосяного покриву; 2–3 паралелі) і додають

3 мл хлорної кислоти, 2 мл насиченого розчину нітрату магнію, добре змішують і спалюють на піщаній бані. Спочатку піщану баню з колбами прогрівають до 200 °С, тоді зменшують газ для підтримання постійної температури і спалюють протягом 4 год. За цей час необхідно двічі перемішати розчин у колбах. Після спалювання у колбочці повинна залишитися абсолютно прозора і безбарвна рідина, яка при охолодженні застигає у тверду льодоподібну масу.

Після охолодження у колбочки вносять по 4 мл хлориду барію в гліцерині і, помішуючи, розчиняють затверділу масу. Отриману мутнувату рідину фотометрують при 420 нм на спектрофотометрі або нефелометрують при синьому світлофільтрі не пізніше як через 10 хв у 5 мл кюветах товщиною 1 см.

Для побудови графіка використовують розчин безводного сульфату натрію, що містить від 50 до 500 мкг сірки. Встановлено, що в цих межах спостерігається лінійна залежність між вмістом сірки та коефіцієнтом поглинання світла (екстинкцією), що дає можливість проводити розрахунки за формулою:

$$S = \frac{E_d}{P} \cdot 0,025,$$

де:

S – вміст сірки, %;

$E_d$  – середня екстинкція проби;

P – кількість матеріалу, мг, мл;

0,025 – коефіцієнт пропорційності.

*Інтерпретація.* В організмі тварин сірка знаходиться переважно у вигляді складних органічних сполук і входить до складу сірковмісних амінокислот (цистин, цистеїн, метіонін). Багато сірки є у таких білках, як кератини, овомукоїди та інші. Вона входить до складу вітамінів (тіамін, біотин, ліпоева кислота), деяких білкових гормонів (інсулін, кальцитонін) глутатіону, таурину та інших важливих для організму сполук. Біологічна роль сірки в організмі тварин надзвичайно багатогранна, що зумовлено її особливістю, яка полягає у тому, що її атоми, будучи у складі різноманітних сполук, надають їм унікальних властивостей, пов'язаних із варіабельністю числа валентностей, легкістю окиснення і відновлення, здатністю утворювати комплекси з деякими мінеральними елементами, ферментами, дихальними пігментами тощо.

Обмін сірки в організмі тварин тісно пов'язаний із загальним обміном, але найбільш з азотом. Сірка є інтегральним показником при визначенні якості вовни. Середній вміст сірки у вовні становить 2–5 %. У тонкій вовні є 2,9–5,0 % сірки, у грубій – 2,4–3,1 %. Зменшення вмісту загальної сірки у вовні свідчить про погіршення її фізико-хімічних властивостей, зокрема міцності. У волосяному покриві корів її міститься 2,2–2,4 %. Багато сірки є у пір'ї (2–2,5 %), рогах, копитах. Основним депо для відкладення неорганічної сірки прийнято

вважати шкіру, де її може депонуватися від 20 до 60 %, що становить 160–600 г. В організмі корови міститься 800–1000 г сірки. Вміст сірки у молоці коливається від 0,45 до 0,95 г/кг.

У крові сірка міститься у плазмі, де середня концентрація її становить 43,75 ммоль/л, в еритроцитах — 51,56 ммоль/л, лейкоцитах – 90,63 ммоль/л. В еритроцитах вона частково входить до складу амінокислот, в основному глутатіону (до 28,13 ммоль/л). У плазмі крові розрізняють білкову сірку (сірковмісні амінокислоти білків) і небілкову. Білкова фракція, яка становить 80–90 % від загальної сірки, в основному залежить від рівня плазматичних білків, головню альбуміну. Найбільшу частку небілкової фракції сірки (приблизно 80 %) становить окиснена сірка.

Головним кінцевим продуктом обміну сірки в організмі тварин є неорганічний сульфат, який у сечі є у вигляді трьох фракцій – неорганічний сульфат, ефіри сірчаної кислоти і нейтральна сірка, які становлять відповідно 80–85, 5–8 і 10–14 %. Вміст сірки у сечі, як правило, не перевищує 2,5 г.

Нестача сірки в раціоні викликає у тварин порушення функцій шкіри, випадіння волосся, анорексію, втрату маси, слабкість, підвищену саливацію. У рубці різко зменшується кількість мікроорганізмів, знижується інтенсивність ферментації і синтезу протеїну. При надлишку сірки у тварин спостерігається діарез, тремтіння м'язів, порушення гомеостазу міді. Максимально допустима кількість сірки в раціоні жуйних становить 0,40 %.

### **Визначення заліза в сироватці крові за кольоровою реакцією з бета-фенантроліном**

*Принцип методу.* Залізо (ферум) сироватки відновлюють до двохвалентного стану тіогліколевою кислотою, білки осаджують трихлороцтовою кислотою. У фільтраті проводять кольорову реакцію із бетафенантроліном, котрий з двохвалентним залізом у кислому середовищі утворює забарвлену комплексну сполуку з інтенсивністю забарвлення, пропорційній концентрації феруму, яку визначають фотометрично при довжині хвилі 510–550 нм.

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

#### *Реактиви*

1. Стандартний розчин амонію заліза (II) сірчаноокислого 17,9 мкмоль/л – 40 мл;
2. Бетафенантролін — 2х55 мл;
3. Кислота тіогліколева концентрована — 4 мл;
4. Розчин для осадження білків — 2х55 мл.

*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 місяців зберігання в темному і прохолодному місці.

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

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

Вміст заліза у сироватці крові визначають за формулою:

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

де:

$A_1$  – оптична густина дослідного зразка,

$A_2$  – оптична густина стандарту;

17,9 – коефіцієнт концентрації стандартного розчину амонію заліза (II) сірчаноокислого

*Примітка.* 1. При визначенні заліза необхідно використовувати лабораторний посуд, призначений виключно для цієї мети. Пробірки попередньо необхідно обробити розведеною соляною кислотою для видалення іонів заліза.

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

3. Використовується тільки бідистильована вода або вода перегнана у скляному посуді.

*Інтерпретація.* В організмі дорослих тварин концентрація феруму 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 діляться 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 – трансфери, феритин, гемосидерин (20-25 %). У сироватці крові концентрація феруму подана у таблиці 3.

Таблиця 3 – Вміст феруму у сироватці крові клінічно здорових тварин  
(мкмоль/л)

Велика рогата худоба		Коні	Вівці	Кози	Свині	Собаки	Коти
доросла	телята						
15–30	15–25	13–25	18–28	20–25	18–32	18–30	20–32

Дефіцит заліза (гіпосидероз) спостерігається при зменшенні надходження заліза з кормами (аліментарна нестача), порушенні всмоктування в шлунково-кишковому каналі (гастрит, пухлини, діарея), збільшенні потреби (вагітність, ріст), втраті внаслідок кровотеч, злякисних новоутвореннях, лейкозі, хронічному гепатиті, цирозі печінки, гнійних процесах, септичних захворюваннях у молодняку, залізодефіцитній анемії особливо поросят. Поросята-сисуні починають хворіти на анемію з 5–7-денного віку, максимального розвитку хвороба досягає у тритижневому віці. Телята хворіють від народження до 2–3-місячного віку, але симптоми хвороби у них менше виражені, порівняно з поросятами. До тритижневого віку поросятам потрібно від 114 до 200 мг заліза, а добова потреба телят становить 50–100 мг заліза.

Збільшення вмісту заліза у сироватці крові (гіперсидероз) може бути при недостатньому засвоєнні заліза (хвороби печінки), апластичній та гемолітичній анемії, нестачі вітаміну В<sub>12</sub>, нефриті, отруєнні залізом і свинцем.

### ***Визначення залізо зв'язувальної (ферумоз зв'язувальної) властивості сироватки крові***

*Принцип методу.* Досліджувану сироватку крові витримують з розчином тривалентного заліза, при чому весь трансферин насичується. Надлишок солей заліза видаляють адсорбцією на карбонаті магнію і визначають вміст заліза в надосадовій рідині за методом наведеним вище.

#### *Реактиви*

1. Залізо хлорне, 5 мг/мл. 2,42 г FeCl<sub>3</sub> • 6H<sub>2</sub>O розчиняють у 100 мл 0,005 н. HCl.
2. Магнію карбонат у порошку.
3. Реактиви, необхідні для визначення вмісту заліза у сироватці крові (див. попередню методику).

*Хід визначення.* До 2 мл досліджуваної сироватки крові додають 4 мл розчину хлорного заліза і ретельно перемішують. Через 5 хв додають порошок магнію карбонату в об'ємі 0,5 мл, струшують протягом 10–15 с і центрифугують. У надосадовій рідині визначають вміст заліза. Отриманий результат множать на 3 (розведення сироватки крові).

*Інтерпретація.* Залізо зв'язувальна властивість сироватки крові (ЗВСК) – показник, який характеризує здатність сироватки крові зв'язувати залізо. Залізо в організмі тварин знаходиться у комплексі з білком – трансферином. ЗВСК змінюється при порушенні метаболізму заліза в організмі. Для діагностики анемії використовують визначення латентної залізо зв'язувальної властивості сироватки крові (ЛЗВСК), тобто ЗВСК без сироваткового заліза.

Підвищення рівня ЛЗВСК відбувається при дефіциті заліза, залізодефіцитній анемії, гострому гепатиті. Зниження рівня ЛЗВСК є характерним при зниженні кількості білка в плазмі (при нефрозі, голодуванні), при хронічних інфекціях, цирозі, гематохроматозі.

### **Визначення вмісту селену (Se)**

*Принцип методу* полягає у кислотній мінералізації проб сумішшю азотної та хлорної кислот, відновленні шестивалентного селену до  $Se^{+4}$  і утворенні комплексу селенистої кислоти із 2,3-діамінофталіном-піазоселенулу, величина флюоресценції якого пропорційна вмісту селену в пробі.

*Обладнання:*

- 1) пробірка кварцева;
- 2) тигель порцеляновий;
- 3) спектрофлюориметр Hitachi MPF-2A;
- 4) вага аналітична;
- 5) піпетки скляні;
- 6) колби мірні об'ємом 500 і 1000 мл;
- 7) піч муфельна;
- 8) баня водяна з терморегулятором;
- 9) вода дистильована;
- 10) гексан, х. ч.;
- 11) лійка ділильна;
- 12) папір фільтрувальний;
- 13) аміак водний, х. ч.;
- 14) кислота хлорна, ч. д. а.;
- 15) кислота соляна, ч. д. а.;
- 16) кислота азотна, ч. д. а.;
- 17) перекис водню, ч. д. а.,
- 18) тетранатрієва сіль етилендіамінтетра оцтової кислоти;
- 19) натрій селенисто кислий.

Проведення вимірювання

### *1. Кислотна мінералізація*

Досліджувану пробу добре подрібнюють. Беруть наважку масою від 50 до 100 мг (у залежності від очікуваного вмісту селену), але не більше 100 мг проби і поміщають у кварцеві пробірки. В усі пробірки додають по 1 мл азотної кислоти та 0,7 мл 52 % хлорної кислоти (1 мл 42 % кислоти). Пробірки закривають корками і витримують за кімнатної температури від 12 до 18 год. Після цього їх поміщають у муфельну піч і здійснюють мінералізацію за температурного режиму: 120 °С – одну годину, 150 °С – одну годину, 180-185 °С – 1,5 год. Після закінчення процесу взірці повинні бути безбарвні. За наявності обвуглення спалюванні слід повторити з новою наважкою, збільшивши кількість хлорної кислоти до 1 мл 52 % (1,4 мл 42 %).

### *2. Видалення слідів азотної кислоти*

Для видалення слідів азотної кислоти муфельну пічку охолоджують до температури 150 °С, додають до проб 1–2 краплі перекису водню і витримують за вказаної температури протягом 10 хв. Після завершення процесу проби відразу витягають із муфельної печі.

### *3. Відновлення шестивалентного селену до $Se^{+4}$*

До проб додають по 1 мл 6 М соляної кислоти і витримують за температури 110 °С протягом 10 хв. Після закінчення часу проби відразу виймають із муфельної печі і додають по 1 мл дистильованої води.

### *4. Конденсація селенистої кислоти із 2,3-діамінонафталіном*

У кожен пробірку додають по 0,5 мл розчину тетранатрієвої солі етилендіамінтетраоцтової кислоти і по 1 мл розведеного аміаку. Швидко доводять рН до значень від 1 до 1,5 за універсальним індикатором, додаючи при необхідності, по краплях розчин аміаку або 0,1 М соляної кислоти. До отриманих розчинів додають по 1 мл раніше приготованого розчину 2,3-діамінонафталіну і витримують 30 хв за температури 50 °С, закривши попередньо пробірки від попадання прямих променів світла.

Після закінчення процесу проби витягають, охолоджують до кімнатної температури і кожен інтенсивно екстрагують 2,5 мл гексану протягом 50–60 с.

Визначають величину флюорисценції органічного екстракту при 376 нм і лямбда емісії 51 нм.

Додатковий контроль за точністю аналізу здійснюють, знімаючи спектри флюоресценції при вказаній довжині хвилі збудженого світла в інтервалі довжини хвиль 450–600 нм. Отримані спектри повинні мати один максимум при 519 нм.

До кожної серії аналізів будують калібрувальний графік.

### *5. Побудова калібрувального графіка*

Калібрувальний графік будують для кожного приладу, на якому проводиться вимірювання.

Для побудови калібрувального графіка беруть 6 пробірок і вносять: 0 (контрольний розчин); 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5 і 0,6 мл робочого стандартного розчину селенистого натрію, що відповідає: 0; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5 і 0,6 нмоль селену у пробі. В усі пробірки додають по 1 мл азотної кислоти та 0,7 мл 52 % хлорної кислоти (1 мл 42 % кислоти) і аналогічно виконують усі дії. Описані у пунктах 1 і 2.

Обчислення результатів вимірювання

Масову частку селену (X) у мкг/кг розраховують за формулою:

$$X = \frac{79 \cdot C}{a}$$

де:

C – кількість молей селену в пробі, визначена за калібрувальним графіком, нМ;

a – наважка проби, г;

79 – атомна маса селену.

За остаточний результат приймають середнє арифметичне значення двох визначень вмісту селену.

Похибка методу становить  $\pm 10\%$ .

*Приготування реактивів*

1. Приготування 0,1 М розчину соляної кислоти:

1 мл 36 % соляної кислоти густиною 1,19 г/мл розводять у мірній колбі до 100 мл дистильованою водою.

2. Приготування 6 М розчину соляної кислоти:

51 мл 36 % соляної кислоти густиною 1,19 г/мл розводять у мірній колбі до 100 мл дистильованою водою.

3. Приготування розчину аміаку:

25 % розчин аміаку густиною 0,88 г/мл розводять дистильованою водою 1:1. Розчин зберігають у темному посуді не більше місяця.

4. Приготування розчину тетранатрієвої солі етилендіамінтетраоцтової кислоти: 1,25 г тетранатрієвої солі етилендіамінтетраоцтової кислоти розчиняють у 100 мл дистильованої води.

5. Приготування розчину 2,3-діамінонафталіну:

Розчин 2,3-діамінонафталіну розчиняють у 100 мл 0,1 М соляної кислоти при помірному нагріванні (від 10 до 15 хв при температурі не вище 50 °С). Отриманий розчин переносять у ділільну лійку, тричі екстрагують гексаном (3 по 15 мл), шар води відокремлюють, фільтрують через фільтрувальний папір.



Розчин зберігають під шаром гексану при температурі від 0 до +4 °С у темноті до моменту флуорометричного визначення. Розчин готують в день проведення аналізу.

6. Приготування стандартного (основного) розчину селенистокиислого натрію:

0,01729 г селенистокиислого натрію розчиняють у невеликій кількості 0,1 М розчину соляної кислоти в мірній колбі на 100 мл і доводять до мітки соляною кислотою вказаної концентрації. Розчин містить 1 мкМоль селену в 1 мл. Розчин зберігають у темному посуді не більше місяця.

7. Приготування стандартного (робочого) розчину селенистокиислого натрію:

Піпеткою вносять 5 мл основного стандартного розчину у мірну колбу ємністю 500 мл і доводять об'єм до мітки 0,1 М соляною кислотою. Розчин містить 1 нМоль селену в 1 мл. Розчин зберігають у темному посуді не більше місяця.

*Інтерпретація.* Селен відноситься до есенціальних мінеральних елементів, дефіцит якого в раціонах тварин та людини призводить до порушень в окремих ланках обміну речовин і сприяє виникненню ряду захворювань. Він сильний імуномодулюючий та протираковий засіб, володіє унікальними антиоксидантними властивостями (захищає фосфоліпиди мембран від ПОЛ, входить до складу активного центру ГП, стимулює синтез відновленого глутатіону). Поряд із цим, селен покращує імунний захист організму від вірусів та інших хвороботворних мікроорганізмів. Всмоктування селену та його солей відбувається за участю L-цистеїну. Відомо, що органічні форми цього мікроелементу (селенметіонін) засвоюються краще ніж неорганічні (селеніт натрію). Вміст селену в сироватці крові подано у таблиці 4.

Таблиця 4 – Вміст селену в сироватці крові клінічно здорових тварин (мкмоль/л)

Велика рогата худоба		Коні	Вівці	Кози	Свині	Собаки	Коти
доросла	телята						
0,8–1,9	0,9–2,1	0,9–2,1	0,8–2,2	0,8–2,0	0,8–2,3	0,7–1,7	0,6–1,9

Недостатність селену найчастіше проявляється у вигляді захворювань шкіри, волосу, нігтів, імунодефіцитного стану, запальних захворювань суглобів, алергічних станів, зменшення білоксинтезуючої та дезінтоксикаційної функції печінки, дистрофічних змін у міокарді та м'язах, атеросклерозу. У певних концентраціях (у дозах більше 5 мг на день) селен та його сполуки є токсичними. Основними симптомами при передозуванні селену є: випадання волосся, еритема шкіри, нудота, блювота, порушення функції печінки, бронхопневмонія.

Рекомендовані добові потреби тварин у селені становлять від 0,1 до 0,5 мг/кг корму, в залежності від виду та віку.

### **Визначення вмісту макро- та мікроелементів методом атомно-абсорбційної спектрофотометрії**

Для визначення мікро- та макроелементів зразки попередньо мінералізують методом сухого або мокрого озолення. Після озолення проводять кислотну екстракцію. У підготовлених зразках визначають елементи методом атомно-абсорбційної спектрофотометрії.

*Принцип методу* полягає у тому, що зразок розпилюється у полум'ї, де утворюється холодна атомна пара. Через атомну пару проходять промені світла певної резонансної частоти відповідного елемента, де електронами зовнішньої оболонки поглинається частина світлового потоку, подальша інтенсивність якого визначається детектором. Поглинання пропорційне концентрації елемента у полум'ї. Порівняно з калібрувальною кривою за допомогою комп'ютерної програми йде перерахунок концентрації елемента у пробі.

*Підготовка до мінералізації.* Новий або забруднений лабораторний посуд після миття в розчині будь-якого миючого засобу промивають проточною водою і споліскують дистильованою водою. Процедура очистки лабораторного посуду перед використанням включає наступні послідовні етапи:

- миття посуду гарячим розчином азотної кислоти (1 : 1);
- споліскування 3–4 рази дистильованою водою;
- миття посуду гарячим розчином соляної кислоти (1 : 1);
- споліскування 3–4 рази дистильованою водою та 1–2 рази бідистильованою або деіонізованою водою;
- сушка.

Обробка гарячим розчином кислоти: лабораторний посуд поміщають у термостійкий хімічний стакан місткістю 1000 см<sup>3</sup>, заливають розчином кислоти, нагрівають до кипіння і вимикають підігрів. Витримують до повного охолодження і промивають (див. вище).

*Суха мінералізація зразків.* Метод сухого озолення базується на повному розкладі органічних речовин при спалюванні проби в муфельній печі за умови контрольованого температурного режиму (застосовується для всіх видів сировини і продуктів, крім тваринних жирів і олій).

Для того, щоб отримати найбільш точні результати, потрібно правильно провести суху мінералізацію зразків.

1. Хімічно чисті тиглі прожарюють у муфельній печі за температури 500 °С протягом двох годин, а потім охолоджують до кімнатної температури.

2. Цільну кров (гепаринізовану або цитратну) об'ємом 10 мл (тканина – маса 10 г) вносять у тигель.

3. *Висушування:* тигель з пробою ставлять у сушильну шафу за температури 70–80 °С на дві години, а потім — за температури 150 °С на три години.

4. *Обвуглення:* тигель зі зразком переносять на газовий пальник або електроплитку і доводять до максимальної потужності розігріву. Пробу обвуглюють до закінчення кипіння і виділення пари, диму, не допускаючи загорання і викидів.

5. *Мінералізація:* спалювання зразка відбувається в муфельній печі за температури 450 °С. Електропеч потрібно нагрівати поступово, піднімаючи температуру на 50 °С через кожні 30 хв. **Увага!!!** Максимальна температура у муфельній печі не повинна перевищувати 450 °С. Пробу озолують протягом 10–15 год. Мінералізація вважається закінченою тільки тоді, коли зола стала білою або блідо-рожевою без обвуглених частинок, що вказує на повне видалення органічних речовин.

6. Якщо мінералізація пройшла не повністю, тоді в охолоджений тигель із золою додають 1 мл концентрованої соляної кислоти і 1 мл концентрованої сірчаної кислоти. Тигель з сумішшю ставлять на піщану баню за температури 200–300 °С і висушують пробу. Вказаний цикл повторюють декілька разів до повного озолення.

7. *Розчинення:*

- озолену пробу розчиняють у невеликій кількості 3 н. соляної кислоти;
- фільтрують зразок у мірну колбу об'ємом 10 мл;
- споліскують тигель 2–4 рази 3 н. соляною кислотою;
- промивають фільтр і об'єм колби доводять до мітки (3 н. HCl).

Розчин придатний для визначення макро- та мікроелементів на атомно-абсорбційному спектрофотометрі.

*Мокра мінералізація зразків.* Метод мокрого озолення базується на повному розкладі органічних речовин проби при нагріванні у суміші концентрованих азотній і соляній кислотах і перекису водню.

1. У колбу вносять концентровану азотну кислоту з розрахунку 10 мл на кожні 5 г проби, витримують не менше 5 год, додають 2–3 скляних шарики, закривають грушовидним корком і нагрівають на електричній плиті поступово піднімаючи температуру. Випаровують зразок до об'єму 5 мл.

2. Колбу охолоджують, додають 10 мл концентрованої азотної кислоти, випаровують до об'єму 5 мл. Цей цикл повторюють 2–4 рази до припинення виділення бурих парів.

3. У колбу вносять 10 мл концентрованої азотної кислоти, 5 мл концентрованої сірчаної кислоти, 4 мл перекису водню з перерахунку на кожні 5 г проби. Випаровують зразок до об'єму 5 мл не допускаючи утворення коричневого забарвлення рідини. При появі коричневого забарвлення нагрівання призупиняють. Колбу охолоджують до кімнатної температури.

4. У колбу вносять 5 мл концентрованої азотної кислоти, 2 мл перекису водню і нагрівають до появи білої пари сірчаного ангідриду. Якщо при цьому розчин не став безбарвним, то цей процес повторюють. Мінералізація вважається закінченою тільки тоді, коли розчин після охолодження залишається безбарвним.

5. Для видалення залишків кислот в охолоджену колбу додають 10 мл дистильованої води, нагрівають до появи білої пари, після чого кип'ятять ще 10 хв. Цю процедуру повторюють ще 2 рази. Якщо утворився осад, у колбу додають 20 мл бідистильованої води, 2 мл сірчаної кислоти, 5 мл соляної кислоти і кип'ятять до розчинення осаду. Після розчинення осаду розчин випаровують на водяній бані до об'єму 1 мл.

6. Розчин для визначення селену готують в 4–6 М НСІ. Перед визначенням об'єм колби доводять до 10 мл 4–6 М НСІ і кип'ятять 15–20 хв. Охолоджують і доводять до мітки тією ж кислотою. Нагрівання в соляній кислоті забезпечує перетворення селену зі ступеню окиснення VI у ступінь окиснення IV, який є аналітично активним при подальшому визначенні на атомно-абсорбційному спектрофотометрі.

Концентрацію елементів розраховують за формулою:

$$C_n = \frac{C_p \cdot V \cdot K}{m \text{ або } V_1},$$

де:

$C_n$  – концентрація елемента у пробі;

$C_p$  – концентрація елемента у розчині;

$V$  – вихідний об'єм досліджуваного розчину;

$K$  – коефіцієнт розведення;

$m$  – маса проби;

$V_1$  – об'єм проби.

### **Контрольні запитання.**

1. Яку функцію виконують макроелементи в організмі тварин?
2. Принцип методу визначення загального кальцію за кольоровою реакцією з орто-крезолфталеїнкомплесомом.
3. Принцип методу визначення білокзв'язаного кальцію.
4. Принцип методу визначення неорганічного фосфору в сироватці крові за відновленням фосфорно-молібденової кислоти.
5. Визначення вмісту сірки і селену.

## Список використаних джерел

1. Ветеринарна клінічна біохімія / Левченко В. І., Влізло В. В., Кондрахін І. П. та ін.; за ред. В. І. Левченка і В. Л. Галяса. Біла Церква: БДАУ, 2002. 400 с.
2. Ветеринарна клінічна біохімія: навч. посіб. / Мельничук Д. О., Грищенко В. А., Томчук В. А. та ін.; за ред. Д. О. Мельничука. 2-е вид. перероб і доп. Київ: НУБіП України, 2014. 456 с.
3. Клінічна біохімія (Підручник) / За ред. проф. Склярова О.Я. – К.: Медицина, 2006. 432 с.
4. Клінічна біохімія: навч. посібник / За ред. О.П.Тимошенко. – К.: ВД «Професіонал», 2005. 288 с.
5. Клиническая биохимия / Цыганенко А.Я., Жуков В.І., Леонов В.В., Мясоєдов В.В., Завгородний И.В. – Х.: Факт, 2005. 456 с.
6. Губський Ю.І. Біологічна хімія. Київ-Вінниця: Нова Книга, 2009. 664 с.
7. Русак В.С., Чала І.В. Клінічна оцінка біохімічних, морфологічних показників крові та сечі тварин: Навчальний посібник. Житомир: «Полісся», 2016. 544с.