

**МИНИСТЕРСТВО СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА РФ
РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ НАУК**

**ГНУ ВНИИМС
ФГОУ ВПО ОГАУ**

Родионова Г.Б., Герасименко В.В.

**МЕТОДЫ ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКИХ
ИССЛЕДОВАНИЙ КРОВИ**

Оренбург 2007

УДК 636:612.1
ББК 28.66
Р – 60

Рецензенты:

Директор ГУ «Волгоградский НИТИ ММС и ППЖ», д.с.-х.н., профессор, академик РАСХН, Лауреат премии Правительства Российской Федерации в области науки и техники Горлов И.Ф.;

Заведующий кафедрой ветсанэкспертизы, фармакологии и зооигиены ФГОУ ВПО ОГАУ, д.б.н., профессор Тайгузин Р.Ш.;

Исполнительный директор Института Биоэлементологии ГОУ ОГУ, д.б.н. Мирошников С.А.

Монография рассмотрена, одобрена и рекомендована к изданию решением Ученого совета ГНУ ВНИИМС и Ученого совета факультета ветеринарной медицины и биотехнологии ФГОУ ВПО ОГАУ от 17 ноября 2004 года (протокол №3)

Родионова Г.Б., Герасименко В.В.

Методы физиолого-биохимических исследований крови. – Оренбург: Издательский центр ГНУ ВНИИМС, РАСХН, 2007. – xxx с.

В книге подробно описаны методы и методики отбора проб крови; изучения белкового, минерального, липидного и углеводного обмена; показателей специфической и неспецифической резистентности; способы определения активности некоторых ферментов. Книга адресована аспирантам и докторантам, занимающимся данной проблемой с различных позиций физиологии, биохимии, сельского хозяйства, ветеринарии, микробиологии и медицины. Монография будет интересна для студентов и преподавателей вышеуказанных специальностей.

УДК 636:612.1
ББК 28.66

© Родионова Г.Б., Герасименко В.В.
© Издательский центр ГНУ ВНИИМС, РАСХН, 2007.

Содержание

| | |
|---|----|
| Введение..... | 6 |
| 1 Отбор и подготовка проб крови..... | 8 |
| 2 Гематологические исследования..... | 9 |
| 2.1 Определение количества эритроцитов в крови..... | 9 |
| 2.2 Определение количества лейкоцитов в крови..... | 9 |
| 2.3 Определение количества гемоглобина в крови..... | 10 |
| 2.4 Определение гематокритной величины..... | 11 |
| 3 Методы исследования белкового обмена..... | 12 |
| 3.1 Определение общего белка в сыворотке (плазме) крови и других биологических жидкостях..... | 12 |
| 3.1.1 Унифицированный способ определения общего белка в сыворотке (плазме) крови..... | 14 |
| 3.1.2 Определение содержания общего белка в сыворотке крови рефрактометрическим методом..... | 16 |
| 3.2 Исследование белкового спектра крови..... | 18 |
| 3.2.1 Определение белковых фракций сыворотки крови методом электрофореза на бумаге..... | 20 |
| 4 Определение остаточного азота и его компонентов..... | 27 |
| 4.1 Определение остаточного азота крови гипобромитным методом..... | 28 |
| 4.2 Методы определения мочевины..... | 30 |
| 4.2.1 Определение мочевины сыворотке крови экспресс-методом с применением реактивной бумаги «Уреатест»..... | 32 |
| 4.2.2 Определение мочевины в сыворотке крови и в моче по цветной реакции с диацетилмонооксимом..... | 33 |
| 4.2.3 Определение мочевины в сыворотке крови уреазным методом по реакции с фенолгипохлоритом..... | 35 |
| 4.2.4 Определение мочевины крови уреазным методом по реакции с реактивом Несслера..... | 37 |
| 4.3 Аминный азот..... | 38 |
| 4.3.1 Определение свободного аминного азота в сыворотке крови..... | 39 |
| 4.3.2 Определение азота свободных аминокислот сыворотки крови по содержанию перегнанного аммиака..... | 40 |
| 4.4 Мочевая кислота..... | 40 |
| 4.4.1 Определение мочевой кислоты в сыворотке крови унифицированным фосфорновольфрамовым методом..... | 43 |
| 4.4.2 Определение моченой кислоты по методу Мюллера – Зейферта..... | 44 |
| 5 Изучение углеводного обмена..... | 47 |
| 5.1 Определение глюкозы в крови..... | 47 |
| 5.1.1 Определение глюкозы в крови и моче по цветной реакции с ортолуидином..... | 48 |
| 5.1.2 Определение глюкозы биологических жидкостей анилиновым методом..... | 52 |

| | | |
|-------|---|----|
| 5.1.3 | Определение глюкозы в крови, плазме (сыворотке) и спинномозговой жидкости глюкозооксидазным методом..... | 52 |
| 6 | Методы изучения обмена липидов..... | 57 |
| 6.1 | Исследование общих липидов и их фракций..... | 57 |
| 6.1.1 | Определение общих липидов в сыворотке крови по цветной реакции с сульфофосфованилиновым реактивом..... | 58 |
| 6.2 | Холестерин..... | 60 |
| 6.2.1 | Метод определения общего холестерина в сыворотке крови, основанный на реакции Либермана - Бурхарда (метод Илька)..... | 62 |
| 6.2.2 | Метод определения холестерина по Abell..... | 64 |
| 6.3 | Методы определения свободного и эстерифицированного холестерина в сыворотке крови..... | 65 |
| 6.3.1 | Непрямой метод определения свободного и эстерифицированного холестерина в сыворотке крови по реакции Златкиса – Зака..... | 66 |
| 6.3.2 | Определение свободного и эстерифицированного холестерина в сыворотке крови прямым методом..... | 68 |
| 7 | Исследование пигментного обмена..... | 71 |
| 7.1 | Методы определения билирубина в сыворотке крови..... | 71 |
| 7.1.1 | Определение содержания билирубина и его фракций в сыворотке крови колориметрическим диазометодом..... | 73 |
| 7.1.2 | Определение билирубина в малом объеме сыворотки крови..... | 75 |
| 7.1.3 | Ультрамикрометод определения билирубина в капиллярной крови.... | 77 |
| 8 | Исследование минеральных веществ крови..... | 78 |
| 8.1 | Исследование электролитов в крови и моче методом пламенной фотометрии..... | 78 |
| 8.1.1 | Определение электролитов в крови и моче методом пламенной фотометрии..... | 79 |
| 8.2 | Методы определения кальция в сыворотке крови..... | 84 |
| 8.2.1 | Определение общего кальция в сыворотке крови фотометрическим методом, основанным на реакции с глиоксальбис[2-оксианилом]..... | 86 |
| 8.2.2 | Определение общего кальция в сыворотке и плазме крови по цветной реакции с о-КФК..... | 87 |
| 8.3 | Исследование магния в сыворотке (плазме) крови, эритроцитов, моче... | 87 |
| 8.3.1 | Определение магния в сыворотке (плазме) крови и эритроцитах по цветной реакции с титановым желтым..... | 88 |
| 8.3.2 | Определение магния в эритроцитах..... | 90 |
| 8.4 | Методы определения хлорид-ионов в крови, моче и спинномозговой жидкости..... | 90 |
| 8.4.1 | Определение ионов хлора в сыворотке крови..... | 92 |
| 8.5 | Неорганический фосфор..... | 94 |
| 8.5.1 | Определение неорганического фосфора..... | 95 |
| 8.5.2 | Колориметрическое определение содержание фосфора..... | 96 |
| 8.6 | Определение меди, цинка и железа в сыворотке крови..... | 97 |
| 9 | Показатели неспецифической резистентности организма..... | 99 |

| | |
|--|-----|
| 9.1 Методика определения БАСК..... | 99 |
| 9.2 Нормальные антитела (гетероагглютинины)..... | 99 |
| 9.3 Комплемент..... | 101 |
| 9.4 Бета-лизин..... | 103 |
| 9.5 Лизоцим..... | 104 |
| 9.6 Фагоцитарная активность лейкоцитов..... | 106 |
| 10 Показатели специфической резистентности животных..... | 110 |
| 10.1 Иммуноглобулины..... | 110 |
| 10.1.1 Электрофорез белков сыворотки крови в агаровом геле..... | 111 |
| 10.1.2 Метод радиальной иммунодиффузии..... | 114 |
| 10.1.3 Метод дискретного осаждения..... | 116 |
| 10.2 Т- и В-системы иммунитета..... | 118 |
| 10.2.1 Методы определения Т- и В-лимфоцитов..... | 119 |
| 10.2.2 Реакция бласттрансформации лимфоцитов крови (РБТЛ)..... | 123 |
| 11 Определение активности ферментов..... | 126 |
| 11.1 Определение активности аминотрансфераз (трансаминаз)..... | 126 |
| 11.1.1 Колориметрический динитрофенилгидразиновый метод исследования активности аминотрансфераз в сыворотке крови..... | 127 |
| 11.2 Определение активности фосфатаз..... | 130 |
| 11.2.1 Определение активности щелочной фосфатазы в сыворотке крови по гидролизу р-нитрофенилфосфата..... | 133 |
| 11.2.2 Определение активности щелочной и кислой фосфатаз в сыворотке крови по гидролизу р-глицерофосфата..... | 136 |
| 12 Способы изучения антиоксидантного статуса организма..... | 140 |
| 12.1 Оценка антиокислительной активности (АОА) плазмы крови с применением желточных липопротеидов..... | 140 |
| 12.2 Метод определения перекисей липидов (малонового диальдегида) в тесте с тиобарбитуровой кислотой..... | 141 |
| 12.3 Определение активности каталазы эритроцитов в гемолизате крови... | 142 |
| 12.4 Определение активности супероксиддисмутазы крови..... | 143 |
| 12.5 Определение активности глутатионпероксидазы в эритроцитах..... | 144 |
| 12.6 Определение активности церулоплазмينا..... | 145 |
| Приложение..... | 147 |

ВВЕДЕНИЕ

Положительные сдвиги в сельском хозяйстве нашей страны привели к интенсификации научных исследований в животноводстве. Проводится большая работа в области фундаментальных и прикладных физиолого-биохимических исследований. Безусловно, изучение степени воздействия того или иного фактора на продуктивность сельскохозяйственных животных и птицы невозможно без изучения физиолого-биохимического статуса их организма. Главным объектом изучения в данном случае является кровь. Знание и владение методиками определения основных компонентов крови дает возможность более глубоко рассмотреть механизмы влияния проведения селекционной работы, изменения рационов питания, введение в корма биологически активных добавок различного происхождения, пробиотиков и т.д.

Данная книга не претендует на полноту освещения всех разработок проводимых в этом направлении, однако достаточно полно раскрывает те методы и методики, которые применяют в своих исследованиях специалисты комплексной аналитической лаборатории Всероссийского научно-исследовательского института мясного скотоводства и кафедры химии Оренбургского государственного аграрного университета.

Авторы предлагают использовать те методы, которые были апробированы ими с некоторыми иногда с небольшой модификацией.

В настоящее время Международной Федерацией Клинической Химии (МФКХ) различается несколько групп аналитических методов.

1. Окончательные - методы, которые после всестороннего теоретического и практического исследования признаны не имеющими источников ошибок. Пример одного из них - способ определения кальция масс-спектрометрией с изотопным разведением. Окончательные методы дорогостоящи, вследствие чего возникает потребность в других, более доступных способах, для проведения которых необязательны теоретические расчеты, гарантирующие их правильность.

2. Методы, правильность которых оценивается сравнением с окончательными, именуется референтными. Выполняемые с помощью доступного оборудования, они позволяют получать результаты, статистически неотличимые от таковых, получаемых с использованием окончательных методов. Примером одного из них является атомно-абсорбционный способ исследования кальция. Указанные методы налаживаются в точно работающих референтных лабораториях. К настоящему времени они предложены лишь для небольшого количества исследуемых компонентов.

3. Рутинные методы - способы исследования, характеризующиеся известным отклонением, установленным в результате оценки их надежности. Это официально утвержденные (унифицированные) методы клинико-биохимических исследований, применяемые в повседневной практике лабораторных работ.

4. Методы с неизвестным отклонением. К этой группе относятся методы, аналитические качества которых ранее не изучались.

В данный момент на рынке аналитического оборудования представлен широкий спектр не только классических приборов и оборудования, но и достаточно новые автоматические и полуавтоматические анализаторы биологических жидкостей, которые значительно облегчают процедуру проведения физиолого-биохимических исследований. В частности широко известная компания Люмэкс предлагает Полуавтоматический биохимический анализатор БИА-ЛАБ-100 Регистрационное удостоверение Минздравсоцразвития № ФС 02012006/3197-06. Конструкция прибора, наличие встроенного термостабируемого кюветного отделения позволяет реализовать современные методы анализа биопроб: метод по конечной точке; кинетика; оптическая плотность; фиксированное время; двухволновая, многоточечная калибровка. Измерения оптической плотности выполняются с помощью встроенных в анализатор интерференционных светофильтров (340, 405, 505, 545, 575, 630 нм). Светофильтры автоматически устанавливаются в измерительный канал согласно выбранной пользователем методике. Данный прибор обладает значительными аппаратными и методическими возможностями: 1) определение глюкозы, гемоглобина, общего белка, альбумина, креатинина, билирубина, мочевины, мочевой кислоты, холестерина, триглицеридов, активности АлТ, АсТ, ЛДГ, α -амилазы, кислой и щелочной фосфатазы, а также макроэлементов и электролитов; 2) память на 100 программ пользовательских методик; 3) защита программ методик паролем; 4) автоматическая установка светофильтров в измерительный канал; 5) изменение порядкового номера пробы; 6) проведение повторных измерений пробы; 7) автоматический контроль результатов на попадание в диапазон «нормы»; 8) до 31 измерения оптической плотности за минуту при измерении типа «кинетика»; 9) вывод на дисплей в режиме реального времени значения оптической плотности при кинетических измерениях; 10) вывод на экран дисплея и принтер графика зависимости оптической плотности от времени и средних значений за каждую минуту при кинетических измерениях; 11) вывод на экран дисплея и принтер калибровочных графиков; 12) автоматический контроль наличия воздуха (жидкости) в проточной системе; 13) встроенная программа для проведения контроля качества (норма и патология); 14) хранение в памяти анализатора и печать контрольных карт с учетом 30 последних измерений контролей; 15) вывод на печать результатов анализов за день в форме «Бланки пациентов» (для медицинских лабораторий). (По данным сайта: www.lumex.ru)

В данной книге не представлены методы и методики работы с вышеуказанными автоматическими анализаторами, а лишь подробно описаны классические методики.

1 ОТБОР И ПОДГОТОВКА ПРОБ КРОВИ

При сравнительном изучении влияния алиментарных и технологических факторов, а также биологических особенностей, пробы крови необходимо брать перед кормлением животных или же спустя 5-6 часов после кормления.

При изучении влияния экстремальных условий (стресс-факторов), например транспортировки, кровь следует брать как перед погрузкой животных, так и сразу же после прибытия их на место назначения.

Для каждого животного готовится 2 пробирки - 1 простая и 1 биологическая. Первая, объемом 20 мл, предназначена для получения цельной крови. В нее вносят 2-3 капли гепарина (если не требуется определение натрия, то стабилизировать кровь можно солями лимонной или щавелевой кислот из расчета 10-15 мг) и после взятия крови, пробирку переворачивают 2-3 раза, чтобы гепарин хорошо смешался с кровью.

Вторая пробирка объемом 50 мл служит для получения сыворотки. Свернувшуюся кровь во второй пробирке обводят спицей и ставят в термостат при 37⁰ С, для окончательного отделения сыворотки.

В цельной крови определяют количество форменных элементов, гемоглобин, гематокрит, кетоновые тела, общий, остаточный и аминный азот и некоторые другие показатели.

В плазме крови, полученной после центрифугирования, определяют содержание свободных аминокислот и ряд других компонентов.

В сыворотке крови определяется содержание общего белка, белковых фракций мочевины, общих липидов, холестерина, фосфолипидов, липопротеидов, общего кальция, щелочной фосфатазы, витаминов, микро- и макроэлементов, а также другие интересующие показатели.

Техника получения сыворотки крови. Для быстрого получения сыворотки, кровь сразу набирают в центрифужные пробирки, ставят в термостат при температуре 37⁰ С на 1 час, затем свернувшуюся кровь центрифугируют при 2500-3000 об/мин. Прозрачную сыворотку сливают в сухую стерильную посуду и хранят в холодильнике при температуре +4-7⁰ С.

2 ГЕМАТОЛОГИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Определение количества эритроцитов в крови

Вариант 1

Приборы и оборудование: фотоэлектроколориметр, пипетки, пробирки.
Реактивы: 3% раствор NaCl.

В обыкновенную лабораторную пробирку длиной от 15 см и поперечником не более 1,5 см наливают заранее 4 мл 3% раствора NaCl. Добавляют по 0,02 мл крови и несколько раз промывают этим же раствором. Тщательно перемешивают пробирки круговыми движениями между ладонями.

Определение делают на фотоэлектроколориметре. Кювета №1, длина волны 540 нм. Светофильтр зеленый. Контроль - 3% раствор NaCl.

Расчет: показания ФЭК умножаются на коэффициент 16,4.

Литература:

В.Е.Предтеченский «Руководство по клиническим лабораторным исследованиям». Медгиз. М. 1960.

Вариант 2

Стерильную заряженную камеру Горяева помещают на предметный столик микроскопа и через 2-3 мин, когда прекратится движение форменных элементов в камере, под малым увеличением находят сетку и приступают к подсчету эритроцитов. Подсчитывают число эритроцитов в 5 больших или в 80 маленьких квадратах. Квадраты для счета выбирают либо по диагонали, либо 4 квадрата по углам сетки и один в середине. При подсчете эритроцитов придерживаются следующего правила: учет клеток начинают с левого малого квадрата и продолжают в правую сторону; затем считают клетки во втором ряду малых квадратов справа налево; следующий ряд опять учитывают слева направо и последний ряд – справа налево. Относящимися к квадрату эритроцитами считают клетки, расположенные внутри квадрата и касающиеся его левой и верхней границ. Эритроциты расположенные на правой и нижней границе не учитываются. Расчет проводят по формуле:

$$X = \frac{Y * 4000 * n}{80}$$

где X – содержание эритроцитов в 1 мм³; Y – в 5 больших квадратах; n – степень разведения крови (1:100, 1:200); 80 – количество малых квадратов, в которых проведен учет эритроцитов. При разведении крови в 200 раз можно провести упрощение формулы, сократив числитель и знаменатель на 80. Тогда определить содержание эритроцитов в 1 мм³ можно путем умножения количества клеток в 5 больших квадратах на 10000.

Литература:

Болотников И.А., Соловьёв Ю.В. Гематология птиц// Л., “Наука”, 1980. 116 с.

2.2 Определение количества лейкоцитов в крови

Вариант 1 (животные)

Приборы и оборудование: микроскоп, камера Горяева, маленькие пробирки. Микропипетка от гемометра Сали.

В пробирки вносят по 0,4 мл жидкости Тюрка (1-3% раствора уксусной кислоты, к которой добавляется 1% водный раствор генциан- или метилвиолета, 1мл на 100 мл кислоты). Затем вносят по 0,02 мл крови. Тщательно перемешивают, осторожно вращая между ладонями. Получается разведение 1:20. Стеклопалочкой с закругленным концом берется капля взвеси и подпускается под шлифованное стекло счетной камеры Горяева. Количество лейкоцитов подсчитывается под микроскопом (увеличение 15 x 10) в 25 больших квадратах. Полученный результат умножается на 5.

Литература:

В.Е.Предтеченский «Руководство по клиническим и лабораторным исследованиям». Медгиз. М. 1960.

Вариант 2 (птица)

Наличие ядер в эритроцитах птиц делает непригодными методы исследования, которыми пользуются при подсчете клеток белой крови у млекопитающих. Поэтому, гематологи, работающие с кровью птиц, разработали специальные методы и разбавители крови для определения количества лейкоцитов и тромбоцитов. В стеклянные пробирки объемом 5-6 мл опускают по 1 стеклянной бусинке, затем наливают по 3,98 мл (разведение 1:200) или по 1,98 мл (разведение 1:100) жидкости для разведения, пипеткой от гемометра Сали или эритроцитарным меланжером осторожно выдувают на дно пробирки 20 мм³ крови и промывают пипетку несколько раз этим же раствором. Пробирку закрывают пробкой и содержимое взбалтывают в течение 2-3 минут. Затем каплю взвеси переносят в счетную камеру и подсчитывают количество лейкоцитов в 400 малых (25 больших) квадратах. Лучше эту работу проводить при объективе 40. Расчет проводят по формуле:

$$X = \frac{Y * 4000 * n}{400}$$

где X – количество лейкоцитов в 1 мм³; n – число клеток в 400 малых квадратах; Y – степень разведения крови.

При разведении крови в 100 раз число клеток в 400 малых квадратах умножают на 1000 и получают искомый результат. В качестве разбавителей используют различные растворы красок. Используемый нами разбавитель имеет следующий состав: Азур II массой 0,1 г и раствор хлорида натрия (0,9 %) объемом 100 мл. Краску растворяют в растворе хлорида натрия, подогретого до 70-80° С.

Литература:

Болотников И.А., Соловьёв Ю.В. Гематология птиц // Л., “Наука”, 1980. 116 с.

2.3 Определение количества гемоглобина в крови

Приборы и реактивы: гемометр Сали, 0,1 н раствор HCl, дист. вода.

В градуированную пробирку от гемометра Сали наливают пипеткой 0,1 н раствор HCl до нижней метки, затем микропипеткой наливают 0,02 мл крови, коснувшись пипеткой поверхности жидкости. Кровь падает на дно, верхний слой жидкости остается прозрачным. Повторным втягиванием и выдуванием верхнего слоя кислоты промывают капилляр. Кровь в пробирке тщательно раз-

мешивают до равномерного окрашивания раствора. По истечении 5 мин. прибавляют дистиллированную воду до тех пор, пока цвет раствора гематина в пробирке не будет одинаков с цветом стандарта. Смешивание производится тонкой стеклянной палочкой с закругленным концом.

Отмечают уровень стояния жидкости. Эта цифра указывает содержание гемоглобина в г%. Результат умножается на 10.

Литература:

В.Е.Предтеченский «Руководство по клиническим лабораторным исследованиям». Медгиз. М. 1960.

2.4 Определение гематокритной величины

Для определения величины гематокрита кровь с добавлением антикоагулянта (гепарин) набирают в градуированные пробирки или капилляры диаметром около 2 мм. Пробирки ставят в центрифужные стаканы и центрифугируют при 2-3 тыс. об./мин до получения постоянного объема эритроцитов. Обычно для этого требуется от 10 до 20 мин. При работе с пипетками их концы закрывают резиновым кольцом и после этого в гнезда центрифуги с ротором для центрифугирования капилляров. Накладывать резиновое кольцо следует осторожно, чтобы не выгнать из капилляра часть крови. После центрифугирования определяют высоту столба эритроцитов и высоту столба всей крови и рассчитывают величину гематокрита по формуле: $Hem \% = h_э/h_k$, где $h_э$ – высота столба эритроцитов, мм; h_k – высота столба крови, включая эритроциты, лейкоциты и плазму, мм.

Литература:

Болотников И.А., Соловьёв Ю.В. Гематология птиц.// Л., “Наука”, 1980. 116 с.

3 МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ БЕЛКОВОГО ОБМЕНА

Для диагностики ряда патологических состояний, сопровождающихся нарушениями в метаболизме белков, большое значение приобрели методы определения общего белка и белковых фракций в различных биологических жидкостях. Знание величины содержания общего белка в плазме крови позволяет не только выявить синдромы гипер- и гипопроteinемии, но и произвести расчет концентрации различных фракций (альбуминов, глобулинов: α_1 , α_2 , β , γ и др.) в размерности г/л. Такой способ оценки протеинограммы дает гораздо больше информации о состоянии белкового обмена, чем обычно применяемое выражение белковых фракций в относительных процентах.

3.1 Определение общего белка в сыворотке (плазме) крови и других биологических жидкостях

Все известные способы определения концентрации общего белка в сыворотке (плазме) крови подразделяют на следующие основные группы:

- 1) азотометрические, основывающиеся на установлении количества белкового азота (к ним относится классический метод Къельдаля (1883) и его различные модификации);
- 2) способы, состоящие в определении плотности сыворотки (плазмы);
- 3) весовые (гравиметрические), в этих случаях белки сыворотки крови осаждают, высушивают до постоянного веса и взвешивают на аналитических весах;
- 4) рефрактометрические;
- 5) колориметрические, основывающиеся на цветных реакциях белков с определенными реактивами (из них наиболее широкое применение нашла биуретовая реакция. В методе Лоури наряду с биуретовой используют реакцию Фолина на ароматические аминокислоты, что значительно повышает чувствительность определения);
- 6) нефелометрические, количество белка устанавливают по степени помутнения, производимого реактивами;
- 7) поляриметрические;
- 8) спектрофотометрические, заключающиеся в измерении степени светопоглощения в ультрафиолетовой области (200-220 или 280 нм);
- 9) другие методы.

При использовании азотометрических способов следует исходить из того, что белки содержат в среднем 16 % азота. Поэтому полученная при определении содержания белкового азота величина умножается на 6,25 (100: 16). Нужно иметь в виду, что в плазме крови всегда обнаруживается небелковый (остаточный) азот. К тому же фактор пересчета 6,25 является неточным, так как процент содержания азота в различных белковых молекулах колеблется от 14 до 19, что вызывает отклонение этого коэффициента в пределах от 5,3 до 8,1.

Методы, основанные на определении плотности сыворотки крови (способом падающей капли), неточны, так как плотность зависит от содержания не только белков, но и других веществ, находящихся в плазме. Рефрактометрический способ измерения концентрации общего белка также несовершенен: даже в норме часть рефракции обуславливается иными компонентами сыворотки,

например минеральными веществами, углеводами. При некоторых патологических состояниях содержание указанных веществ увеличивается, что приводит к значительным ошибкам в определении.

Весовые методы являются весьма трудоемкими (необходимо отделить белок от небелковых веществ и идеально его обезводить) и требуют большого количества сыворотки.

Из колориметрических способов определения уровня общего белка особого внимания заслуживают биуретовые методы, основанные на биуретовой реакции; впервые она описана в 1914 г. Сущность ее состоит в том, что в щелочной среде ионы меди образуют с белками комплексы фиолетового цвета. Для выполнения реакции разбавленный раствор белка подщелачивают, добавляют сегнетовую соль и избыток сульфата меди. Через некоторое время измеряют интенсивность окраски раствора, зависящей от содержания в нем белка. В соответствии с методом, описанным Гарнетом с соавт., содержание белка устанавливают по интенсивности светопоглощения при 540- 580 нм.

В дальнейшем последовал ряд модификаций этого метода, направленных на увеличение стабильности биуретового реактива с помощью этиленгликоля, тартрата, цитрата и других реагентов.

В 1962 г. Элмианн предложил определять содержание белка биуретовым методом по измерению поглощения ультрафиолетового света с длиной волны 263 нм. Чувствительность биуретовой реакции при этом возросла в 10-15 раз в сравнении с аналогичным показателем при модификации метода, основанного на измерении светопоглощения в видимой области спектра. Итцхэки и Гилл (1964 г.) рекомендовали замерять оптическую плотность образцов при 310 нм, поскольку, как выяснилось, в присутствии значительных количеств ДНК регистрация абсорбции при 263 нм может дать значительную ошибку. Так как на биуретовую реакцию не влияет присутствие в крови ароматических аминокислот (тирозина, триптофана), фенолов, мочевиной кислоты, указанный метод по праву считается самым специфичным, весьма точным и практически доступным.

Более чувствительный метод Лоури обладает рядом существенных недостатков, обусловленных прежде всего малой специфичностью (свободные ароматические аминокислоты и некоторые иные соединения образуют с реактивом Фолина комплексы характерной окраски) и сложностью приготовления основного реагента.

Другие колориметрические методы, а также нефелометрические, поляриметрические, спектрофотометрические пока еще не получили широкого распространения в клинической лаборатории.

Таким образом, в качестве единого для использования в клинической практике выбран колориметрический биуретовый метод определения общего белка в сыворотке (плазме) крови. Отечественной промышленностью налажен выпуск наборов для исследования концентрации общего белка в сыворотке крови по биуретовой реакции. На этом же принципе основано измерение уровня общего белка в биологических жидкостях с помощью наборов реактивов, поставляемых в нашу страну фирмой «Лахема» (Чехия).

Литература:

Колб В.Г., Камышников В.С. Справочник по клинической химии// Мн.: Беларусь, 1982. 367 с.

3.1.1 Унифицированный способ определения общего белка в сыворотке (плазме) крови

Принцип. Белки сыворотки (плазмы) крови, реагируя в щелочной среде с серноокислой медью, образуют соединения, окрашенные в фиолетовый цвет.

Реактивы:

1. Раствор хлористого натрия. 0,9 г NaCl растворяют в 100 мл дистиллированной воды.

2. 0,2 н раствор едкого натра, освобожденный от углекислого газа. 20 мл 1 н раствора NaOH доводят до объема 100 мл прокипяченной дистиллированной водой.

3. Биуретовый реактив. 4,5 г сегнетовой соли ($\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6$) растворяют в 40 мл 0,2 н NaOH. После растворения прибавляют 1,5 г $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ и 0,5 г KJ. Раствор доводят до 100 мл 0,2 н NaOH. Его следует хранить в темном месте (или в посуде из темного стекла). Реактив пригоден около месяца.

4. 0,5 % раствор йодистого калия в 0,2 н растворе едкого натра. 0,5 г KJ растворяют в 100 мл 0,2 н NaOH. Хранить в посуде из темного стекла не более двух недель.

5. Рабочий раствор биуретового реактива. 20 мл биуретового реактива (3) смешивают с 80 мл раствора KJ (4). Хранить в темном месте не более двух недель.

6. Стандартный раствор альбумина (из человеческой или бычьей сыворотки). 1,0 г альбумина растворяют (в небольшом цилиндре или точной мерной пробирке) в 6-7 мл физиологического раствора NaCl (1) с последующим доведением нм до конечного объема 10 мл. 1 мл стандартного раствора содержит 0,1 г белка (100 г/л).

К 5 мл рабочего раствора биуретового реактива добавляют, избегая образования пены, 0,1 мл сыворотки крови. Через 30 мин, самое позднее через 1 ч, пробу колориметрируют на ФЭКе в кювете с шириной слоя 10 мм при зеленом светофильтре (с максимумом пропускания 540-560 нм, лучше 546 нм). Показатели экстинкции учитывают в сравнении с таковыми контрольной пробы, которую готовят путем доливания к 5 мл рабочего раствора биуретового реактива 0,1 мл реактива 1 (практически раствор NaCl можно и не добавлять). Расчет ведут по калибровочной кривой.

Для построения калибровочного графика из основного стандартного раствора белка (реактив 6) готовят рабочие стандартные растворы, как указано в табл. 1 (0,1 мл основного стандартного раствора содержит 0,01 г белка). Из каждого разведения берут по 0,1 мл рабочего раствора и вносят в пробирки, содержащие по 5,0 мл рабочего биуретового реактива. Через 30-60 мин измеряют на ФЭКе оптическую плотность стандартных проб, учитывая экстинкцию контрольной пробы.

Калибровочную кривую можно строить лишь тогда, когда будет уверенность в том, что метод достаточно налажен. При этом для каждой concentra-

ции стандартного раствора нужно сделать не менее 3-5 (обычно 5-10) определений. Всего этим методом исследуют 2-3 серии стандартных окрашенных растворов.

Табл. 1 Данные к построению калибровочного графика для определения общего белка сыворотки крови

| № пробирок | Стандартный раствор белка (мл) | Физиологический раствор NaCl (мл) | Содержание белка в пробе (г) | Концентрация белка (г/л) |
|------------|--------------------------------|-----------------------------------|------------------------------|--------------------------|
| 1 | 0,4 | 0,6 | 0,04 | 40,0 |
| 2 | 0,6 | 0,4 | 0,06 | 60,0 |
| 3 | 0,8 | 0,2 | 0,08 | 80,0 |
| 4 | 1,0 | — | 0,10 | 100,0 |

При построении калибровочной кривой серию стандартных растворов обрабатывают так же, как и опытные пробы. Измерения оптической плотности стандартных растворов начинают с растворов наименьшей концентрации. Средние значения оптической плотности (соответствующие различным концентрациям) наносят на миллиметровую бумагу. На оси абсцисс (горизонтальной) с соблюдением одинаковых интервалов равномерно откладывают значения концентрации стандартных растворов белка; на оси ординат (вертикальной) - соответствующие им величины оптической плотности. Масштаб выбирают так, чтобы кривая располагалась под углом 45° . Затем хорошо отточенным карандашом наносят среднее значение экстинкции из нескольких определений и через полученные точки (а кое-где и между ними) проводят прямую линию. При этом удобно пользоваться прозрачной линейкой. Если точка значительно выхолит за пределы линии, то пробы переделывают.

При оценке результатов, чтобы каждый раз не восстанавливать и не опускать перпендикуляры к оси ординат (оптической плотности) и к оси абсцисс (концентраций), составляют таблицу пересчета (градуировочную таблицу или калибровочный график), в которой напротив наиболее часто встречающихся значений экстинкций приводят соответствующие величины концентрации.

Калибровочную кривую нужно время от времени проверять. При этом не имеет смысла все точки строить заново. Достаточно взять несколько растворов известной концентрации белка и посмотреть, укладываются ли соответствующие им точки на прежней калибровочной кривой. Если это так, то кривую не переделывают.

Примечания: 1. Описанным способом (без предварительной концентрации) белок в моче и ликворе не определяется.

2. По данным Каракашова (1968), калибровочная кривая для рассматриваемого метода показывает линейную зависимость до $E=0,5$ (это значение экстинкции соответствует концентрации белка около 100 г/л), что совпадает с результатами других авторов. Поэтому при более высоком содержании белка сыворотку разводят пополам физиологическим раствором, берут 0,1 мл смеси и полученный результат умножают на коэффициент разведения (2).

3. Все реактивы, используемые в методике, готовят на прокипяченной дистиллированной воде.

4. Ряд соединений, сопутствующих белку, мешает его точному определению. Известно, что декстраны, находящиеся в сыворотке крови, дают сильное помутнение с биуретовым

реактивом из-за образования комплексного соединения, содержащего медь. Чтобы предотвратить развитие помутнения, используются различные приемы, в том числе добавление к биуретовому реактиву мочевины (до конечной концентрации 6 моль/л), внесение в пробу пропандиола, растворяющего медно-белковый комплекс.

В 1976 г. был предложен модифицированный биуретовый реактив, содержащий маннит. Последний, как и другие полигидроксисоединения (глицерин, сорбит и др.) может растворять декстран и образовывать комплексные соединения с медью. Некоторые другие соединения также способны исказить результаты исследования (трис-буфер, глицерин, сульфат аммония и др). Присутствие в образцах большого количества липидного материала может вызывать выраженное помутнение раствора, которое устраняется встряхиванием проб с диэтиловым или петролейным эфиром и последующим центрифугированием.

Литература:

Колб В.Г., Камышников В.С. Справочник по клинической химии// Мн.: Беларусь, 1982. 367 с.

3.1.2 Определение содержания общего белка в сыворотке крови рефрактометрическим методом

На рабочую призму рефрактометра РДУ пипеткой или стеклянной палочкой наносится 1 капля дистиллированной воды и освещение устанавливается так, чтобы резко была разграничена линия освещенной и затемненной частей видимого поля. Регулирующим рычагом штриховая линия устанавливается на отметку 1,3330 шкалы рефрактометра. Воду удаляют марлевой салфеткой, смоченной смесью из разных частей 96⁰ этилового спирта этилового эфира. На сухую призму наносят 1 каплю исследуемой сыворотки и дважды производят снятие показаний. Выводят среднее из двух. Салфеткой удаляют с призмы сыворотку, протирают ватой, смоченной спирт-эфиром и приступают к исследованию следующей пробы. Содержание белка в % находят по прилагаемой таблице. Расчетные таблицы составлены на снятие показаний полученных при температуре 20⁰ С, например, если показатель преломления равен 1,3420 то содержание белка 3,50 %. Если рефрактометр не укомплектован ультратермостатом, то вводятся температурные поправки, на каждый градус сверх 20⁰ С к показателю прибавляется 0,0001 единицы, а при снижении производится вычитание. Полученные данные переводят в единицы СИ путем умножения на коэффициент пересчета равный 10, получая конечные результаты в г/л.

Литература:

Методические указания по применению унифицированных клинических лабораторных методов исследования//Под ред. Меньшикова В.В., М.,1973,174с.

Для оценки содержания общего белка в сыворотке (плазме) крови используют понятия: нормопроteinемия (нормальное содержание общего белка), гипопроteinемия (пониженная концентрация общего белка) и гиперпроteinемия (его повышенное содержание).

Изменения концентрации общего белка могут иметь как абсолютный, так и относительный характер. Последний обычно наблюдается при изменении объема крови (плазмы). Так, гидремия (нагрузка водой, водное отравление) приводит к относительной гипопроteinемии, дегидратация (обезвоживание) - к относительной гиперпроteinемии. Дегидратация может скрыть абсолютную

гипопротеинемию, поскольку при данном сочетании цифры концентрации белка в плазме крови не всегда отличаются от нормы.

Для того чтобы отличить абсолютные изменения содержания белка в плазме от относительных, необходимо установить объем плазмы либо определить гематокрит. Ориентировочные данные можно получить, подсчитав количество эритроцитов и измерив уровень гемоглобина.

Наиболее частыми причинами развития гипопротеинемического синдрома являются следующие состояния:

1. Недостаточное поступление белка пищи, наблюдаемое при недоедании, голодании, сужении пищевода (стриктура, опухоль), нарушении функции желудочно-кишечного тракта (вследствие ухудшения переваривания и всасывания белковых компонентов пищевых продуктов), например, при продолжительных воспалительных процессах кишечника.

По мнению А.А. Покровского, даже несбалансированный аминокислотный состав пищи может иногда приводить к гипопротеинемии.

Для обеспечения нормальных процессов жизнедеятельности организм усиленно утилизирует альбуминовую фракцию белков плазмы крови. При повышенном расходе альбуминов, обуславливающих онкотическое давление крови, развиваются так называемые голодные, или кахектические, отеки.

2. Понижение процессов биосинтеза белка как следствие хронических паренхиматозных гепатитов, сопровождающихся выраженными цирротическими изменениями, а также интоксикаций от некоторых химических веществ, острых и хронических заболеваний, длительных нагноительных процессов, злокачественных новообразований, тяжелых тиреотоксикозов и т. д. Все это сказывается на подавлении протеосинтетической функции печени. Пораженные же печеночные клетки, являющиеся местом образования альбуминов, фибриногена и части глобулинов, оказываются не в состоянии синтезировать эти белки плазмы крови в достаточном количестве, в результате чего и развивается гипопротеинемия, обусловленная в основном гипоальбуминемией и гипофибриногенемией.

3. Потеря белка организмом при острых и хронических кровотечениях, резко увеличенной проницаемости капиллярных стенок (вследствие токсического их поражения, когда белки крови выходят в ткани), при кровоизлияниях, образовании обширных экссудатов, выпотов в серозные полости, отеках.

Выход белков (главным образом альбуминов) из русла крови происходит при нарушении почечного фильтра в результате органических заболеваний почек (особенно нефрозов и амилоидозов, когда белок почти всегда обнаруживается в моче), а также при ожогах.

Как уже упоминалось, альбумины и глобулины не выходят из кровяного русла равномерно - в большем количестве выделяются мелкодисперсные альбумины, поэтому уменьшение концентрации общего белка в плазме крови обуславливается главным образом гипоальбуминемией.

4. Дефектопротеинемии, то есть встречающиеся иногда нарушения в синтезе белков крови, например аальбуминемия, врожденное отсутствие или не-

достаточное содержание церулоплазмينا в плазме крови при болезни Вильсона.

5. Нередко понижение содержания белка в плазме крови отмечается в период лактации.

Гиперпротеинемия - явление сравнительно редкое. Кратковременная относительная гиперпротеинемия наблюдается вследствие сгущения крови из-за значительных потерь жидкости, что бывает при профузных поносах, усиленном потоотделении, неукротимой рвоте, несахарном диабете, холере, непроходимости кишечника, генерализованном перитоните, тяжелых ожогах, лишении воды.

Незначительная абсолютная гиперпротеинемия встречается при инфекционном или токсическом раздражении ретикулоэндотелиальной системы, в клетках которой синтезируются глобулины. Это отмечается, в частности, при хроническом полиартрите и других хронических воспалительных процессах.

Из сказанного следует, что гипопропротеинемия связана почти всегда с гипоальбуминемией, гиперпротеинемия - с гиперглобулинемией.

Важное диагностическое значение имеет выяснение количественных взаимоотношений между отдельными фракциями сыворотки крови. Их изучение позволяет дифференцировать заболевания даже тогда, когда содержание общего белка в сыворотке оказывается неизменным.

Литература:

Колб В.Г., Камышников В.С. Справочник по клинической химии// Мн.: Беларусь, 1982. 367 с.

3.2 Исследование белкового спектра крови

Для более глубокого изучения белкового спектра сыворотки (плазмы) крови предложены разнообразные способы фракционирования, а именно:

1. Осаждение нейтральными солями. В основе метода лежит способность отдельных белков плазмы выпадать в осадок при воздействии на них растворов солей различных концентраций. С этой целью широко используются сернокислый аммоний, сернокислый натрий, фосфорнокислый натрий. Так, хорошо известно, что полунасыщенный раствор сернокислого аммония или раствор сернокислого натрия (21,5 г/100 мл) осаждает глобулины. Этот метод разделения белков плазмы имеет значение главным образом для установления коэффициента отношения альбумины/глобулины, который, может значительно изменяться при ряде патологических состояний, связанных с нарушением белкового состава плазмы.

В последние годы для осаждения белковых фракций сыворотки крови применяют смесь фосфатов. Так, при воздействии на сыворотку крови раствором фосфата (состав - KH_2PO_4 / Na_2HPO_4 , соотношение 2: 1) различной концентрации (1,1; 1,6; 2,0; 2,4 и 3 моль/л) при рН 6,5 соответственно осаждаются фибриноген, γ -, β -, α -глобулины и альбумин. Белок в каждой из полученных фракций определяют нефелометрическим, биуретовым или другим методом.

2. Электрофоретическое фракционирование. Различают свободный и зональный (на поддерживающих средах-носителях) электрофорез. Свободный электрофорез, представленный классическим методом Тизелиуса и его модификациями, требует сложной и дорогостоящей аппаратуры, что весьма затруд-

няет его клиническое применение. Более широкое использование в клинической практике получил зональный электрофорез. В качестве поддерживающей среды применяют бумагу, ацетат целлюлозы, гели, а также комбинированные среды.

Электрофорез в агаровом геле, предложенный Гордоном с соавт. (1949) и во многом усовершенствованный Грабаром с сотр. (1953, 1959, 1964), позволяет получать более четкое разделение фракций, чем таковое на бумаге. Недостатками этого вида электрофореза являются сложность процедуры приготовления геля и невозможность его длительного хранения в готовом виде.

Электрофорез в крахмальном геле разработан Смитис (1959) и подробно описан в работах Тодорова (1968), Э. Г. Ларского (1971) и других исследователей. Для электрофоретического фракционирования белков обычно используют гель, приготовленный из растворимого крахмала (15 г/100 мл).

Электрофорез в полиакриламидном геле (диск-электрофорез). По сравнению с крахмальным полиакриламидный гель обладает многими преимуществами: он более прозрачен, прочен, термостабилен и т. д. С помощью электрофореза в полиакриламидном геле можно получить до 30 белковых фракций. Существенный недостаток электрофореза в полиакриламидном геле - трудность последующей точной количественной оценки полученных фракций.

Электрофорез на бумаге - исследование, проводимое в настоящее время почти во всех лабораториях нашей страны. Метод электрофореза на бумаге был введен в 50-х годах (Даррум) и с тех пор широко применяется в клинико-диагностических лабораториях.

Недостатками этого вида исследования являются не всегда четкое разделение белков из-за химической неоднородности бумаги, а также длительность процессов разделения, окрашивания, отмывания, элюции и др. Результаты фракционирования белков методом электрофореза на бумаге могут быть получены лишь на 2-3-й день.

Электрофорез на ацетате целлюлозы с каждым годом используется все более широко, вытесняя метод электрофореза на бумаге. Распространен он и за рубежом. Этот метод, предложенный Коном (1958), был модифицирован В. А. Хромовым (1976), И. А. Пушкаревым с сотр. (1977) и другими исследователями. Химическая однородность ацетата целлюлозы и одинаковый размер пор позволяют повысить четкость фракционирования образца и сократить время, необходимое для разделения белков. Для получения четкой электрофореграммы достаточно всего лишь 0,1-0,3 мкл сыворотки крови, возникающий после окрашивания фон легко смывается, абсорбция белка пленкой весьма незначительна.

3. Иммунологические методы. Они основаны на иммунных свойствах белковых фракций. Иммунизируя животных, можно получить специфические сыворотки против каждого белка. Добавление этих сывороток к исследуемой плазме вызывает специфическую преципитацию белков.

4. Иммуноэлектрофорез (иммунофорез: комбинация иммунологических методов с электрофорезом Грабара, Буртэна, 1963, и др.) для определения белков сыворотки крови применяется редко, что связано с полуколичественной

оценкой результатов в этом методе. Кроме того, преципитация белков во многом зависит от вида и качества используемых сывороток (Г. Маурер, 1971).

5. Седиментационные методы, предложенные Сведбергом, основаны на различной зависимости скорости оседания белков от массы и величины их молекул. В клинической лаборатории эти методы не получили широкого распространения из-за необходимости использования дефицитной и дорогостоящей аппаратуры.

6. Осаждение белков этиловым спиртом (по Кону). Метод базируется на способности отдельных белков осаждаться спиртом различных концентраций. Чтобы избежать денатурирующего действия спирта, фракционирование проводят при низких (отрицательных) температурах. Метод имеет большое значение для получения лечебных препаратов, несмотря на то, что отличается большой трудоемкостью.

7. Хроматография с использованием ионообменных смол.

8. Фильтрация через гель. Применяя фильтрацию через гели (главным образом декстрановые - Сефадекс G-25, G-50), можно выделять различные фракции белков.

Среди перечисленных способов разделения белков в клинко-диагностических лабораториях наиболее распространены методы электрофореза на бумаге и ацетатцеллюлозной пленке.

Литература:

Колб В.Г., Камышников В.С. Справочник по клинической химии// Мн.: Беларусь, 1982. 367 с.

3.2.1 Определение белковых фракций сыворотки крови методом электрофореза на бумаге

Принцип метода основан на том, что под влиянием постоянного электрического поля белки сыворотки, обладающие электрическим зарядом, движутся по смоченной буферным раствором бумаге со скоростью, зависящей от величины заряда и молекулярного веса частиц. Вследствие этого белки сыворотки крови разделяют обычно на 5 фракций: альбумины и α_1 -, α_2 -, β -, γ глобулины.

Существуют различные аппараты для проведения электрофореза на бумаге. Однако основные требования к приборам и процессу осуществления электрофореза общие. Наиболее важные из них следующие:

1. Источник постоянного тока должен давать постоянный ток силой 50-100 мА при напряжении 180-400 В.

2. Камера, в которой проводится электрофорез, должна отвечать нескольким условиям:

а) создавать и поддерживать определенную влажность воздуха для предохранения бумаги от высыхания;

б) камеру желательно охлаждать: нагревание бумаги приводит к усиленному испарению буферного раствора в середине полосы и с краев ленты, что обуславливает изменение формы пятен фракций белков после их электрофоретического разделения;

в) буферный раствор в разных отделах камеры должен иметь одинаковый уровень, чтобы избежать его перелива через ленту в результате сифонного действия;

г) концы бумажных полос нельзя погружать в буферный раствор, в котором находятся электроды. Электрическую связь между лентами и электродами устанавливают посредством фитильков из ваты, марли или бумажных полосок, смоченных буферным раствором: этим устраняется передача изменений рН буфера в то пространство, куда погружены ленты.

3. Полоса бумаги может быть расположена горизонтально (горизонтальный электрофорез) или под углом (вертикальный электрофорез). В первом случае получаются лучшие результаты. Важно, чтобы бумажная лента была хорошо натянута. Желательно, чтобы связывающий обе ванны мостик имел шипы для укладывания на них полосок. Это предотвращает образование тонкого капиллярного слоя буферного раствора между полоской фильтровальной (хроматографической) бумаги и пластиной; капиллярный слой буферного раствора в значительной мере ухудшает качество электрофоретического разделения.

4. Большое значение имеют также свойства фильтровальной бумаги. Она должна быть однородной и плотной (хроматографическая).

В качестве носителя чаще всего используют фильтровальную бумагу марки «хроматографическая быстрая» или «хроматографическая медленная». Избранный сорт нельзя менять, так как полученные результаты в определенной степени зависят от этого обстоятельства. Если электрофореграмму обрабатывают денситометром, то рекомендуется быстро впитывающий сорт, в остальных случаях предпочтительнее пользоваться бумагой для медленного впитывания (марки «М»). Бумага марки «М» имеет гладкую лицевую и рубчатую обратную стороны. При внимательном рассмотрении обратной стороны можно заметить грубые и крупные штрихи, идущие параллельно более длинной стороне листа. Эти штрихи отражают ход волокон целлюлозы. Бумажные полоски, применяемые для электрофореза, размером 3,5x40 см или других соотношений нарезают таким образом, чтобы волокна целлюлозы шли вдоль полосок. Благодаря этому каждая полоска бумаги представляет собой систему продольно идущих капилляров, что способствует продвижению белков (и других веществ) и препятствует их растеканию к краям полоски. Кроме того, рассматриваемая лента, в отличие от таковой с поперечным ходом волокон целлюлозы, меньше деформируется при увлажнении и высыхании. На одном из концов каждой полоски простым карандашом отмечают номер анализа и дату забора крови для исследования.

Направление хода волокон целлюлозы в бумаге можно определить и по растеканию на ней капли воды, принимающей форму эллипса, длина которого и соответствует распространению волокон целлюлозы.

5. Перед электрофорезом камеру устанавливают строго горизонтально (при помощи вмонтированных в ее дно вращающихся винтов). Пластины с электродами от камеры отсоединяют. Кюветы прибора заполняют буферным раствором таким образом, чтобы уровень жидкости в них был одинаков, и оба отделения каждой кюветы соединяют друг с другом полоской фильтровальной

бумаги. Укрепляют пластинки с электродами. На мостик, связывающий обе кюветы, помещают полоски хроматографической бумаги. Необходимо, чтобы концы бумажных полос оказались погруженными в буферный раствор, во внутренние отделения электродных кювет. Затем прибор закрывают крышкой и дают бумажным полосам пропитаться буферным раствором, после этого крышку снова снимают и на заранее отмеченные у катода участки бумаги наносят сыворотку (иногда на расстоянии 2 см от середины полоски в сторону катода). Этот метод пропитывания бумаги буферным раствором дает хорошие результаты электрофоретического разделения белков сыворотки крови. Однако на практике в целях экономии времени ленты обычно смачивают в буфере и слегка высушивают, отжимая их между листами фильтровальной бумаги.

6. На узкий край шлифовального стекла (покровного, предметного) или полоски отмытой рентгеновской пленки наносят из 0,1-миллилитровой микропипетки 0,01 мл свежеполученной (негемолизированной) сыворотки. Аппликатор приставляют нижним ребром к увлажненной бумаге и после впитывания сыворотки - отнимают. Нужно следить за тем, чтобы между боковыми гранями аппликатора и краями полос оставался промежуток шириной 5-6 мм.

Наносить сыворотку на бумагу можно и непосредственно из пипетки таким образом, чтобы след сыворотки составил поперечную (по отношению к длиннику бумаги) полоску. В том и другом случаях нужно соблюдать следующие правила: если используют микропипетку на 0,1 мл, в нее насасывают сыворотку до метки 0,085. Пипетку зажимают между пальцами в вертикальном положении, причем верхнее ее отверстие не следует закрывать пальцем. Небольшое количество сыворотки, находящееся в пипетке, не вытекает из нее, так как жидкость удерживается капиллярными силами. Слегка касаясь бумаги нижним краем пипетки, перемещают ее назад и вперед по бумажной полосе в поперечном направлении (не доводя пипетку на 2 мм до каждого края), пока мениск сыворотки не опустится до метки 0,095. Удобно пользоваться и автоматической микропипеткой.

Допустимо окрашивание сыворотки перед ее нанесением на полосу хроматографической бумаги. Для этого к 0,5 мл сыворотки добавляют несколько крупинок (проще всего на кончике стеклянной иглы) порошка бромфенолового синего. По перемещению пятна красителя, связывающегося прежде всего с альбуминами, можно визуально следить за миграцией пятен.

Затем крышку камеры плотно закрывают, включают прибор и через бумажные полоски начинают пропускать постоянный электрический ток.

7. Электрофоретическое разделение белков сыворотки крови осуществляют при комнатной температуре и градиенте потенциала от 3 до 8 В на 1 см длины бумажной полоски. Сила тока, зависящая от величины подаваемого напряжения, разновидности и рН буферного раствора, толщины бумаги и температуры, при которой происходит электрофоретическое разделение, не должна превышать 0,1 - 0,3 мА на 1 см поперечного сечения бумажной полосы (плотность тока). Оптимальное время электрофореза подбирают опытным путем. Обычно оно составляет 7-12 - 16-20 ч.

По окончании электрофореза отключают источник постоянного тока, из камеры извлекают бумажные полоски и прикрепляют их на деревянные рамки или развешивают на стеклянные палочки. Затем бумажные полоски помещают в горячий сушильный шкаф так, чтобы они не соприкасались ни между собой, ни с металлическими стенками и деталями шкафа (это предохраняет электрофореграммы от смазывания фракций).

Ленты высушивают в шкафу при t 95-105 °С в течение 10-15 мин, но не более 20—30 мин. Поскольку связывание краски белками при последующей обработке зависит от условий фиксации (температуры, времени прогревания), необходимо строго соблюдать их постоянство.

8. Для окраски электрофореграмм после фиксации сухие ленты кладут в развернутом виде на дно плоских эмалированных кювет. В процессе обработки реагентами электрофореграммы нельзя помещать друг на друга и сворачивать. Окраску белковых фракций раствором бромфенолового производят, погружая бумажные полосы на определенное время в кювету с красящим раствором.

Реактивы. I. Для достижения электрофоретического фракционирования белков при приготовлении буферных растворов большое значение имеет рН, так как от этого зависит знак и величина электрического заряда молекул белков. Существенное влияние на разделение белков оказывает также ионная сила буферной смеси.

В качестве электролита (буферного раствора) чаще всего применяют вероналовый (веронал-мединоловый), веронал-ацетатный, мединоловый буферы. Реже используют боратный, фосфатный и другие буферные смеси. В последнее время для разделения белков все большее распространение получает трис-буфер, в который для улучшения его свойств нередко вносят некоторые другие компоненты.

В основном применяют следующие буферные растворы:

а) вероналовый (веронал-мединоловый) буфер с рН 8,6. Для приготовления буфера 10,32 г мединола (натриевая соль веронала) растворяют в химическом стакане емкостью 500 мл в 300 мл дистиллированной воды. После растворения мединола сюда же добавляют 1,84 г веронала и, помешивая, нагревают смесь на водяной бане до его растворения. После охлаждения (до комнатной температуры) раствор количественно полностью переносят в мерную колбу емкостью 1000 мл. Для этого химический стакан несколько раз обмывают дистиллированной водой, сливая раствор в мерную колбу. Остывший раствор доводят до метки и определяют рН;

б) веронал-ацетатный буфер с рН 8,6. В 30 мл дистиллированной воды растворяют 8,71 г веронала, 1,89 г едкого натра и 6,48 г уксуснокислого натрия. Доливают к раствору 60 мл 0,1 моль/л раствора соляной кислоты и доводят его объем дистиллированной водой до 1 л.

А. С. Циркина, Л. И. Кальнова, Н. Г. Шевченко (1969) рекомендуют свой способ приготовления веронал-ацетатного буфера с рН 8,6 ионной силы 0.1. 120 мл 0,4 н раствора NaOH, 4,0 г веронала, 1,43 мл ледяной уксусной кислоты вносят в мерную колбу емкостью 1 л, содержащую 300 мл воды, и после растворения всех ингредиентов доводят дистиллированной водой до метки;

в) некоторые авторы добивались хороших результатов, применяя в повседневной работе медиановый буфер с рН 7,6. Для его приготовления 11,5 г медианала растворяют в 1 л воды;

г) очень хорошее разделение сыворотки (на 9 фракций) удастся получить при использовании трис-буфера с рН 8,9. В 1 л дистиллированной воды растворяют 60,5 г триоксиметиламинометана (трис), 6 г этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА) и 4,6 г борной кислоты.

II. Окрашивающие реагенты. Для выявления белков электрофореграммы обычно окрашивают растворами, содержащими бромфеноловый синий, кислотный сине-черный, амидочерный 10В и другие красители:

1. Красящий раствор с водорастворимым бромфеноловым синим и сулемой: бромфеноловый синий (индикатор)-0,5 г, сулема - 10,0 г, уксусная кислота (ледяная)-20 мл, вода дистиллированная- 980 мл. 10 г сулемы растворяют в небольшом количестве кипящей дистиллированной воды, добавляют 20 мл ледяной уксусной кислоты и 0,5 г растертого в порошок бромфенолового синего, смесь взбалтывают, охлаждают и доводят до метки в мерной колбе на 1000 мл, после чего фильтруют; светлый раствор имеет яркий, насыщенный вишнево-красный цвет.

2. Красящий раствор с бромфеноловым синим и серноокислым цинком: а) бромфеноловый синий (индикатор) -0,1 г, кристаллический серноокислый цинк - 50 г, уксусная кислота (ледяная) -50 мл, вода дистиллированная-900 мл. Способ приготовления тот же, что и для раствора 1, однако обработка электрофореграмм в нем осуществляется в течение ночи;

б) бромфеноловый синий (индикатор) - 0,5 г, кристаллический серноокислый цинк- 10 г, уксусная кислота ледяная - 20 мл, дистиллированная вода - 500 мл. Способ приготовления аналогичен описанному выше, время обработки полос - 30 мин.

3. Красящий раствор с кислотным сине-черным красителем (краска, аналогичная амидочерному 10 В): кислотный сине-черный краситель- 0,2 г, уксусная кислота (ледяная) -100 мл, метиловый спирт - 900 мл. 0,2 г кислотного сине-черного красителя растворяют в 100 мл ледяной уксусной кислоты и доводят объем до 1000 мл метиловым спиртом либо 0,2 г красителя растворяют в смеси 100 мл уксусной кислоты и 900 мл метилового спирта.

4. Если используют краситель амидочерный 10В, то 100 мг краски растворяют в 100 мл ледяной уксусной кислоты и добавляют 900 мл метилового спирта.

Сухие ленты выдерживают в этом красителе в течение 30 мин.

Примечание. Сулема, сульфат цинка и уксусная кислота необходимы в качестве фиксаторов.

Затем фореграммы обрабатывают в нескольких (обычно 3-5) сменах отмывающего раствора для удаления несвязавшейся с белком краски, пока фон лент не делается белым, а промывная жидкость не перестанет окрашиваться в желтый цвет.

III. Растворы для отмывания электрофореграмм от не связавшейся с белком краски имеют разный состав (в зависимости от применявшегося красите-

ля): а) при окраске бромфеноловым синим используют раствор уксусной кислоты, получаемый добавлением к 20 мл ледяной уксусной кислоты 980 мл дистиллированной или водопроводной воды;

б) амидочерный 10 В или сине-черный красители отмывают приготовленной смесью следующего состава: уксусной кислоты (ледяной) - 100 мл, фенола (расплавленного) -40 мл, воды водопроводной-860 мл.

Отмытые ленты высушивают на воздухе при комнатной температуре (желательно в затемненном месте, если в качестве красителя использовали бромфеноловый синий). В последнем случае для получения более интенсивной окраски фракций высушенные ленты проводят над открытой бутылкой с концентрированным раствором аммиака. Пары аммиака нейтрализуют остатки уксусной кислоты. При этом пятна белковых фракций из слабо-зеленых превращаются в ярко-синие. Сухие окрашенные электрофореграммы хранят в темноте.

Дальнейшая количественная обработка электрофореграмм состоит в извлечении краски из бумаги (элюция) с последующим измерением оптической плотности окрашенных растворов на фотоэлектроколориметре либо учете с помощью денситометра.

При денситометрии в проходящем свете ленты пропитывают просветляющей жидкостью. Смоченную ленту промокают между листами фильтровальной бумаги и вставляют в денситометр таким образом, чтобы против щели камеры находился неокрашенный участок. Записанная на денситометре кривая позволяет судить о числе фракций и о содержании в них белка. Для этого кривую делят на ряд участков, соответствующих отдельным фракциям. Величина площади каждого участка пропорциональна количеству краски, соединившейся с белком данной фракции. Соотношение между этими площадями вычисляют по весу вырезанных участков бумаги, определенному на торзионных весах. Общий вес всех участков принимают за 100 % или же за содержание общего белка в плазме в г/л и вычисляют, какой процент по отношению к нему составляет вес каждого участка (фракции).

Если денситометр снабжен планиметром, то учет результатов еще более облегчается.

Для просветления электрофореграммы перед обработкой ее на денситометре применяют следующие жидкости: а) вазелиновое масло; б) раствор α -бромнафталина в вазелиновом масле (90 мл вазелинового масла смешивают с 10 мл α -бромнафталина).

При элюировании определяют величину экстинкции каждой фракции и общую сумму экстинкции, которую принимают за 100 % (выражая результаты в относительных процентах) или же за величину содержания общего белка (если результаты содержания отдельных белковых фракций хотят выразить в абсолютных единицах).

Сухие электрофореграммы разрезают по числу фракций, ориентируясь на самый светлый участок между ними. Каждую фракцию помещают в отдельную пробирку и заливают 3 мл элюирующего раствора. К альбуминовой фракции добавляют 9 мл этого раствора, на основании чего величину оптической плот-

ности первой пробирки умножают на 3. Можно в каждую пробирку вносить и по 5 мл элюирующего раствора. Контролем служит участок фореграмм, не содержащий белка. Пробирки осторожно встряхивают и оставляют в затемненном месте на 30 мин (лучше на 40 мин- 1 ч). Определение плотности испытуемых растворов производят на фотоэлектроколориметре любого типа с зеленым светофильтром. В контрольные кюветы наливают элюирующий раствор, по которому устанавливают нулевое положение гальванометра.

Растворы для элюции краски из окрашенных электрофореграмм (экстрагирующие растворы) имеют следующий состав: а) для извлечения бром фенолового синего применяют 0,01 н раствор едкого натра (допускается его приготовление путем внесения 0,4 г NaOH в 1000 мл дистиллированной воды). Лучше использовать раствор карбоната натрия (Na_2CO_3 , 5 г/ 100 мл), так как в нем окраска более устойчива, чем в растворе едкого натра;

б) для извлечения кислотного сине-черного красителя применяют 0,1 н раствор едкого натра.

Определение процентного соотношения белковых фракций методом элюирования с последующим фотометрированием считается более точным, чем проведение его с помощью денситометра.

Расчет производят следующий образом. Сумму цифр оптических плотностей принимают за 100 %, тогда каждая фракция составит х от 100.

Нужно отметить, что можно представлять результаты не в относительных, а в абсолютных единицах. К этому можно прийти, если сумму экстинкции всех фракций отнести к концентрации общего белка сыворотки крови. Тогда, пользуясь аналогичным расчетом, легко найти действительную концентрацию альбуминов и всех подфракций глобулинов.

Литература:

Колб В.Г., Камышников В.С. Справочник по клинической химии// Мн.: Беларусь, 1982. 367 с.

4 ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОСТАТОЧНОГО АЗОТА И ЕГО КОМПОНЕНТОВ

Под остаточным азотом понимают небелковый азот, то есть тот азот, который остается в центрифугате (фильтрате) сыворотки крови (или другой биологической жидкости) после осаждения белков действием трихлоруксусной, фосфорномолибденовой или фосфорновольфрамовой (вольфрамовой) кислот.

В остаточноазотную фракцию входят азот мочевины, аминокислот, креатинина, креатина, мочевой кислоты и других продуктов белкового обмена.

Мочевина является главным компонентом остаточноазотной фракции, на ее долю приходится более 1/2 всего остаточного азота. На втором месте - аминокислоты. Разность между остаточным азотом и азотом мочевины представляет так называемый резидуальный азот. Основная фракция резидуального азота - аминокислоты.

Методы определения содержания остаточного азота в сыворотке крови делятся на две основные группы: азотометрические и гипобромитные. Для установления количественного содержания азота всех исследуемых фракций безбелковый фильтрат (центрифугат) крови подвергают минерализации при нагревании (в присутствии катализатора) с концентрированной серной кислотой, благодаря чему весь остаточный азот переходит в форму азота сернокислого аммония. После перегонки этого азота в чашках Конвея, в замкнутом пространстве которых происходит разложение аммиачных солей крепкой щелочью и связывание освобожденного аммиака титрованным раствором серной кислоты, или другим способом количество остаточного азота определяют или путем титрования (с индикатором Таширо) остатка непрореагировавшей с аммиаком серной кислоты (А. А. Покровский, 1969) либо колориметрическим методом с использованием одной из трех реакций: 1) с реактивом Несслера; 2) фенолгипохлоритом; 3) нингидрином.

При взаимодействии аммиака с реактивом Несслера образуются продукты желтого цвета. Данная реакция весьма чувствительна, однако недостатком метода являются сложность приготовления реактива, его нестойкость, влияние на ход реакции множества других факторов.

В основе фенолгипохлоритного метода лежит способность аммиака вступать в реакцию с гипохлоритом, что приводит к образованию хлорамина. При реагировании последнего с фенолом получается индофеноловое соединение синего цвета. Некоторые авторы считают, что этот способ определения аммиака не особенно точен; сложным и громоздким является приготовление самого гипохлорита.

Большой чувствительностью отличается нингидриновый метод.

В целях упрощения азотометрических методов установления содержания остаточного азота ряд авторов предлагает опустить этап диффузии аммиака и осуществить прямое колориметрическое определение остаточного азота (метод Асея). Правда, исключение процесса перегонки способствует возрастанию ошибки метода до 10 %. Несмотря на это, данное исследование концентрации остаточного азота благодаря своей простоте широко распространено в клинико-диагностических лабораториях. Метод Асея утвержден как унифицированный.

Гипобромитные методы определения остаточного азота основаны на свойстве гипобромита разрушаться при действии на азотистые соединения безбелкового фильтрата. Остаток непрореагировавшего гипобромита выявляют йодометрически: путем титрования контрольной и опытной проб тиосульфатом (гипосульфитом) (метод Раппопорта и Эйхгорна) или путем прямого колориметрического определения выделившегося в опытной и контрольной пробах йода (Нательсон, 1961; Г. Н. Сербина с соавт., 1970).

В качестве унифицированного предлагается более доступный титрометрический вариант гипобромитного метода.

Литература:

Колб В.Г., Камышников В.С. Справочник по клинической химии// Мн.: Беларусь, 1982. 367 с.

4.1 Определение остаточного азота крови гипобромитным методом (метод Раппопорта-Эйхгорна)

Принцип. Белки сыворотки крови осаждаются. На азотистые соединения центрифугата (фильтрата) воздействуют щелочным раствором гипобромита, остаток которого устанавливают йодометрически. Разность в количестве гипосульфита, пошедшего на титрование контрольной и опытной проб, выражают в мл и умножают на коэффициент пересчета, это дает концентрацию азота в г/л.

Реактивы. 1. Осаждающий раствор. В мерную колбу емкостью 1000 мл вливают 44,8 мл раствора вольфрамвокислого натрия концентрации 10 г/100 мл, добавляют 2 г лимоннокислого натрия и 6,4 г сернокислого натрия. Все ингредиенты растворяют приблизительно в 800 мл воды (при комнатной температуре или при нагревании в струе горячей воды), прибавляют 44,8 мл 1 н раствора серной кислоты и 2 г сернокислого кадмия (CdSO_4), после чего доводят объем дистиллированной водой до 1000 мл.

В осадитель можно и не включать сульфат кадмия, однако результаты при этом получают менее точные, поскольку кадмий осаждаст серные соединения крови, способные связывать часть брома.

При наличии в лаборатории фосфорновольфрамовой кислоты осадитель может быть приготовлен по следующей прописи: 2,5 г фосфорновольфрамовой кислоты и 2,5 г безводного сернокислого натрия растворяют в небольшом объеме воды, добавляют 2,5 мл концентрированной H_2SO_4 и доводят объем дистиллированной водой до 500 мл.

2. Дезаминирующий гипобромитный раствор. Он состоит из смеси реактивов А и В.

Реактив А представлен растворами (реактивами) A_1 , A_2 и A_3 .

Реактив A_1 : 42,25 г борной кислоты и 12,8 г NaOH вносят в 250 мл воды, смесь тщательно встряхивают, кипятят в течение 30 мин и после охлаждения доводят объем дистиллированной водой до 500 мл.

Реактив A_2 : насыщенный (5 г/100 мл) раствор фтористого натрия - 5 г фтористого натрия растворяют в 100 мл горячей воды и горячий раствор фильтруют через бумажный фильтр.

Реактив A_3 : раствор NaOH , 2,7 г/100 мл.

Реактив А: 250 мл раствора A_1 смешивают с 150 мл раствора A_2 и с 50 мл раствора A_3 , то есть в соотношении 5:3:1. Смесь хорошо сохраняется. Борная кислота связывает сахар в крови, редуцирующие свойства которого мешали бы опыту. В присутствии ионов борной кислоты гипобромит не влияет даже на небольшие количества глюкозы.

Реактив В: в колбе емкостью 100,0 мл, содержащей 50,0 мл воды, растворяют 2,0 г бромистого калия (КВг), прибавляют 0,8 г (0,25 мл) чистого брома (его удобно брать шприцем), смесь взбалтывают до растворения и доводят объем дистиллированной водой до 100,0 мл.

Раствор сохраняется 7, максимум 10 дней. При его приготовлении соблюдают большую осторожность, учитывая ядовитость брома. Все работы с ним следует проводить под тягой, в перчатках, фартуке, защитных очках.

При отсутствии в лаборатории чистого брома для получения реактива В может быть использована смесь бромида калия и бромита натрия, дающая в подкисленном растворе выделение чистого брома за счет происходящей реакции окисления — восстановления.

3,2 г КВг и 0,28 г NaBrO_3 растворяют в небольшом объеме воды в мерной колбе на 100 мл, затем приливают 10 мл 1 н H_2SO_4 , колбу ставят на 30 мин в темное место, после чего доливают водой до метки. Реактив стоек до 1 мес. при хранении в емкости из темного стекла с притертой пробкой, смазанной вазелином.

Дезаминирующий гипобромитный раствор 2 следует готовить непосредственно перед опытом, смешивая 9 частей реактива А и 1 часть реактива В.

3. 0,005 н раствор гипосульфита натрия ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$). 5 мл 0,1 н гипосульфита (тиосульфата) натрия доводят свежепрокипяченной и охлажденной без доступа углекислого газа воздуха дистиллированной водой до 100 мл (в мерной колбе). Исходный (0,1 н) раствор лучше всего готовить из фиксаля. При его отсутствии 2,4819 г кристаллической соли ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_8 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) растворяют в небольшом объеме дистиллированной воды, количественно полностью переносят в мерную колбу на 100 мл и доливают водой до метки.

4. Кристаллический КJ или раствор йодистого калия (10 г/100 мл). Хранят в темной посуде в холодильнике.

5. Раствор крахмала (0,25 г/100 мл), можно также пользоваться растворами концентрации 0,2 г/100 мл или 1 г/100 мл.

6. Раствор соляной кислоты (18 г/100 мл). Концентрированную HCl плотностью 1,19 кг/л разводят пополам дистиллированной водой.

Ход определения. В центрифужную пробирку вносят 1,0 мл дистиллированной воды, 0,1 мл сыворотки или крови (взятой из пальца) и 4,0 мл осадителя (реактив 1), смешивают и через 10-15 мин центрифугируют на протяжении 5-10 мин. За это время готовят рабочий раствор гипобромита.

В небольшой стаканчик или в колбочку отбирают 4,0 мл центрифугата, добавляют (лучше моровской пипеткой) 5,0 мл рабочего раствора гипобромита, содержимое взбалтывают и оставляют стоять на 1-2 мин. Затем вносят 0,2 мл раствора КJ или несколько кристалликов йодистого калия, 3 мл раствора HCl , смесь взбалтывают и титруют 0,005 н раствором гипосульфита натрия до слабо-

желтого цвета. Наливают 2-3 капли раствора крахмала и дотитровывают смесь до обесцвечивания.

Одновременно с опытной ставят контрольную пробу, содержащую 4,0 мл осадителя, 5,0 мл гипобромита, 0,2 мл раствора КJ, 3 мл раствора HCl. Контрольную пробу титруют также до обесцвечивания. Лучше проводить две контрольные пробы: при этом одну из них титруют в начале, другую - в конце исследования, а пользуются средним значением результатов. Для получения более точных данных рекомендуется ставить параллельные пробы.

Разность в количестве мл гипосульфита, пошедшего на титрование контрольных (К) и опытных (О) проб, умножают на коэффициент (0,3) и выражают ответ в г/л:

$$(K-O) * 0,3 = \text{остаточный азот (г/л)}.$$

В случае применения для титрования 0,005 н раствора гипосульфита коэффициент пересчета равен 0,3, а на титрование контрольной пробы должно идти от 8,5 до 10,0 мл гипосульфита. Если на титрование контрольной пробы затрачивается меньшее количество гипосульфита, то либо он более крепок, либо в раствор 2 следует добавить несколько капель чистого брома.

Примечания: 1. Начиная с этапа отбора центрифугата можно использовать половинные объемы растворов, умножая полученный результат на коэффициент 0,6.

2. Допускается производить титрование 0,01 н раствором гипосульфита. При этом полученные значения нужно умножать на коэффициент 0,6.

Литература:

Колб В.Г., Камышников В.С. Справочник по клинической химии// Мн.: Беларусь, 1982. 367 с.

4.2 Методы определения мочевины

Мочевина представляет собой диамид угольной кислоты, образующийся в печени при обезвреживании аммиака. Молекулярная масса ее 60 дальтон. Из них 28 дальтон приходится на долю двух атомов азота, входящих в состав молекулы мочевины. Следовательно, при необходимости сопоставления концентрации остаточного азота с содержанием азота мочевины концентрацию последней следует разделить на 2,14 (60:28). Только при получении таких соизмеримых величин возможно нахождение процента содержания азота мочевины от всего остаточного азота, что имеет очень большое значение для дифференциации поражений печени и почек.

Основные группы методов определения содержания мочевины подразделяют на: 1) газометрические или гипобромитные; 2) ксантгидроловые; 3) ди-ацетилмонооксимные; 4) гипохлоритные; 5) уреазные; 6) прочие - с р-диметиламинобензальдегидом (реактив Эрлиха), изонитропропиофеноном, диметилгликоксимом. Известны также полуколичественные, ориентировочные методы установления концентрации мочевины с помощью реактивной бумаги. Объемно-гипобромитный метод А. П. Бородина и его модификации основаны на разложении мочевины гипобромитом натрия в щелочной среде - $\text{CO}(\text{NH}_2)_2 + 3\text{NaBrO} = \text{N}_2 + \text{CO}_2 + 3\text{NaBr} + 2\text{H}_2\text{O}$. Выделяющуюся углекислоту поглощает раствор, свободным остается только азот, объем которого измеряют. Метод неспецифичен, так как гипобромит реагирует не только с мочевиной, но и с дру-

гими компонентами остаточного азота, содержащими аминокруппы. На определение требуется большое количество крови и брома (весьма токсичного реактива), иногда не удается точно замерить объем выделившегося газа из-за прилипания пузырьков к стенкам аппарата. Сам же стеклянный прибор, в котором производят определение, часто выходит из строя вследствие хрупкости.

Известно много веществ, дающих с мочевиной окрашенные соединения. На этом принципе основан ряд колориметрических методов. Так, гетероциклический спирт ксантгидрол вступает в соединение с мочевиной, образуя осадок - диксантилмочевину. В дальнейшем мочевины можно определять различными способами: гравиметрическим (высушиванием и взвешиванием), нефелометрическим, колориметрическим (осадок растворяют в серной кислоте, в результате чего возникает цветная реакция), титрометрическим.

Ксантгидроловые методы более точны, чем гипобромитные, однако в клинико-диагностических лабораториях их применяют редко из-за большой трудоемкости выполнения и дефицитности реактивов.

Наиболее распространены колориметрические методы, основанные на реакции Фирона - взаимодействии мочевины и диацетилмонооксида с образованием окрашенных продуктов. Для повышения чувствительности и стабилизации цвета реактива предложен ряд модификаций метода с использованием разных веществ: триптофана и нитритов, фенилантраниловой кислоты, антипирина, персульфата калия, тиосемикарбазида и солей железа. Последняя модификация положена в основу определения мочевины при помощи диагностических наборов реактивов, выпускаемых фирмой «Лаксема» (Чехия).

Преимуществом метода с использованием реакции Фирона является его простота: на проведение анализа требуется 15-20 мин. Причем исследование можно проводить и в капиллярной крови.

Фенолгипохлоритный метод Б. А. Рашкована, состоящий в появлении характерной окраски при взаимодействии мочевины с гипохлоритом натрия и фенолом, не нашел широкого распространения в клинико-диагностических лабораториях из-за трудности приготовления фенолгипохлоритного реактива и ряда других причин (различного оттенка окраски опытных и контрольных проб, частого появления мути при добавлении HCl).

Наиболее точными и специфичными способами определения концентрации мочевины являются ферментативные уреазные методы.

В качестве препарата уреазы можно использовать тыквенные или арбузные семечки, соевую муку, однако лучше всего применять для этой цели кристаллический фермент, выпускаемый отечественной промышленностью. Этот реактив отличается сравнительно большой стойкостью.

Заслуживает внимания быстрое ориентировочное (полуколичественное) определение концентрации мочевины с помощью реактивной бумаги. В основу его положено действие уреазы на мочевины. Еще в период существования Советского Союза завод «Реагент» освоил выпуск специальной индикаторной (реактивной) бумаги под названием «Уреатест». Аналогичные диагностические тесты производят и за рубежом.

Кондуктометрические методы и способы, состоящие в применении ион-селективных электродов, быстры, но требуют специального оборудования.

Из всего многообразия методов изучения уровня мочевины в биологических жидкостях в качестве унифицированных утверждены: 1) экспресс-метод - определение содержания мочевины с использованием реактивной бумаги «Уреатест»; 2) диацетилмонооксимный - простой, чувствительный, достаточно специфичный способ (им также определяют мочевины с помощью набора реактивов чешской фирмы «Лахема»), позволяет в течение короткого периода времени проводить исследование в капиллярной крови и других биологических жидкостях; 3) ферментативный (как наиболее специфичный)-с применением кристаллического препарата уреазы.

При невозможности по какой-либо причине наладить в лаборатории один из перечисленных унифицированных методов предлагается освоить простой уреазный способ установления концентрации мочевины с использованием фермента, содержащегося в семечках арбуза или тыквы. Будучи весьма специфичным и простым, он может быть поставлен в любой клинико-диагностической лаборатории. Определение основано на способности уреазы гидролизовать мочевины с образованием аммиака, по количеству которого и судят о концентрации исследуемого продукта в биологической жидкости. Для установления содержания аммиака чаще всего применяют реактивы Несслера и Бертлота.

Литература:

Колб В.Г., Камышников В.С. Справочник по клинической химии// Мн.: Беларусь, 1982. 367 с.

4.2.1 Определение мочевины сыворотке крови экспресс-методом с применением реактивной бумаги «Уреатест»

Исследование проводят согласно прилагаемой к наборам индикаторной бумаги инструкции, из которой следует, что «Уреатест» предназначен для быстрого полуколичественного определения мочевины в сыворотке крови.

Содержащиеся в упаковке полоски хроматографической бумаги размером 120x10 мм пропитаны растворами фермента и индикатора. Зоны их нанесения разделены красной парафиновой полоской. При проведении анализа бумажку следует держать за свободный конец. В комплекте находится 20 штук реактивных бумажек, калибровочный график и инструкция.

Принцип. Метод основан на способности уреазы расщеплять мочевины, приводящую к выделению аммиака, который окрашивает индикатор в голубой цвет. Высота в мм окрашенной зоны пропорциональна концентрации мочевины. Последнюю рассчитывают по калибровочному графику.

С помощью реактивной бумаги можно установить уровень мочевины в сыворотке крови в пределах от 20 до 250 мг/100 мл или соответственно от 3,33 до 41,62 ммоль/л.

Ход определения. Сыворотку крови разводят дистиллированной водой в отношении 1:1. На пропитанный ферментом конец бумажки в 3 мм от красной парафиновой полосы наносят специальной мерной пипеткой 0,03 мл приготовленной сыворотки крови. Бумажку быстро помещают в чистую сухую пробир-

ку, герметически закрывают ее пробкой и оставляют на 20 мин при +37 °С или на 30 мин при +20°С в термостате.

Затем измеряют высоту индикаторной зоны, окрашенной в голубой цвет. По приложенному графику находят концентрацию мочевины.

В случае использования неразбавленной сыворотки или цельной крови результат делят на 2.

Примечание. Комплект «Уреатест» следует хранить в сухом, темном, прохладном месте. Срок годности - 8 мес. со дня выпуска.

Литература:

Колб В.Г., Камышников В.С. Справочник по клинической химии// Мн.: Беларусь, 1982. 367 с.

4.2.2 Определение мочевины в сыворотке крови и в моче по цветной реакции с диацетилмонооксимом

Принцип. Мочевина образует с диацетилмонооксимом в присутствии тиосемикарбазида и солей железа в кислой среде окрашенные вещества, интенсивность окраски которых пропорциональна содержанию мочевины в сыворотке крови и в моче.

Реактивы. 1. Раствор трихлоруксусной кислоты -10 г/100 мл.

2. Водный раствор диацетилмонооксима - 2,5 г/100 мл. Реактив стоек.

3. Водный раствор (0,25 г/100 мл) тиосемикарбазида или солянокислого тиосемикарбазида (0,32 г/100 мл). Оба реактива стабильны неограниченно долгое время, если хранить их в темной посуде при комнатной температуре.

4. Раствор хлорного железа. 5 г хлорного железа растворяют в 100 мл дистиллированной воды и подкисляют 1 мл концентрированной серной кислоты. Приготовленный таким образом основной раствор используют для получения рабочего раствора хлорного железа путем добавления к 1 мл первого дистиллированной воды до объема 100 мл и последующего приливания 8 мл концентрированной серной кислоты и 1 мл раствора ортофосфорной кислоты (85 г/100 мл). Раствор хранят в темной посуде и используют в течение 2 недель.

5. Цветной реактив. К 30 мл рабочего раствора хлорного железа добавляют 20 мл дистиллированной воды, 1 мл раствора диацетилмонооксима (реактив 2) и 0,25 мл раствора тиосемикарбазида (реактив 3). Цветной реагент готовят каждый раз непосредственно перед употреблением.

6. Стандартный раствор мочевины. 1,0 г мочевины растворяют в 100 мл дистиллированной воды. Из этого основного раствора готовят рабочий разведением основного в 10 раз.

Согласно приказу МЗ СССР об унификации лабораторных методов исследования (1972, №290, с. 69-70), рекомендуется сразу готовить рабочий раствор мочевины, используя вместо воды раствор бензойной кислоты концентрации 0,2 г/100 мл (0,2 г кристаллической бензойной кислоты растворяют в 100 мл дистиллированной воды при интенсивном перемешивании и нагревании содержимого склянки на водяной бане). Стандарт на растворе бензойной кислоты более стабилен, чем водный.

При работе оба раствора должны давать небольшие колебания экстинкции. В противном случае их необходимо заменить. 1 мл стандартного раствора содержит 1 мг мочевины (1 г/л, или 16,65 ммоль/л).

Ход определения концентрации мочевины в сыворотке крови. В центрифужную пробирку вносят 0,8 мл дистиллированной воды, 0,2 мл сыворотки и 1,0 мл раствора трихлоруксусной кислоты, содержимое ее смешивают. Через 15-20 мин смесь центрифугируют.

В чистую пробирку вносят 0,5 мл надосадочной жидкости и 5 мл цветного реактива (5). Пробирку выдерживают в кипящей водяной бане 20 мин, затем охлаждают в течение 2-3 мин под водопроводной водой. Измерение экстинкции пробы проводят на фотоэлектроколориметре при длине волны 500-560 нм (зеленый светофильтр) в кювете с шириной слоя 10 мм.

Учитывают оптическую плотность контрольной пробы, которую ставят так же, как опытную, но вместо надосадочной жидкости берут 0,5 мл дистиллированной воды. Стандартную пробу проводят, как опытную, с той лишь разницей, что вместо сыворотки в ней используют 0,2 мл стандартного раствора мочевины.

Допустим и второй вариант постановки стандартной пробы, при котором в пробирку вносят 0,05 мл рабочего стандартного раствора, 0,25 мл раствора трихлоруксусной кислоты, 0,2 мл дистиллированной воды и сразу 5,0 мл цветного реактива. Этот способ, несмотря на большую простоту, отличается несколько меньшей точностью из-за трудности взятия пипеткой ровно 0,05 мл жидкости.

В обоих случаях расчет производят по формуле:

$$x = \frac{E_{оп.}}{E_{ст.}} \cdot 16,65,$$

где x - концентрация мочевины (ммоль/л); $E_{оп.}$ - экстинкция опытной пробы; $E_{ст.}$ - экстинкция стандартной пробы; 16,65 - концентрация мочевины (ммоль/л) в стандартном растворе.

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

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

3. При содержании мочевины в сыворотке крови выше 16,65 ммоль/л сыворотку разводят физиологическим раствором, а результат умножают на коэффициент разведения.

4. При определении содержания мочевины в моче, начиная с величины экстинкции 0,13-0,15, следует увеличивать разведение мочи.

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

Литература:

Колб В.Г., Камышников В.С. Справочник по клинической химии// Мн.: Беларусь, 1982. 367 с.

4.2.3 Определение мочевины в сыворотке крови уреазным методом по реакции с фенолгипохлоритом

Принцип. Мочевина под действием уреазы разлагается на углекислый газ и аммиак, содержание которого устанавливают колориметрически по образованию окрашенных продуктов с гипохлоритом и фенолом.

Реактивы. 1. Раствор ЭДТА - динатриевой соли этилендиаминтетрауксусной кислоты (трилон Б, селектон, хелатон, комплексон III, версен). 1 г ЭДТА растворяют в 90 мл дистиллированной воды, доводят рН до 6,0, корректируя кислую реакцию среды 5 н раствором едкого натра, и приливают воду до объема 100 мл. Этот реактив используют для приготовления раствора уреазы.

2. Раствор уреазы с рН 6,0. 0,02 г ферментативного препарата уреазы вносят в 50 мл раствора ЭДТА, проверяют и в случае необходимости устанавливают нужное значение рН.

Отечественная уреазы имеет активность около 870 ед. Sumner на 1 г белка. Для реакции пригодна уреазы с активностью 800- 1000 ед. Sumner на 1 г белка. Препарат уреазы хранят в холодильнике в плотно закрытой упаковке. При соблюдении этих условий фермент стабилен в течение месяца.

3. Раствор фенола и нитропруссиды натрия (цветной реактив). 0,25 г нитропруссиды натрия (ч.д.а) растворяют в 500 мл дистиллированной воды, добавляют 50 мл или 54 г фенола (ч.д.а) и доливают дистиллированной водой до 2 л. Раствор стабилен в течение месяца при хранении его в холодильнике в посуде из темного стекла.

4. Основной раствор гипохлорита натрия (NaOCl). 100 г хлорной извести (CaOCl₂) размешивают в течение 15 мин со 170 мл дистиллированной воды, после чего прибавляют, непрерывно помешивая, раствор, состоящий из 170 мл дистиллированной воды и 70 г углекислого натрия (Na₂CO₃). Масса сначала густеет, затем разжижается, ее оставляют стоять до следующего дня. Надосадочную жидкость (гипохлорит натрия) сливают и фильтруют через промытый дистиллированной водой фильтр. Хранят в холодильнике в посуде из темного стекла. Срок годности раствора – 1-2 мес.

Для определения активности хлора 1 мл основного раствора гипохлорита натрия смешивают с 100 мл дистиллированной воды. К 50 мл этого раствора добавляют 5,0 мл свежеприготовленного раствора йодистого калия (реактив 8) и 10 мл раствора соляной кислоты (реактив 7). Титруют раствором тиосульфата натрия (реактив 5). Как только раствор приобретет слабо-желтую окраску, добавляют 10 капель 1 г/100 мл раствора крахмала и продолжают титрование до обесцвечивания.

Концентрацию активного хлора в г на 100 мл раствора гипохлорита натрия рассчитывают по формуле:

$$a * 0,709,$$

где а - количество мл тиосульфата натрия, пошедших на титрование; 0,709 - коэффициент пересчета 1,0 мл раствора тиосульфата натрия в значения концентрации (г/100 мл) хлора.

Таким образом, по содержанию хлора судят о качестве приготовленного раствора гипохлорита натрия.

После установления концентрации активного хлора основной раствор гипохлорита разводят так, чтобы концентрация хлора в нем равнялась 0,5 г/100 мл. Этот раствор смешивают с равным объемом 5 и раствора едкого натра и используют для реакции. Активность хлора проверяют не реже 1 раза в две недели.

5. 0,1 и раствор тиосульфата натрия. 25 г кристаллического тиосульфата натрия ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) растворяют в 1 л дистиллированной воды.

6. 5 н раствор едкого натра.

7. 6 н раствор соляной кислоты.

8. Раствор йодистого калия-5 г/100 мл.

9. Стандартный (калибровочный) раствор мочевины - 6,66 ммоль/л. 40 мг высушенной до постоянного веса мочевины растворяют в мерной колбе в 100 мл реактива 10. Стандартный раствор можно готовить и на дистиллированной воде, но от этого он будет менее стабилен. 1 мл его содержит 0,4 мг мочевины. Раствор хранят в холодильнике.

10. Раствор бензойной кислоты-0,2 г/100 мл. 0,2 г кристаллической бензойной кислоты вносят в 100 мл дистиллированной воды, интенсивно перемешивают и нагревают смесь до полного растворения кристаллов.

Ход определения. Для приготовления опытной пробы 0,5 мл раствора уреазы вносят в пробирку с притертой пробкой, добавляют 0,02 мл сыворотки. Пробирку закрывают пробкой и смесь инкубируют 15 мин при + 37 °С. После инкубации приливают 10 мл цветного реактива и 1 мл раствора гипохлорита натрия. Содержимое пробирки перемешивают и оставляют стоять 20 мин при +37 °С. Через 10 мин измеряют экстинкцию на ФЭЖе в кювете с шириной слоя 10 мм, используя зеленый светофильтр с максимумом пропускания 500-560 нм. При этом учитывают значение оптической плотности контрольной пробы.

Контрольную пробу ставят так же, как опытную, но вместо сыворотки берут дистиллированную воду.

Стандартную пробу обрабатывают как опытную, но вместо сыворотки используют калибровочный раствор мочевины. Измерение экстинкции осуществляют при условиях, аналогичных таковым для опытной пробы. В расчет принимают значения оптической плотности опытной и стандартной проб за вычетом экстинкции контрольной пробы.

Расчет ведут по формуле:

$$\text{Концентрация мочевины (ммоль/л)} = E_1/E_2 * 6,66,$$

где E_1 - экстинкция опытной пробы; E_2 - экстинкция стандартной пробы; 6,66 - концентрация стандартного раствора мочевины (ммоль/л).

В норме содержание мочевины в сыворотке крови составляет 2,50-8,33 ммоль/л.

Для пересчета результатов на азот мочевины показатель ее концентрации в ммоль/л делят на 2,14.

Примечания: 1. Построение калибровочного графика не рекомендуется, так как интенсивность окраски проб зависит от условий опыта. Поэтому правильнее обрабатывать стандартные пробы одновременно с опытными и вести расчет результатов по формуле.

2. Серия проб не должна превышать 10.

3. Если сыворотка мутная или окрашенная, то проводят дополнительную контрольную пробу - в смесь добавляют сыворотку и все реактивы без инкубации. Показатель экстинкции этой контрольной пробы вычитают из значения оптической плотности опытной.

4. Окраска проб стабильна в течение нескольких часов.

Литература:

Колб В.Г., Камышников В.С. Справочник по клинической химии// Мн.: Беларусь, 1982. 367 с.

4.2.4 Определение мочевины крови уреазным методом по реакции с реактивом Несслера

Принцип метода основан на разложении мочевины крови или сыворотки ферментом уреазой с последующим измерением количества образующегося аммиака колориметрическим способом (с использованием реактива Несслера).

Реактивы. 1. Препарат уреазы: а) очищают 3-4 семечка арбуза, извлеченные зерна растирают в ступке, сначала в 1,0 мл, затем в 10,0 мл воды. Полученную эмульсию фильтруют. В семечках ферментативная активность сохраняется более 2 лет. Вместо арбузных семечек можно брать и тыквенные; б) сухая соевая мука – 10-12 мг на пробу.

2. Раствор кристаллического сульфата цинка - 7,5 г/100 мл.

3. Раствор едкого натра - 1,5 г/100 мл.

Проверка титров растворов 2 и 3: на титрование 10 мл раствора сульфата цинка в присутствии фенолфталеина (в качестве индикатора) должно пойти 10,8-11,2 мл раствора NaOH.

4. Раствор сегнетовой соли ($KNaC_4H_4O_6$ - виннокислый K, Na) - 0,2 г/100 мл.

5. Реактив Несслера.

6. Стандартный раствор мочевины с содержанием 30 мг мочевины в 100 мл воды - 5 ммоль/л.

Ход определения. В две пробирки - опытную и стандартную - вносят по 1,5 мл дистиллированной воды. Затем в опытную добавляют 0,1 мл крови или сыворотки, а в стандартную - 0,1 мл стандартного раствора мочевины, после чего в каждую из пробирок приливают по 0,5 мл препарата уреазы или всыпают по 10-12 мг сухой соевой муки. Содержимое пробирок перемешивают, плотно закрывают корковыми пробками, выдерживают 20 мин в водяной бане (или в термостате) при $+37^{\circ}C$, охлаждают водой и добавляют в каждую пробирку по 0,2 мл раствора сульфата цинка ($ZnSO_4$) и по 0,2 мл раствора едкого натра (NaOH). После тщательного перемешивания производят центрифугирование (до получения прозрачной надосадочной жидкости), из каждой пробы отбирают по 1,25 мл центрифугата, который переносят в две другие чистые пробирки. В них приливают по 2,25 мл раствора сегнетовой соли и по 0,5 мл реактива Несслера. Содержимое пробирок перемешивают и колориметрируют на ФЭКе с синим светофильтром в кювете с шириной слоя 5 мм, используя в качестве контрольного раствора воду (1) или специально подготовленную контрольную пробу (2).

Последнюю готовят путем добавления к 1,25 мл дистиллированной воды 2,25 мл раствора сегнетовой соли и 0,5 мл реактива Несслера.

Расчет ведут решением пропорций 1 и 2:

$(E_{оп.} - E_{к.}) - x \text{ ммоль/л}, (E_{с.} - E_{к.}) — 5 \text{ ммоль/л}, \text{ тогда } x = (E_{оп.} - E_{к.}) / (E_{с.} - E_{к.}) * 5 \text{ ммоль/л} = a \text{ ммоль/л} (1).$

$E_{оп.} - x \text{ ммоль/л}, E_{с.} - 5 \text{ ммоль/л}, \text{ тогда } x - E_{оп.} / E_{с.} * 5 \text{ ммоль/л} = a \text{ ммоль/л} (2),$

где $E_{оп.}$, $E_{к.}$ и $E_{с.}$ — экстинкция опытной, контрольной и стандартной проб соответственно.

В случае расчета по формуле 2 используют значение оптической плотности опытной и стандартных проб за вычетом экстинкции контрольной пробы.

При трактовке результатов анализа следует исходить из того, что диета с низким содержанием белка может уменьшить концентрацию мочевины в крови, и наоборот, при избыточном питании азотистыми продуктами уровень мочевины обычно колеблется около верхней границы нормы. Диета, бедная ионами хлора, также нередко приводит к повышению концентрации мочевины. Физиологическое состояние организма, связанное с беременностью, часто сопровождается уменьшением концентрации мочевины в крови.

Литература:

Колб В.Г., Камышников В.С. Справочник по клинической химии// Мн.: Беларусь, 1982. 367 с.

4.3 Аминный азот

Свободный аминный азот (аминоазот) представляет собой азот свободных аминокислот, содержащихся в сыворотке (плазме) крови (в отличие от общего аминного азота, включающего также азот сложных полипептидов и белков).

Для определения концентрации аминокислот применяют ряд методов: а) формоловое титрование по Сёрсену, основанное на титровании карбоксильных групп аминокислот щелочью после предварительного блокирования аминогрупп формальдегидом; б) газометрическое определение - по выделению свободного азота при действии азотистой кислотой на первичные группы аминокислот. Исследование проводится обычно в аппарате Цуверкалова, имеет ряд преимуществ перед методом формолового титрования; в) метод, основанный на способности аминокислот реагировать со взвесью фосфата меди с образованием медных комплексов, количественно разлагающихся диэтилдитиокарбаматом натрия, в результате реакции раствор приобретает желтую окраску; г) установление содержания аминокислот по реакции аминокислот с нингидрином (самый распространенный метод); д) определение концентрации аминокислот по количеству образующегося при дезаминировании свободных аминокислот аммиака.

О повышенном содержании аминокислот в крови можно судить и по уровню резидуального азота (фракции остаточного азота без азота мочевины). Как известно, возрастание уровня резидуального азота связано главным образом с увеличением содержания аминокислот в крови.

Литература:

Колб В.Г., Камышников В.С. Справочник по клинической химии// Мн.: Беларусь, 1982. 367 с.

4.3.1 Определение свободного аминного азота в сыворотке крови (по методу Г.А. Узбекова в модификации З.С. Чулковой)

Принцип. Содержание аминокислот определяют колориметрически по интенсивности окрашивания комплекса, образующегося за счет взаимодействия аминокислот с нингидриновым реактивом.

Реактивы. 1. 0,04 н раствор уксусной кислоты - 0,23 мл ледяной CH_3COOH на 100 мл воды.

2. Водный раствор нингидрина - 1 г/100 мл.

Ход определения складывается из нескольких этапов: 1. Осаждение белков. Центрифужную пробирку с внесенными в нее 0,5 мл сыворотки и 0,5 мл раствора CH_3COOH прикрывают пробкой и помещают в холодную водяную баню, воду в которой доводят до кипения. Пробирку прогревают в течение 5 мин (время отмечают с момента закипания воды). Затем пробирку охлаждают и приступают к фильтрованию смеси.

2. Фильтрование. К содержимому пробирок добавляют по 1 мл дистиллированной воды и после перемешивания растворов тонкой стеклянной палочкой производят их фильтрование через гладкий бумажный фильтр. Пробирку и осадок на фильтре промывают еще 2 раза, каждый раз используя для этого по 1 мл воды, после чего основной фильтрат и обе порции промывных вод объединяют в одну пробирку с меткой, соответствующей 10 мл.

3. Цветная реакция с нингидрином. К полученному фильтрату добавляют 0,5 мл раствора нингидрина, содержимое пробирки перемешивают и на 20 мин помещают пробирку в кипящую водяную баню. По истечении срока прогрева пробирку охлаждают в токе водопроводной воды, оставляют стоять 5 мин при комнатной температуре и доводят дистиллированной водой до 10 мл (по метке на пробирке).

Параллельно ставят контрольную пробу на реактивы. Для этого к 3 мл дистиллированной воды добавляют 0,5 мл раствора CH_3COOH , 0,5 мл раствора нингидрина и после перемешивания раствор 20 мин прогревают на кипящей водяной бане, затем охлаждают и доводят водой до 10 мл.

Примечание. Установлено, что в качестве контрольной пробы можно использовать одну дистиллированную воду.

4. Колориметрия. Оптическую плотность измеряют на ФЭКе при зеленом светофильтре (длина волны - 536 нм) в кювете с толщиной слоя 5 мм, результаты сравнивают с аналогичными данными контрольной пробы или воды.

5. Расчет производят по формуле путем сравнения показаний экстинкций опытной и стандартной проб.

$E_{оп.} — C_{оп.}$

$E_{ст.} — C_{ст.}$

$C_{оп.} = (E_{оп.} \cdot C_{ст.}) / E_{ст.}$,

где $E_{оп.}$ и $E_{ст.}$ — значение концентрации опытной и стандартной проб; $C_{ст.}$ — содержание мкг N в 0,5 мл стандартного раствора аланина, получаемого внесением 12,86 мг аланина в 100 мл воды (готовят перед применением). Стандартный раствор в концентрации 12,86 мг/100 мл содержит 0,128 мг аланина в 1 мл, или 0,064 мг (64 мкг) в 0,5 мл. Если исходить из того, что молекулярная масса

аланина составляет 90 дальтон, а в 1 молекуле аминокислоты находится 1 атом N (14 дальтон), то исходя из отношения молекулярной и атомной масс $90/14 = 6,4$ можно определить, что 64 мкг аланина будут содержать 10 мкг N.

0,5 мл приготовленного стандартного раствора аланина обрабатывают точно так же, как 0,5 мл сыворотки крови (см. ход определения).

Для перевода результатов в г/л найденное количество мкг азота умножают на 2000 (для пересчета мкг азота на 1 л биологической жидкости) и делят на 10^6 (для перевода мкг в г), то есть умножают на 0,002 или делят на 500 (в случае, если для опыта берут 0,5 мл исследуемой сыворотки). Конечная формула, используемая для расчета, приобретает следующий вид:

$$x \text{ г/л} = \text{Соп.} \cdot 0,002, \text{ или } x \text{ г/л} = \text{Соп.}/500,$$

где x - содержание аминокислоты в сыворотке крови (г/л); Соп.- содержание аминокислоты (мкг) в стандартной пробе.

Литература:

Колб В.Г., Камышников В.С. Справочник по клинической химии// Мн.: Беларусь, 1982. 367 с.

4.3.2 Определение азота свободных аминокислот сыворотки крови по содержанию перегнанного аммиака

Ход определения. Дезаминирование осуществляют во флаконах объемом 20 мл. К пробе добавляют 0,4 мл 2 н раствора уксуснокислого натрия, 0,5 мл раствора нингидрина (3 г/100 мл) и 0,05 мл раствора аскорбиновой кислоты (0,5 г/100 мл). Смесь в течение 10 мин нагревают на кипящей водяной бане. Затем приливают 1 мл 2 н соляной кислоты и еще раз помещают смесь в водяную баню на 10 мин, после чего добавляют 0,1 мл раствора перекиси водорода (30 г/100 мл) и содержимое пробы вновь нагревают на водяной бане в течение 5 мин. Во флакон с пробой вносят 0,7 мл 10 н NaOH и быстро закрывают его резиновой пробкой, в которую вставлена стеклянная палочка с каплей 1 н серной кислоты на конце (акцептор аммиака). Флакон вращают на ротаторе (конструкции Бигина с соавт., 1967) на протяжении 60 мин (диаметр диска ротатора -300 мм, скорость его вращения -30 об/мин).

Далее стеклянную палочку, на конце которой собран выделившийся аммиак, помещают в раствор, состоящий из 4 мл воды и 0,5 мл реактива Несслера. Окрашенный раствор фотометрируют при 475 нм на ФЭКе в кювете с толщиной слоя 10 мм.

Калибровочные растворы аминокислот, содержащие 8, 20 и 30 мкг аминокислотного азота в 1 мл, готовят на 0,3 н хлорной кислоте.

Литература:

Колб В.Г., Камышников В.С. Справочник по клинической химии// Мн.: Беларусь, 1982. 367 с.

4.4 Мочевая кислота

Мочевая кислота - главный продукт обмена пуриновых оснований, входящих в состав сложных белков - нуклеопротеидов; она является 2,6,8-триоксипурином.

Качественной реакцией на мочевую кислоту служит мурексидная проба, основанная на образовании мурексида - аммонийной соли пурпуровой кислоты красного цвета.

Количественное определение содержания мочевой кислоты в крови и моче связано со значительными трудностями. Этим и объясняется то обстоятельство, что к настоящему времени исследованием содержания мочевой кислоты в биологических жидкостях и тканях занимаются не все клинико-диагностические лаборатории.

Существующие методы определения концентрации мочевой кислоты можно разделить на несколько групп: I. Химические (колориметрические), основанные на: 1) способности мочевой кислоты восстанавливать фосфорновольфрамную, мышьяквомолибденовую кислоты, железосинеродистый калий и некоторые другие вещества; 2) прямом фотометрическом определении концентрации мочевой кислоты по реакции с реактивом Фолина, Дениса; 3) исследовании содержания мочевой кислоты по фенолгипохлоритной реакции.

II. Энзиматические (уриказные) методы.

III. Методы, базирующиеся на абсорбции мочевой кислоты при 293 нм (прямая спектрофотометрия-Marimont, London, 1964).

Методы первой группы, предложенные в 1912 г. Folin и Denis, неспецифичны, поскольку кроме мочевой кислоты восстанавливающими свойствами обладают аскорбиновая кислота, тирозин, триптофан, цистин, цистеин. Широкое использование цианиднофосфорновольфрамового способа сдерживается токсичностью цианистого калия, который нередко вводят с целью увеличения интенсивности окраски раствора, предупреждения ее выцветания, а также предотвращения выпадения солей мочевой кислоты в осадок. Кроме того, для стабилизации образующегося при взаимодействии мочевой кислоты с железосинеродистым калием комплекса «берлинская лазурь», необходимы импортные реактивы - гуммигати, гуммиарабик.

С 1930 г. стали применяться методы определения концентрации мочевой кислоты, базирующиеся на прямой реакции между нею и реактивом Фолина. Недостатком этих методов является их низкая специфичность.

Прямое спектрофотометрическое исследование мочевой кислоты в сыворотке крови основано на поглощении мочевой кислотой ультрафиолетовых лучей в зоне 282-295 нм. Максимум поглощения зависит от pH среды.

Наиболее специфичные и точные - ферментные методы определения содержания мочевой кислоты. Мочевая кислота расщепляется уриказой до аллантаина, CO_2 и H_2O_2 . Результаты реакции можно учитывать: 1) измерением потребления кислорода, на что требуется специальная измерительная аппаратура;

2) регистрацией абсорбции мочевой кислоты при 293 нм (в этой области спектра аллантаин оптически прозрачен);

3) определением образовавшейся перекиси водорода. Перекись водорода под влиянием каталазы превращает метанол в формальдегид, который в дальнейшем обнаруживается специальной реакцией. Данный принцип положен в основу фотометрического исследования мочевой кислоты наборами реактивов фирмы «Boehringer» (Германия);

4) введением в систему еще одного фермента - альдегиддегидрогеназы, что значительно ускоряет и упрощает осуществление реакции.

Триведи с соавт. (1978) предложили для определения концентрации мочевой кислоты новый энзиматический метод. Он состоит в ферментативном превращении мочевой кислоты в аллантаин и перекись водорода, которая в присутствии каталазы вступает в реакцию с этанолом. Образующийся при этом ацетальдегид восстанавливается НАД-Н₂, что сопровождается уменьшением светопоглощения при 340 нм. Количество окисленного НАД пропорционально содержанию мочевой кислоты в анализируемой пробе. Рассматриваемый энзимный метод отличается высокой специфичностью и простотой исполнения, к тому же он не требует особых кювет и выполняется в течение короткого промежутка времени.

Все ферментные методы связаны с необходимостью применения кристаллических ферментов, в частности уриказы; это ограничивает их распространение в клинических лабораториях.

На ферментативном принципе основан метод исследования мочевой кислоты потенциометрическим электродом с иммобилизованной уриказой.

В последние годы разработано энзиматическое спектрофлуориметрическое определение содержания мочевой кислоты, в частности, связанное с использованием р-гидроксифенилуксусной кислоты в качестве флуорофора.

Описан калориметрический ферментный метод; он состоит в измерении количества теплоты, образованной в процессе прохождения энзимной реакции с участием ферментов уриказы и каталазы.

Содержание мочевой кислоты исследуют также методом жидкостной хроматографии. Для повышения специфичности метода применяют ионообменную хроматографию с дальнейшим определением содержания мочевой кислоты фосфорновольфрамовыми, уриказными, спектрофотометрическими способами. Ввиду доступности наибольшее распространение получили фосфорновольфрамовые методы. Низкая их специфичность повышается использованием уриказы, цианидов (растворы цианидов весьма токсичны и к тому же нестабильны), инкубацией сыворотки с карбонатами, хранением сыворотки в холодильнике не более 3 дней и другими способами.

Ряд авторов проводили параллельное определение мочевой кислоты фосфорновольфрамовыми и уриказными методами. Так, Генри (1974) показал высокую степень корреляции между фосфорновольфрамовыми и уриказными методами.

Фосфорновольфрамовый карбонатный метод имеет примерно одинаковую чувствительность с фосфорновольфрамовым цианидным способом, однако уриказные методы - более чувствительны.

Таким образом, из разнообразных групп методов наиболее чувствительные и специфичные уриказные, которые и предложены в качестве референтных. Однако исходя из технико-экономических критериев для практической работы в клинико-диагностических лабораториях в качестве унифицированного рекомендуется фосфорновольфрамовый карбонатный метод по Генри, Собелю

и Киму (1957). В дальнейшем в клинико-диагностических лабораториях для исследования мочевой кислоты будет осуществлен переход на уриказные методы.

Литература:

Колб В.Г., Камышников В.С. Справочник по клинической химии// Мн.: Беларусь, 1982. 367 с.

4.4.1 Определение мочевой кислоты в сыворотке крови унифицированным фосфорновольфрамовым методом

Принцип. Мочевая кислота восстанавливает фосфорновольфрамовый реактив с образованием комплекса голубого цвета. Интенсивность его окраски пропорциональна содержанию в пробе мочевой кислоты.

Реактивы. 1. 0,7 н серная кислота. 10,0 мл концентрированной серной кислоты вносят в мерную колбу на 500,0 мл, содержащую небольшое количество дистиллированной воды. После тщательного перемешивания объем доводят дистиллированной водой до метки.

2. Раствор вольфрамвокислого натрия. 50,0 г вольфрамвокислого натрия ($\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) помещают в мерную колбу на 500,0 мл с небольшим объемом дистиллированной воды, после чего приливают ее до метки.

3. Раствор углекислого натрия. 51,5 г углекислого натрия (Na_2CO_3) растворяют в мерной на 500 мл колбе в 300-400 мл дистиллированной воды и доводят объем дистиллированной водой до метки.

4. Фосфорновольфрамовый реактив. В круглодонную колбу (объем - 1500 мл) вносят 40,0 г $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ и 300,0 мл дистиллированной воды. Добавляют в смесь 32,0 мл ортофосфорной кислоты (85 г/100 мл) и несколько стеклянных бусинок. Вставляют в колбу обратный холодильник и осторожно кипятят ее содержимое в течение 2 ч на песчаной или глицериновой бане. Охлаждают раствор при комнатной температуре и доводят его объем дистиллированной водой до 1 л. Затем в колбе растворяют 32,0 г сернокислого лития ($\text{Li}_2\text{SO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$). Реактив хранят в темной бутылке в холодильнике. Раствор стабилен длительное время.

5. Основной стандартный (калибровочный) раствор -100 мг/ 100 мл. В мерной колбе на 100,0 мл растворяют 0,6 г углекислого лития (Li_2CO_3) в 50,0 мл дистиллированной воды при нагревании смеси до 60 °С. Добавляют 100 мг мочевой кислоты и содержимое колбы тщательно перемешивают до полного растворения внесенных компонентов. Затем вливают в нее 2,0 мл формалина и 0,15 мл ледяной уксусной кислоты. Содержимое колбы перемешивают и доводят объем дистиллированной водой до метки. Реактив хранят в темной посуде в холодильнике в течение 2 лет. 1 мл раствора содержит 1,0 мг мочевой кислоты.

6. Рабочий стандартный раствор. 1,0 мл основного калибровочного раствора доводят до 200 мл дистиллированной водой. 1 мл раствора содержит 0,005 мг мочевой кислоты. Рабочий стандартный раствор при хранении в холодильнике годен в течение двух недель.

Ход определения. В пробирку вносят 8,0 мл волю, 1,0 мл сыворотки, 0,5 мл раствора серной кислоты и содержимое пробирки перемешивают, затем добавляют 0,5 мл раствора вольфрамвокислого натрия и после тщательного пе-

ремешивания через 5-10 мин смесь фильтруют посредством бумажного фильтра. 3,0 мл полученного фильтрата используют для анализа.

В две другие пробирки отмеривают 3,0 мл дистиллированной воды (холодная проба) и 3,0 мл рабочего стандартного раствора.

В каждую пробирку вливают 1,5 мл раствора углекислого натрия, содержимое пробирки перемешивают и вносят в нее 1,0 мл фосфорновольфрамового реактива. Раствор взбалтывают вновь переворачиванием пробирки. Через 30 мин измеряют его оптическую плотность в кювете с шириной слоя 10 мм при длине волны 590-700 нм (красный светофильтр ФЭКа). Показатели экстинкции опытной и стандартной проб сопоставляют с оптической плотностью холодной (контрольной) пробы. Расчет ведут по формулам:

$$\text{Мочевая кислота (мг/100 мл)} = \frac{E_{оп.} \cdot C_{ст.} \cdot 10}{E_{ст.}} = \frac{E_{оп.} \cdot 5}{E_{ст.}},$$

$$\text{Мочевая кислота (ммоль/л)} = \frac{E_{оп.} \cdot C_{ст.} \cdot 10}{E_{ст.}} \cdot 0,059 = \frac{E_{оп.} \cdot 5}{E_{ст.}} \cdot 0,059,$$

где $E_{оп}$ - экстинкция опытной пробы; $E_{ст.}$ - экстинкция стандартной пробы (за вычетом оптической плотности контрольной пробы); $C_{ст.}$ - концентрация стандартного раствора 0,5 г/100 мл; 0,059 - коэффициент пересчета в единицы СИ; 10 - коэффициент пересчета на сыворотку: в опытную пробу берут 10,3 мл сыворотки, то есть в 10 раз меньше, чем в стандартную.

Литература:

Колб В.Г., Камышников В.С. Справочник по клинической химии// Мн.: Беларусь, 1982. 367 с.

4.4.2 Определение мочевой кислоты по методу Мюллера - Зейферта

Принцип метода основан на колориметрировании окрашенных продуктов, образующихся при восстановлении фосфорновольфрамового реактива мочевой кислотой.

Реактивы. 1. Реактив Фолина. 100 г х. ч. вольфрамата натрия растворяют в 750 мл дистиллированной воды в колбе Эрленмейера и при постоянном помешивании раствора добавляют в него 80 мл ортофосфорной кислоты (H_3PO_4), 85 г/100 мл. Затем содержимое колбы с установленным в нее обратным холодильником кипятят в течение 4-6 ч, раствор при этом из желтоватого становится бесцветным. Если смесь не обесцвечивается (что бывает редко), в колбу приливают небольшое количество брома (1-2 капли). Для удаления его избытка раствор следует прокипятить 10-15 мин. Из колбы Эрленмейера смесь переливают в мерную колбу и доводят дистиллированной водой до метки 1 л. Реактив стоек.

2. Трихлоруксусная кислота - 20 г/100 мл.

3. Стандартный раствор мочевой кислоты. На аналитических весах отвешивают 100 мг мочевой кислоты, и всю меру помещают в колбу на 500 мл. Затем в нее добавляют 25 мл раствора углекислого лития (Li_2CO_3 , 0,5 г/100 мл), 25 мл дистиллированной воды и после растворения мочевой кислоты доводят содержимое колбы дистиллированной водой до метки, предварительно прибавив в раствор для стойкости 12,5 мл формалина. Хранить в холодильнике в течение месяца.

Из основного (20 мг/100 мл) стандартного раствора готовят рабочий раствор (2 мг/100 мл), разводя основной в 10 раз. Рабочий раствор нестойкий и может сохраняться лишь в течение 2-3 дней. 1 мл его содержит 0,02 мг моченой кислоты.

4. Насыщенный раствор углекислого натрия (Na_2CO_3).

Ход определения. В центрифужную пробирку вносят 1,5 мл сыворотки, 1,5 мл дистиллированной воды и 1,5 мл трихлоруксусной кислоты. Содержимое пробы тщательно перемешивают и через 30 мин центрифугируют. Дальнейший порядок работы показан в табл. 2.

Табл. 2 Данные к методике исследования мочевой кислоты

| Реактивы | Опыт | Стандарт |
|--|---------|----------|
| Центрифугат, соответствующий 0,5 мл сыворотки | 1,5 мл | — |
| Стандартный рабочий раствор | — | 0,5 мл |
| Трихлоруксусная кислота | — | 0,5 мл |
| Дистиллированная вода | — | 0,5 мл |
| Насыщенный раствор соды (Na_2CO_3) | 0,7 мл | 0,7 мл |
| Реактив Фолина | 1 капля | 1 капля |

Через 10 мин обе пробы колориметрируют на ФЭКе при зеленом свето-фильтре в кювете с шириной слоя 5 мм, используя для сравнения дистиллированную воду.

Расчет производят по формуле:

$$C_x = (C_{ст.} \cdot E_{оп.}) / E_{ст.},$$

где C_x -это концентрация мочевой кислоты в сыворотке (мг/100 мл); $C_{ст.}$ - концентрация мочевой кислоты в стандартной пробе; $E_{оп.}$ -оптическая плотность опытной пробы; $E_{ст.}$ - оптическая плотность стандартной пробы.

Для преобразования старой размерности единиц в новую полученный результат (C_x) умножают на коэффициент 0,0590: $C_x \cdot 0,0590 = a$ ммоль/л.

Примечания: 1. Расчет можно производить и по калибровочной кривой. Для ее построения готовят стандартный раствор мочевой кислоты: к 500 мг мочевой кислоты, внесенной в мерную колбу на 500 мл. добавляют 75 мл 0,4 г/100 мл раствора углекислого лития. 20 мл формалина и около 250 мл воды. Смесь тщательно перемешивают, приливают к ней 6.25 мл 2 н H_2SO_4 и объем доводят до метки дистиллированной водой. Полученный стандартный раствор мочевой кислоты имеет концентрацию 100 мг/100 мл. При хранении в холодильнике он стоек в течение нескольких недель.

2. Для построения калибровочной кривой из основного стандартного раствора готовят серию разведения с концентрацией 0,5; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0; 6,0 мг/100 мл мочевой кислоты. С целью перевода значений из размерности мг/100 мл в размерность ммоль/л полученные показатели умножают на 0,0590.

При наличии в лаборатории спектрофотометра типа СФ-4, СФ-4А, СФ-16, СФ-26 и других рекомендуется проводить исследование мочевой кислоты по Маримонту и Лондону. В широкую пробирку (2,5x 9 см) вносят 0,3 мл сыворотки, пробирку помещают на 2 мин в кипящую водяную баню. После охлаждения в нее добавляют 3 мл воды и сгусток экстрагируют при + 37 °С в течение часа. Весь объем жидкости вводят в кювету спектрофотометра, с помощью которого выделяют длину волны 289 нм.

Концентрацию мочевой кислоты рассчитывают по калибровочной кривой, строящейся по общеизвестным принципам. Однако через все этапы метода вместо 0,3 мл сыворотки проводят стандартные пробы мочевой кислоты с концентрацией 0,5; 1,0; 3,0; 4,0; 5,0; 6,0 мг/100 мл (приготовление стандартного раствора аналогично таковому для предыдущего метода). Ответ дают в ммоль/л.

Примечания: 1. Сыворотку нужно использовать для анализа ее позднее чем через 6 ч с момента взятия крови.

2. Нельзя применять гемолизированную сыворотку, так как в случае гемолиза получаются неверные значения уровня мочевой кислоты.

Литература:

Колб В.Г., Камышников В.С. Справочник по клинической химии// Мн.: Беларусь, 1982. 367 с.

5 ИЗУЧЕНИЕ УГЛЕВОДНОГО ОБМЕНА

Наряду с глюкозой в крови содержатся также фруктоза и связанные с белками полисахариды. Однако к исследованию концентрации других сахаров и гликогена прибегают значительно реже. Известную диагностическую ценность представляет также определение молочной и пировиноградной кислот, активности ряда ферментов углеводного обмена и других показателей.

5.1 Определение глюкозы в крови

I. Редуктометрические методы, основанные на свойстве сахара восстанавливать в щелочной среде соли тяжелых металлов. К ним относятся:

1. Титрометрический способ Хагедорна и Йенсена (1923), в котором используют свойство сахаров восстанавливать при кипячении в щелочной среде железосинеродистый калий (красную кровяную соль) в железистосинеродистый калий (желтую кровяную соль). По степени этого восстановления титрометрически исследуют концентрацию сахара в крови. Однако ввиду того что в крови присутствует ряд соединений, не относящихся к углеводам, но обладающих восстановительными свойствами (мочевая кислота, глутатион, креатинин), полученный результат включает всю сумму восстанавливающих соединений и получаемое редуктометрическими методами количество сахара в крови оказывается значительно выше истинного количества глюкозы. В этом заключается недостаток всех редуктометрических способов. Однако они тем не менее сохраняют свое клиническое значение, поскольку разность между кажущимся сахаром крови и истинной глюкозой (так называемая остаточная редукция) у одного и того же лица есть величина постоянная, не зависящая, в частности, от введения инсулина или приема глюкозы.

2. Колориметрические методы, основанные на определении степени окраски соединений, образующихся в результате различных цветных реакций: а) метод Сомоджи (1933), в котором применяется способность глюкозы восстанавливать гидрат окиси меди в закись меди, превращающей, в свою очередь, арсеномолибденовую кислоту в молибденовую лазурь. Этот метод неспецифичен, трудоемок и в настоящее время редко используется в клинико-диагностических лабораториях;

б) метод Фолина -Ву (1919), состоящий в определении интенсивности окраски комплекса, образующегося в результате восстановления тартрата меди в окись меди. Последняя, взаимодействуя с молибдотустенговой кислотой, дает цветную реакцию. Способ относительно прост: недостатком его является то, что между имеющейся в крови глюкозой и получаемой окраской не существует строгой пропорциональности;

в) метод Крезелиуса-Зейферта (Крезелиус, Зейферт, 1928, 1942), базирующийся на восстановлении пикриновой кислоты в пикраминовую с последующим ее колориметрированием. Способ быстр в исполнении, но не очень точен. Ошибка может превышать 10-20 %. В связи с этим указанный метод имеет ориентировочное значение. Им можно пользоваться для исследования уровня сахара в крови при профилактических осмотрах;

г) метод с антроновым реактивом по Моррису (1948) и Роэ (1955). Антроновый способ заключается в колориметрировании цветного комплекса, об-

разующегося в результате соединения антрона с углеводами. Точные результаты могут быть получены только при наличии чистейших реактивов и соблюдении постоянной температуры реакции;

д) ортотолуидиновый метод Гультмана в модификации Хиваринена-Никкила (1962), состоящий в установлении интенсивности окрашивания раствора, возникающего при взаимодействии ортотолуидина с глюкозой. Этот способ точен и дает возможность более специфичного определения содержания глюкозы, поэтому он предлагается в качестве унифицированного.

II. Энзиматические (глюкозооксидазные) методы (Нельсон. 1940. и др.), основанные на каталитическом действии фермента глюкозооксидазы. Из способов этой группы наиболее широкое применение получил глюкозооксидазный метод определения глюкозы в крови по И. С. Лукомской и В. К. Городецкому (1961).

Согласно приказу об унификации, в качестве обязательных для использования предлагается три способа исследования: глюкозооксидазный, ортотолуидиновый и метод Хагедорна - Йенсена.

Ортотолуидиновый и глюкозооксидазный методы определения глюкозы могут выполняться с применением диагностических наборов реактивов фирмы «Лахема» (Чехия).

В нашей стране также освоен выпуск наборов химических реактивов для исследования глюкозы в биологических жидкостях по цветной реакции с ортотолуидином.

Литература:

Колб В.Г., Камышников В.С. Справочник по клинической химии// Мн.: Беларусь, 1982. 367 с.

5.1.1 Определение глюкозы в крови и моче по цветной реакции с ортотолуидином

Принцип. Глюкоза при нагревании с ортотолуидином в растворе уксусной кислоты даст зеленое окрашивание, интенсивность которого (прямо пропорциональная концентрации сахара в крови) устанавливаются колориметрически.

Реактивы. 1. Ортотолуидин, очищенный путем перегонки (с этой целью используют электроплитку с асбестовой сеткой или песчаную баню). Реактив должен иметь слегка желтоватую окраску. Хранят в холодильнике в посуде из темного стекла без доступа воздуха.

Предпочтительнее ортотолуидин перегонять в условиях создаваемого в аппарате разрежения вакуума, так как при температуре кипения + 200,2 °С происходит его разложение. При атмосферном давлении 10,64 кПа (80 мм рт. ст.) температура кипения ортотолуидина равна +121 °С, в связи с чем становится возможным получение бесцветного реактива. Перегонке подлежит ортотолуидин желтого или коричневого цвета.

2. Ледяная уксусная кислота - х. ч.

3. Раствор трихлоруксусной кислоты - 3 г/100 мл.

4. Тиомочевина.

5. Ортотолуидиновый реактив. 0,15 г (1,5 г) тиомочевины растворяют в 94 мл (940 мл) ледяной уксусной кислоты и смешивают с 6 мл (60 мл) бесцветного или слегка желтоватого ортотолуидина. Реактив стоек. Хранят его на холоде. Можно пользоваться готовым ортотолуидиновым реактивом отечественного производства.

6. Основной стандартный раствор глюкозы - 27,80 ммоль/л. В мерную колбу на 100 мл вносят 500 мг высушенной до постоянного веса при +100°C глюкозы и добавляют до метки бензойную кислоту (0,2 г/100 мл).

Раствор бензойной кислоты готовят следующим образом: 0,2 г кристаллической бензойной кислоты растворяют в небольшом количестве воды, нагревая смесь на водяной бане до полного растворения. После охлаждения до комнатной температуры реактив переносят в мерную колбу на 100 мл и доливают до метки дистиллированной водой. Бензойная кислота увеличивает стабильность стандартного раствора глюкозы.

Можно также пользоваться водным раствором глюкозы, однако время хранения такого стандартного реактива значительно меньшее. Экстинкция стандартного раствора не должна давать резких колебаний, в противном случае необходимо приготовить новый раствор. Хранить его следует в холодильнике.

Ход определения глюкозы в крови. В центрифужную (или серологическую) пробирку наливают 0,9 мл раствора трихлоруксусной кислоты и выдувают на стенку ее 0,1 мл крови, взятой микропипеткой из пальца обследуемого. Смесь взбалтывают, центрифугируют. К 0,5 мл центрифугата добавляют 4,5 мл ортотолуидинового реактива. Пробирку со смесью помещают в кипящую водяную баню на 8 мин (!), охлаждают ее под краном холодной водой (или в водяной бане). Колориметрируют на ФЭКе с красным (длина волны 600-650 нм) или желтым (длина волны 595 нм) светофильтром в кювете с шириной слоя 10 мм. В качестве раствора для сравнения вместо контрольной пробы можно использовать дистиллированную воду, поскольку значения их экстинкций практически одинаковы.

При проведении контрольной пробы (в чем нет необходимости) к 4,5 мл ортотолуидинового реактива доливают 0,5 мл трихлоруксусной кислоты. Далее пробу обрабатывают так же, как опытную.

М. Е. Халецкий и Ф. М. Колерно (1972), обобщив опыт 5-летнего использования этого метода в клинической практике (всего проведено более 8000 исследований сахара в крови), рекомендуют к 0,5 мл надосадочной жидкости добавлять 2,0 мл ортотолуидинового реактива, а фотометрирование осуществлять на ФЭКе с желтым светофильтром в кювете с шириной слоя 5 мм.

Примечание. После кипячения содержимое пробирок иногда бывает мутноватым. В таких случаях пробы необходимо вновь отцентрифугировать на протяжении 10 мин. а затем отобрать и проколориметрировать надосадочную жидкость.

Описанным способом может быть установлен сахар и в спинномозговой жидкости.

Стандартные пробы ставят так же, как опытные, но вместо сыворотки берут основной стандартный раствор глюкозы, разбавленный перед употреблением в 5 раз, с концентрацией 5,55 ммоль/л (в случае высокого содержания глю-

kozy в крови используют стандартные растворы с концентрацией 16,65 ммоль/л или основной раствор с концентрацией 27,80 ммоль/л).

Рассчитывают по формуле:

$$C_{оп.} = \frac{C_{ст.} \cdot E_{оп.}}{E_{ст.}},$$

где $C_{оп.}$ - концентрация глюкозы в опытной пробе (ммоль/л); $C_{ст.}$ - концентрация глюкозы в стандартной пробе, близкая к физиологической (5,55 ммоль/л); $E_{оп.}$ - оптическая плотность опытной пробы; $E_{ст.}$ - оптическая плотность раствора стандарта.

Этот вариант расчета дает наиболее точные результаты, поскольку он устраняет разнообразное влияние различных факторов, сказывающихся в процессе обработки опытных проб.

Однако при четко отработанной технике выполнения исследования, строгом соблюдении постоянства условий на всех этапах определения (в наибольшей степени это касается стандартизации условий прогревания проб в ходе анализа) расчет можно производить по калибровочным кривым или с применением коэффициента пересчета.

Чтобы получить данные для построения калибровочной кривой, необходимо сделать следующее. Из основного стандартного раствора глюкозы с концентрацией 55,50 ммоль/л (1000 мг/100 мл) берут 8, 10, 20, 30, 40 мл и доводят объемы раствором бензойной кислоты (0,2 г/100 мл) до 100 мл. Полученные таким путем рабочие стандартные растворы содержат соответственно 4,44; 5,55; 11,10; 16,65; 22,20 ммоль/л глюкозы.

Стандартные пробы обрабатывают так же, как опытные. Экстинкцию измеряют на ФЭКе с красным или желтым светофильтром в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора для сравнения используют дистиллированную воду (или контрольные реактивы). На основании полученных значений строят калибровочную кривую.

Закон Беера действителен при концентрировании глюкозы в сыворотке крови в пределах от 2,78 до 22,20 ммоль/л.

При содержании глюкозы в концентрации более 400 мг/100 мл (22,20 ммоль/л) исходное ее количество уменьшают в 2 раза и исследование повторяют.

С помощью построенной калибровочной кривой может быть выведен фактор пересчета. Тогда для определения концентрации глюкозы (ммоль/л) применяют следующую формулу:

Глюкоза в ммоль/л = экстинкция * константу (фактор пересчета).

Константу находят по значениям экстинкции различных концентраций глюкозы (5,55; 11,10; 16,65; 22,20 ммоль/л).

Константу вычисляют по формуле:

$$K = \text{концентрация глюкозы} / \text{экстинкцию}.$$

Полученные для каждой экстинкции значения констант складывают, после чего находят их среднее значение.

При пользовании другой серией ортотолуидина необходимо каждый раз строить новую калибровочную кривую.

Учитывая это обстоятельство, а также большую сложность соблюдения строгого постоянства условий, мы не рекомендуем устанавливать концентрацию глюкозы по калибровочной кривой.

В ряде случаев возникает необходимость определения глюкозы в эритроцитах. Известно, что большая проницаемость клеточных мембран эритроцитов по отношению к глюкозе исключает возможность их отмывания от плазмы крови, так как при этом из них удаляется глюкоза. И. В. Сидоренков с соавт. (1974) предложили формулу, на основании которой возможен расчет концентрации глюкозы в эритроцитах:

$$C_{\text{Э}} = \frac{(100\% \cdot C_{\text{К}}) - (\Pi \cdot C_{\text{П}})}{\text{Э}},$$

где $C_{\text{Э}}$, $C_{\text{К}}$, $C_{\text{П}}$ - содержание глюкозы в эритроцитах, цельной крови и плазме в отдельности, а Π и Э - процентное содержание плазмы и эритроцитов (гематокритное число).

Показано, что хранение крови при $+4^{\circ}$ в течение первых двух часов после ее взятия практически мало отражается на содержании глюкозы в эритроцитах и плазме крови.

Ход определения глюкозы в моче. После проведения качественной пробы на содержание глюкозы мочу разводят в 2-10 раз в зависимости от характера реакции.

0,1 мл подготовленной таким способом мочи смешивают с 4,5 мл ортотолуидинового реактива и далее пробы обрабатывают так же, как опытные, при исследовании глюкозы в крови.

При расчете надо учитывать соответствующее разведение мочи.

В норме моча содержит следы глюкозы. Для перехода от процентной концентрации к выражению содержания глюкозы в ммоль/л следует воспользоваться фактором пересчета 5,55.

Примечание. Наличие белка в моче не влияет на определение глюкозы.

Исследование глюкозы в крови, спинномозговой жидкости и моче, проводимое ортотолуидиновым методом с использованием наборов реактивов (рижский завод «Реагент» и фирма «Лахема», Чехия), подробно изложено в прилагаемых инструкциях. При использовании наборов реактивов нужно делать пересчет результатов из мг/100 мл в ммоль/л, для чего применяют фактор пересчета 0,0555.

Примечание. При определении содержания глюкозы в биологических жидкостях с помощью ортотолуидинового реактива отечественного производства необходимо соблюдать некоторые меры предосторожности. В состав этого реактива входят ортотолуидин и концентрированная уксусная кислота. Ортотолуидин (или ортоаминотолуол) представляет собой жидкость с низким давлением паров, поэтому отравление этим веществом происходит не за счет вдыхания его паров, а контактным путем, то есть через кожу, причем ортотолуидин не оказывает на кожу раздражающего действия. В литературе описаны случаи острого и хронического отравления этим веществом людей, имевших дело с высокими концентрациями ортотолуидина (при его промышленном производстве).

Концентрация ортотолуидина (6 мл/100 мл), используемая при работе с набором реактивов, не представляет какой-либо опасности для здоровья человека. Раздражающее действие на органы дыхания и кожу оказывают уксусная кислота и ее пары. Чтобы избежать нежелательного действия паров кислоты, работу с набором реактивов необходимо проводить

под тягой, в резиновых перчатках, применять пробирки с пробками, ни в коем случае не втягивать реактив в пипетку ртом (следует пользоваться резиновой грушей).

Литература:

Колб В.Г., Камышников В.С. Справочник по клинической химии// Мн.: Беларусь, 1982. 367 с.

5.1.2 Определение глюкозы биологических жидкостей анилиновым методом

Исследования Р. Г. Григоряна и И.З. Кироша (1978) показали, что орто-толуидин с успехом может быть заменен анилином. При этом метод, сохраняя специфичность ортотолуидинового, оказывается еще более чувствительным.

Принцип. Анилин, взаимодействуя (подобно ортотолуидину) с глюкозой, образует комплекс, о содержании которого судят по интенсивности светопоглощения пробы при 365 нм.

Реактивы. 1. Осадитель белков: а) раствор трихлоруксусной кислоты – 3 г/100 мл или б) раствор хлорной кислоты - 4 г/100 мл.

2. Раствор анилина в ледяной уксусной кислоте (6 г/100 мл), содержащий тиомочевину в концентрации 0,15 г тиомочевины на 100 мл раствора анилина в ледяной уксусной кислоте. Анилин предварительно перегоняют, лучше без доступа воздуха.

3. Калибровочные растворы - 2,78 ммоль/л (50 мг/100 мл), 5,55 ммоль/л (100 мг/100 мл), 11,10 ммоль/л (200 мг/100 мл) глюкозы.

Ход определения. В центрифужные пробирки набирают 0,9 мл раствора осадителя, в который выдувают 0,1 мл крови или спинномозговой жидкости. Раствор тщательно перемешивают и центрифугируют при 1500 об/мин в течение 10-15 мин. Из надосадочной жидкости отбирают 0,5 мл, переносят в пробирки, в которые добавляют по 4,5 мл раствора анилина, все перемешивают и помещают пробирки в кипящую водяную баню точно на 10 мин. После этого пробирки извлекают, охлаждают и растворы колориметрируют на ФЭКе-56 в кюветах с толщиной рабочего слоя 10 мм (длина волны 365 нм) с использованием ртутной лампы ОВД-120 А.

Экстинкцию продуктов конденсации глюкозы с анилином можно замерять как в ультрафиолетовой (365 нм), так и в видимой области (460 нм).

При фотометрии стандартных растворов глюкозы в ультрафиолетовых лучах на ФЭКе-56 их экстинкции в 4-5 раз выше, чем при колориметрии рассматриваемых растворов в видимых лучах.

Нормы содержания глюкозы те же, что и при исследовании этого компонента ортотолуидиновым методом.

Литература:

Колб В.Г., Камышников В.С. Справочник по клинической химии// Мн.: Беларусь, 1982. 367 с.

5.1.3 Определение глюкозы в крови, плазме (сыворотке) и спинномозговой жидкости глюкозооксидазным методом

Принцип. Глюкоза в присутствии фермента глюкозооксидазы окисляется кислородом воздуха с образованием в ходе реакции перекиси водорода. Пере-

кись водорода окисляет ортотолуидин, превращая его в окрашенное соединение, интенсивность окраски которого пропорциональна содержанию глюкозы.

Реактивы. 1. Кристаллический препарат глюкозооксидазы (β -D-глюкоза: O_2 -оксидоредуктаза; КФ 1.1.3.4). Отечественную глюкозооксидазу выпускают, как правило, с активностью 90—120 тыс. глюкозооксидазных единиц на 1 г препарата. Хранят в холодильнике в герметической упаковке.

2. Кристаллический препарат пероксидазы (перекись водорода: оксидоредуктаза; КФ 1.11.1.7). Пероксидаза фирмы «Реанал» (ВНР) со степенью очистки 0,6 пригодна для определения глюкозы. Содержат в холодильнике в герметической упаковке.

3. Раствор хлористого натрия-0,9 г/100 мл.

4. 0,25 моль/л раствора уксуснокислого натрия. 17 г кристаллического уксуснокислого натрия ($CH_3COONa \cdot 3H_2O$) растворяют в мерной колбе на 500 мл в небольшом количестве воды и доводят объем дистиллированной водой до метки.

5. 0,25 моль/л раствора уксусной кислоты. В мерную колбу на 500 мл наливают небольшое количество воды, добавляют 7,75 мл ледяной уксусной кислоты и доливают объем дистиллированной водой до метки.

6. 0,25 моль/л ацетатного буфера, рН 4,8. 0,25 моль/л раствора уксуснокислого натрия смешивают с 0,25 моль/л раствора уксусной кислоты в соотношении 6:4. Проверяют рН. Буферный раствор стабилен при хранении в холодильнике в течение месяца.

7. Раствор сернокислого цинка. 50 г кристаллического сернокислого цинка ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$) растворяют в 1 л дистиллированной воды. Раствор стабилен. Содержат при комнатной температуре.

8. 0,3 н раствор едкого натра.

Раствор сернокислого цинка и едкого натра берут для реакции в эквивалентных количествах, то есть они должны нейтрализовать друг друга. Для этого раствор сернокислого цинка титруют раствором едкого натра до нейтральной реакции по фенолфталеину (слабо розовая окраска). Если на титрование пошло равное количество растворов, то реактив пригоден для использования.

9. Ортотолуидин (азоамин синий К; 3,3-диметилбензидин), ч.д.а. Имеющийся в продаже ортотолуидин перекристаллизовывают из горячего абсолютного этилового спирта добавлением дистиллированной воды с последующим быстрым отсасыванием выпавших кристаллов на воронке Бюхнера и высушиванием ортотолуидина в вакуум-эксикаторе над хлористым кальцием.

10. Абсолютный этиловый спирт, полученный в лаборатории или коммерческий.

11. Раствор ортотолуидина в абсолютном этиловом спирте - 1 г/100 мл. 1 г ортотолуидина растворяют в небольшом количестве теплого этилового спирта. После охлаждения доводят объем смеси этиловым спиртом до 100 мл. Раствор стабилен на протяжении нескольких месяцев при хранении в холодильнике в плотно закрытой посуде из темного стекла.

12. Энзимо-хромогенный реактив. В мерную колбу на 500 мл помещают 300-400 мл 0,25 моль/л ацетатного буфера (рН 4,8), добавляют 10 мг глюкозо-

оксидазы (навеска взята из расчета активности глюкозооксидазы - 92000 ед. на 1 г препарата; при применении препарата с другой активностью фермента соответственно будет меняться величина навески), содержимое перемешивают до полного растворения, вносят 5 мг пероксидазы. Смесь опять перемешивают до полного растворения. Добавляют 5 мл 1 г/100 мл раствора ортотолидина и доводят объем до метки ацетатным буфером, затем реактив фильтруют. Он стабилен в течение 3-4 недель при хранении в холодильнике в плотно закрытой посуде из темного стекла.

Только что полученный реактив бесцветен или окрашен в слабозеленый цвет. Годен к употреблению через 2 ч после приготовления. Если реактив интенсивного зеленого цвета, то это свидетельствует о загрязнении ортотолидина. В таком случае ортотолидин необходимо перекристаллизовать.

13. Раствор бензойной кислоты - 0,2 г/100 мл. Готовят нагреванием.

14. Стандартный раствор D-глюкозы в 0,2 г/100 мл растворе бензойной кислоты. Высушенную до постоянного веса при +37 С D-глюкозу хранят в эксикаторе. 500 мг глюкозы растворяют в мерной колбе на 100 мл в 0,2 г/100 мл растворе бензойной кислоты. Оставляют стоять на свету в течение 12-16 ч. 1 мл стандартного раствора содержит 5 мг глюкозы.

Ход определения. Для приготовления опытной пробы в центрифужную пробирку помещают 1,1 мл раствора хлористого натрия, добавляют 0,1 мл крови (плазмы, сыворотки или спинномозговой жидкости), несколько раз промывают пипетку, приливают 0,4 мл раствора сернокислого цинка и 0,4 мл раствора едкого натра. Содержимое пробирки тщательно перемешивают и через 10 мин центрифугируют при 2500 об/мин на протяжении 10 мин. Тотчас же сливают надосадочную жидкость.

К 1 мл надосадочной жидкости помещают 3 мл энзимо-хромогенного реактива, доведенного предварительно до комнатной температуры. Осторожно все перемешивают и на 20-23-й мин измеряют экстинкцию раствора на фотоэлектроколориметре с красным светофильтром в кювете с толщиной слоя 10 мм (длина волны 625 нм). Результаты сравнивают с аналогичными данными контрольной пробы.

Контрольную пробу готовят следующим образом. К 1 мл дистиллированной воды добавляют 3 мл энзимо-хромогенного реактива.

Количество проб в серии не должно превышать 10-15. Причем отрезок времени с момента доливания энзимо-хромогенного реактива до измерения экстинкции раствора должен быть во всех пробах одинаковым.

Расчет производят по формуле:

$$C_{oa} = E_{op} / E_{ст} \cdot C_{ст},$$

где C_{oa} - концентрация глюкозы в крови (мг/100 мл); $C_{ст}$ - концентрация глюкозы в стандартном растворе (мг/100 мл, например, 100 мг/100 мл); E_{op} - экстинкция опытной пробы; $E_{ст}$ - экстинкция стандартной пробы.

Поскольку результаты определений зависят в значительной степени от условий выполнения исследования, то стандартную пробу ставят параллельно опытной и обрабатывают ее так же, как и опытную. На 1 серию проводят 1

стандартную пробу. Линейная зависимость между оптической плотностью и концентрацией глюкозы сохраняется от 0 до 400 мг/100 мл.

Примечания: 1. Цельную кровь необходимо исследовать немедленно после взятия.

2. В каждую последующую пробу серии энзимо-хромогенный реактив добавляют с интервалом в 1 мин.

3. Для получения более точных результатов время максимального окрашивания (20-23 мин) устанавливают в каждой серии тестов по нарастанию экстинкции первой опытной пробы.

Основным компонентом сахара крови является глюкоза, содержащаяся в ней в концентрации 2,78-5,27 ммоль/л. Наряду с этим в крови в незначительном количестве имеются и другие сахара - фруктоза, галактоза, пентозы.

На содержание сахара в крови оказывают влияние самые разнообразные физиологические и патологические процессы. Увеличение концентрации глюкозы в крови - гипергликемия - наблюдается обычно при следующих состояниях:

1) сахарном диабете, остром панкреатите, панкреатических циррозах (эти заболевания дают гипергликемию, связанную с недостатком в организме инсулина);

2) токсическом, травматическом, механическом раздражении центральной нервной системы. Травма, опухоль мозга, а также эпилепсия, менингит, отравление окисью углерода, синильной кислотой, эфиром, ртутью сопровождаются так называемой центральной (нервной) гипергликемией;

3) повышении гормональной деятельности щитовидной железы, коры и мозгового слоя надпочечников, гипофиза;

4) после обильного приема с пищей углеводов - алиментарная гипергликемия;

5) сильном эмоциональном и психическом возбуждении;

Уменьшение уровня глюкозы в крови - гипогликемия - встречается при:

1) передозировке инсулина (во время лечения сахарного диабета);

2) заболевании почек, когда нарушается процесс реабсорбции в канальцах;

3) плохом всасывании углеводов вследствие заболевания тонкого кишечника;

4) иногда при сердечной недостаточности;

5) сниженной гормональной деятельности перечисленных выше желез внутренней секреции;

6) спленомегалии;

7) отравлении фосфором, бензолом, хлороформом;

8) после большой потери крови;

9) гиперфункции островков Лангерганса поджелудочной железы (аденома, гиперплазия, гипертрофия);

10) несбалансированной диете (при неправильном соотношении пищевых веществ), от недоедания и голода - алиментарная гипогликемия.

Среди заболеваний, связанных с нарушением обмена углеводов, следует отметить наследственную непереносимость фруктозы и эссенциальную фруктоземию.

Непереносимость фруктозы связана с отсутствием в печени, почках и слизистой кишечника фруктозе-1-фосфатаьдолазы и значительным снижением активности фруктозе-1,6-дифосфатаьдолазы.

Эссенциальная фруктоземия - доброкачественная врожденная аномалия обмена фруктозы, вызванная недостаточной активностью фруктокиназы.

Содержание фруктозы в крови увеличивается при заболеваниях печени, ее наследственной недостаточности.

Алиментарная фруктоземия часто наступает после обильного приема фруктозы с пищей.

Литература:

Колб В.Г., Камышников В.С. Справочник по клинической химии// Мн.: Беларусь, 1982. 367 с.

6 МЕТОДЫ ИЗУЧЕНИЯ ОБМЕНА ЛИПИДОВ

Основным биологическим материалом, используемым для осуществления биохимической диагностики заболеваний с нарушением обмена липидов, является кровь больного. Ее главные липидные компоненты: свободный и эстерифицированный холестерин, фосфолипиды, триацилглицерины, неэстерифицированные жирные кислоты. Перечисленные липиды находятся в крови не только в свободном состоянии, но и в форме соединений, связанных с белком, то есть липидно-белковых комплексов (липопротеидов).

Так называемые общие липиды объединяют в себе сумму всех липидов, содержащихся в плазме или сыворотке крови (холестерин, фосфолипиды, триацилглицерины, жирные кислоты и другие).

6.1 Исследование общих липидов и их фракций

Для количественного определения общих липидов в сыворотке крови предложено много способов, среди которых можно выделить следующие группы.

Гравиметрические методы, состоящие в экстракции липидов сыворотки каким-либо растворителем, очистке липидного экстракта, высушивании и взвешивании сухого остатка на аналитических весах. Эти методы точны, однако весьма сложны, требуют определенных навыков, большого количества исходного материала, оборудования, времени. В более простых модификациях гравиметрических методов ошибка достигает 10-20 %.

Окислительные методы, в которых используется окисление липидов бихроматом калия или хромовой кислотой с последующим титриметрическим либо колориметрическим исследованием. Они осуществляются при условии высокой техники исполнения и исключительной чистоты во время проведения исследования.

Методы, основанные на свойстве липидов сыворотки избирательно окрашиваться Суданом черным. Они удобны, просты, технически несложны, но отличаются плохой воспроизводимостью.

Методы, базирующиеся на сравнении степени мутности стандартного и исследуемого растворов. В нефелометрических способах (Кункель с соавт., 1948) общие липиды определяют при взаимодействии сыворотки и реактива, состоящего из фенола и хлористого натрия. По точности метод приближается к гравиметрическому.

Методы, в которых используется описанная в 1937 г. Чабролом и Чаронатом цветная реакция продуктов распада ненасыщенных липидов с реактивом (включающим в себя ванилин, фосфорную и серную кислоты).

Механизм реакции заключается в следующем: ненасыщенные липиды реагируют с серной кислотой при нагревании смеси с образованием карбониевого аниона; фосфорная кислота эстерифицирует ОН-группу ванилина; карбониевый ион взаимодействует с активированной карбонильной группой фосфата ванилина, в результате реакции получается стабилизированный окрашенный комплекс. Зольнер и Кирш в 1962 г. предложили основанный на этой реакции метод определения липидов в сыворотке крови, который в дальнейшем был

усовершенствован Ю. А. Барышковым с соавт., Кнайтом с соавт. и другими исследователями.

Большинство авторов, применяющих для установления концентрации общих липидов реакцию с сульфофосфованилиновым реактивом, отмечает, что рассматриваемая реакция высокочувствительна и технически проста. Метод дает достаточно воспроизводимые результаты. Он наиболее пригоден для использования в широкой лабораторной практике. Поэтому из всех существующих способов определения общих липидов в сыворотке крови в качестве унифицированного принята описанная ниже модификация двух методов: Зольнера и Кирша (1966), Кнайта с соавт. (1972). На реакции с сульфофосфованилиновым реактивом базируется метод, который выполняют с применением диагностических наборов реактивов (фирма «Лаксема», Чехия).

Литература:

Колб В.Г., Камышников В.С. Справочник по клинической химии// Мн.: Беларусь, 1982. 367 с.

6.1.1 Определение общих липидов в сыворотке крови по цветной реакции с сульфофосфованилиновым реактивом

Принцип. Продукты распада ненасыщенных липидов образуют с реактивом, состоящим из серной, ортофосфорной кислот и ванилина, соединение, интенсивность окраски которого пропорциональна содержанию общих липидов в сыворотке крови.

Реактивы. 1. Серная кислота (концентрированная) для пробы Саваяля.

2. Ортофосфорная кислота, концентрированная.

3. 0,6 г/100 мл водный раствор ванилина. 0,6 г ванилина растворяют в небольшом количестве дистиллированной воды при нагревании смеси на водяной бане. После охлаждения объем доводят до 100 мл. Раствор стабилен, если хранить его при комнатной температуре.

4. Фосфорнованилиновая смесь. 4 части концентрированной ортофосфорной кислоты смешивают с 1 частью 0,6 г/100 мл раствора ванилина. Смесь хранят в посуде из темного стекла при комнатной температуре.

5. Хлороформ х. ч. или для наркоза.

6. Основной (12,0 г/л) стандартный раствор триолеина. На аналитических весах взвешивают в бюксе 1200 мг триолеина, навеску переносят в мерную колбу на 100 мл и доводят объем хлороформом до метки. Раствор держат в холодильнике в посуде из темного стекла с притертой пробкой.

Ход определения. Опытная проба. К 0,05 мл сыворотки прибавляют 2,5 мл концентрированной серной кислоты. Содержимое пробирки тщательно перемешивают и помещают на 10 мин в кипящую водяную баню. Пробирку вынимают и сразу же охлаждают водопроводной водой до комнатной температуры. Из пробирки отбирают 0,2 мл смеси, которую переносят в другую пробирку, содержащую 3 мл фосфорнованилиновой смеси. После тщательного перемешивания пробы оставляют на 45 мин в темноте при комнатной температуре. Экстинкцию измеряют на фотоэлектроколориметре с зеленым светофильтром (длина волны 500-560 нм) в кювете с толщиной слоя 5 мм. Результаты сравнивают с аналогичными данными контрольной пробы.

Контрольную пробу ставят так же, как опытную, но вместо сыворотки берут 0,05 мл воды.

Расчет производят по калибровочному графику или по формуле (норма - 4,0-8,0 г/л).

Для получения данных на построение калибровочного графика из основного раствора готовят рабочие стандартные растворы (табл. 3).

Табл. 3 Данные к построению калибровочного графика для определения общих липидов в сыворотке крови

| № пробирок | Основной стандартный раствор триолеина (мл) | Хлороформ (мл) | Концентрация общих липидов (г/л) |
|------------|---|----------------|----------------------------------|
| 1 | 0,17 | 0,83 | 2,0 |
| 2 | 0,33 | 0,67 | 4,0 |
| 3 | 0,50 | 0,50 | 6,0 |
| 4 | 0,67 | 0,33 | 8,0 |
| 5 | 0,83 | 0,17 | 10,0 |
| 6 | 1,00 | — | 12,0 |

Примечания: 1. Исследование проводить натощак.

2. Сыворотку можно хранить в холодильнике в течение 3-6 дней (не замораживая ее).

3. При концентрации общих липидов выше 12,0 г/л сыворотку следует развести дистиллированной водой, а полученный по калибровочной кривой или по формуле результат нужно умножить на цифру разведения.

4. Посуду, применяемую для определения общих липидов, нужно мыть отдельно. Необходимо тщательно прополоскать ее дистиллированной водой и спиртом.

Из каждого разведения берут по 0,05 мл рабочего стандартного раствора и далее пробы обрабатывают так же, как опытные. Пользуясь найденными данными, строят калибровочный график. Прямая зависимость между содержанием общих липидов и оптической плотностью сохраняется до 12 г/л.

Расчет по формуле:

$$\text{общие липиды (г/л)} = E_{\text{оп.}} / E_{\text{ст.}} \cdot C_{\text{ст.}},$$

где E -экстинкция опытных и стандартных проб; C - концентрация основного стандартного раствора (12,0 г/л).

Как физиологическое явление увеличение содержания липидов в крови (гиперлипемия) наступает через 1-4 ч после принятия обследуемым пищи. Оно выражено тем сильнее, чем ниже уровень липидов в крови натощак.

Для разделения общих липидов на составляющие их компоненты весьма удобно использование методов тонкослойной хроматографии. Однако необходимость в приготовлении пластин с тонким слоем силикагеля и сложность учета выделяемых фракций сдерживают их широкое применение в клинико-диагностических лабораториях. Поэтому для определения фракций липидов большое распространение получили различные химические методы.

Из всех компонентов липидного спектра сыворотки крови наибольший интерес представляет исследование содержания общего холестерина и его эстерифицированной формы.

Литература:

Колб В.Г., Камышников В.С. Справочник по клинической химии// Мн.: Беларусь, 1982. 367 с.

6.2 Холестерин

Холестерин представляет собой вторичный одноатомный ароматический спирт (3-окси-5-холестенен), в молекуле которого имеется общее всем стеринам полициклическое ядро циклопентанпергидрофенантрена.

Он обнаруживается во всех тканях и жидкостях человеческого и животного организма как в свободном состоянии, так и в виде сложных его эфиров - соединений спиртовой группы холестерина с жирными кислотами (преимущественно ненасыщенными, например, линолевой).

В сыворотке он находится главным образом в β - и пре- β -липопротеидах, причем 60-70 % его представлено в форме сложных эфиров; 30-40 % холестерина неэстерифицировано.

Свободный и эстерифицированный холестерин составляет фракцию общего холестерина.

Методы определения общего холестерина подразделяются на:

I. Колориметрические. Насчитывается около 150 колориметрических способов, в основе которых лежат следующие реакции образования цветных комплексов:

1) реакция Либермана-Бурхарда (Либерман, 1885; Бурхард, 1890), при которой холестерин, взаимодействуя с уксусным ангидридом, уксусной и концентрированной серной кислотами, дает изумрудно-зеленое окрашивание раствора;

2) реакция Калиани-Златкиса-Зака, заключающаяся в появлении фиолетового окрашивания раствора при реакции холестерина с хлорным железом, уксусной и серной кислотами;

3) реакция Чугаева (Л. Чугаев, 1900), для которой характерно возникновение красного окрашивания в ходе взаимодействия холестерина с ацетилхлоридом и хлористым цинком;

4) реакция Биоля и Крофта - появление красного окрашивания раствора при реакции холестерина с персульфатом калия, уксусной и серной кислотами.

5) реакция Ригли (1964) - образование комплекса фиолетового цвета в ходе взаимодействия холестерина с реактивом, состоящим из серной кислоты и метилового спирта.

II. Нефелометрические методы, основанные на сравнении степени мутности стандартного и исследуемого растворов.

III. Титрометрические методы.

IV. Гравиметрические методы.

V. Флюориметрические методы (по реакции с о-фталевым альдегидом и другими реактивами). Часто используются как конечный этап ферментативного (каталазного) способа определения общего холестерина.

VI. Хроматографические методы, в том числе способ газожидкостной хроматографии. Последний был предложен как референтный (Ambert с соавт., 1976) для исследования общего и свободного холестерина в плазме. Характеризуясь специфичностью, простотой исполнения и требуя небольшого количества биологической жидкости, он с успехом может применяться в педиатрической практике.

VII. Полярографические методы, позволяющие определять общий и свободный холестерин в присутствии ферментов холестеролоксидаз и холестеролэстераз. Они могут использоваться для специальных исследований и в педиатрической практике.

VIII. Ферментативные методы, в которых в качестве основных реактивов применяются энзимы холестеролоксидаза, холестеролэстераза, пероксидаза и индикаторы протекания реакции (4-гидроксибензоат, 4-амнофеназон и другие). Наряду с пероксидазными используются и каталазные способы. Ферментные методы, будучи наиболее специфичными, отличаются хорошей воспроизводимостью результатов, быстротой и простотой проведения анализа, но требуют для исполнения дорогостоящих реактивов. Большим их достоинством является возможность применения для реакции всего лишь 5 мкл сыворотки, а также то, что для реакции не нужны агрессивные жидкости (H_2SO_4 , уксусная кислота, уксусный ангидрид и другие). В последние годы ферментативный метод исследования общего холестерина, как и экстракционный колориметрический, используется для автоматизированного его определения на центрифужном анализаторе. Фирма «Берингер» поставляет соответствующие наборы реактивов. Röschlau с соавт. (1974) предложили простой ферментный способ установления концентрации общего холестерина, основанный на следующем принципе. Под влиянием холестеролэстеразы общий холестерин превращается в свободный. При этом выделяются жирные кислоты. Под действием холестеролоксидазы свободный холестерин окисляется в холестенон. При добавлении каталазы или пероксидазы образуется формальдегид, который реагирует с ионами аммония и ацетилацетоном с образованием соединения, оптическую плотность которого измеряют при 450 нм.

Для определения общего холестерина в клинико-диагностических лабораториях применяются главным образом колориметрические методы, базирующиеся на реакциях Либермана-Бурхарда и Калиани-Златкиса-Зака.

Методы, состоящие в использовании предложенной около 80 лет тому назад реакции Либермана-Бурхарда, условно можно разделить на не прямые и прямые. Непрямые способы (Энгельгардта-Смирновой, Раппопорта - Энгельберга) получили такое название потому, что исследование холестерина по ним проводится лишь после извлечения из сыворотки холестеринового экстракта.

Методы с предварительной экстракцией общего холестерина изопропанолом и последующим проведением цветной реакции в ряде стран применяются как референтные (ручной метод Abell и автоматизированный способ определения холестерина на автоанализаторе фирмы «Techicon A. A. II»).

В прямых же методах холестерин предварительно не экстрагируется, а цветная реакция осуществляется непосредственно с сывороткой крови. Из них заслуживают внимания методы Илька, Мрскоса -Товарека и Златкиса - Зака. Из химических способов более надежны методы, базирующиеся на реакции Зака, так как окрашивание, образующееся в реакции Либермана - Бурхарда, нестабильно.

Методы Илька и Мрскоса - Товарека равнозначны по точности результатов и техническому исполнению для применения в клинико-диагностических

лабораториях лечебно-профилактических учреждений. В качестве основного унифицированного (наряду с методом, в котором используется реакция Златкиса - Зака) утвержден способ определения холестерина по Ильку.

За рубежом большее распространение получил способ исследования холестерина по Abell с соавт. (1958). Данный метод предложен американским обществом клинических химиков ВОЗ для всех стран в качестве стандартного метода определения содержания холестерина. Он, наряду с автоматизированным установлением концентрации холестерина на автоанализаторе «Techicon А. А. II», используется для выполнения эпидемиологических исследований в кардиологических центрах нашей страны. Этот колориметрический метод по сравнению со способом Илька дает более точные результаты. Так, по данным К. И. Розенцвейга, при исследовании холестерина по Ильку получаются завышенные на 10-15 % результаты. В. В. Белов (1979) показал, что при определении холестерина по Ильку результаты оказываются на 6,5 % выше по сравнению с данными исследования холестерина по Abell. Это обстоятельство важно учитывать при фенотипировании гиперлиппротеидемий.

Литература:

Колб В.Г., Камышников В.С. Справочник по клинической химии// Мн.: Беларусь, 1982. 367 с.

6.2.1 Метод определения общего холестерина в сыворотке крови, основанный на реакции Либермана - Бурхарда (метод Илька)

Принцип. Холестерин в присутствии уксусного ангидрида и смеси уксусной и серной кислот дает зеленое окрашивание раствора.

Реактивы. 1. Реактив Либермана - Бурхарда, представляющий смесь одной части ледяной уксусной кислоты, пяти частей уксусного ангидрида и одной части концентрированной серной кислоты, выдерживающей пробу Савая. Ввиду того что реакция протекает с выделением тепла, колбу постоянно охлаждают, а серную кислоту добавляют в нее в последнюю очередь, очень медленно, при постоянном помешивании содержимого. Полученная смесь должна быть прозрачной, бесцветной или слегка желтоватой. Ее переливают в склянку из темного стекла с притертой пробкой и хранят в холодильнике. При несоблюдении последовательности добавления реактивов и без охлаждения колбы, смесь получается темно-желтой и, следовательно, непригодна к употреблению.

2. Стандартный раствор холестерина (4,7 ммоль/л). На аналитических весах отвешивают 180 мг холестерина, навеску растворяют в 2,5 мл хлороформа, количественно полностью переносят в мерную колбу емкостью 100 мл, объем которой доводят до метки абсолютным этиловым спиртом. Приготовленный раствор хранят в склянке из темного стекла с притертой пробкой (с дополнительной герметизацией парафином) в холодильнике. 1 мл его содержит 1,8 мг холестерина. Раствор нестойкий.

3. Абсолютный этиловый спирт. Для абсолютирования этанола используют безводный сульфат меди, который получают прокаливанием кристаллической соли (медного купороса) при +120°C в сушильном шкафу при периодическом ее перемешивании. Безводный сульфат меди хранят в герметически закрытых банках. Порошок сернокислой меди заливают 96° этиловым спиртом и

оставляют на 3-4 дня. Ежедневно раствор перемешивают. Находящиеся в осадке частицы со временем приобретают синий цвет (за счет образования кристаллогидратов). Затем спирт сливают и засыпают новой порцией безводного сульфата меди. Это все продолжают до тех пор, пока цвет осадка не будет изменяться. Спирт сливают и фильтруют.

4. Хлороформ х. ч. или для наркоза.

Ход определения. К 2,1 мл реактива Либермана - Бурхарда (1) осторожно, очень медленно добавляют 0,1 мл негемолизированной сыворотки так, чтобы она стекала по стенке пробирки. Пробирку при этом энергично встряхивают 10-12 раз, после чего термостатируют 20 мин при +37 °С. Затем смесь колориметрируют на ФЭКе с красным светофильтром (длина волны 630-690 нм) в кювете с шириной слоя 5 мм. Показатели экстинкции учитывают в сравнении с таковыми контрольной пробы (реактива 1).

Для построения калибровочного графика из стандартного раствора холестерина готовят ряд разведений (табл. 4).

Полученные стандартные пробы обрабатывают так же, как и опытные, то есть энергично встряхивают, помещают в термостат, после чего колориметрируют. Калибровочный график строят по цифрам экстинкций, найденным в результате колориметрии стандартных растворов.

Для перевода величины содержания холестерина в стандартной пробе, выраженной в мг, в прежние значения концентрации (мг/100 мл) общее количество холестерина, заключенное в каждой из стандартных проб, умножают на 1000, так как берут сыворотку в опыт в объеме 0,1 мл, а расчет ведут на 100 мл указанной сыворотки. Для представления значений концентрации в размерности ммоль/л полученный результат (в мг/100 мл) умножают на коэффициент 0,026. Содержание холестерина выражают также в г/л, что менее предпочтительно.

Табл. 4 Данные к построению калибровочного графика для определения холестерина

| № пробирок | Объем стандартного раствора холестерина (мл) | Объем реактива 1 (мл) | Количество холестерина в пробе (мг) | Концентрация холестерина (мг/100 мл, ммоль/л) |
|------------|--|-----------------------|-------------------------------------|---|
| 1 | 0,05 | 2,15 | 0,09 | 90 2,3 |
| 2 | 0,10 | 2,10 | 0,18 | 180 4,7 |
| 3 | 0,15 | 2,05 | 0,27 | 270 7,0 |
| 4 | 0,20 | 2,00 | 0,36 | 360 9,3 |
| 5 | 0,25 | 1,95 | 0,45 | 450 11,6 |

Примечания: 1. Все пробирки и пипетки следует содержать сухими.

2. Сыворотка крови не должна иметь следов гемолиза.

3. Появление мути может быть вызвано только наличием воды в реактиве или в посуде.

4. Сыворотку нужно добавлять очень медленно, по стенке пробирки - только тогда получается чистое изумрудное окрашивание раствора. При быстром прилива ими сыворотки появляется примесь желтого цвета и в связи с этим возникают более высокие значения экстинкции.

5. Смесь необходимо термостатировать (как это рекомендует Ильк), а не оставлять при комнатной температуре на 20 мин. в противном случае могут получиться более низкие показатели оптической плотности.

Литература:

Колб В.Г., Камышников В.С. Справочник по клинической химии// Мн.: Беларусь, 1982. 367 с.

6.2.2 Метод определения холестерина по Abell

Принцип метода. Холестерин, как свободный, так и эфир несвязанный, экстрагируется петролейным эфиром. При взаимодействии с уксусным ангидридом, уксусной и серной кислотами (реактив Либермана - Бурхарда) холестерин в результате дегидрирования, сульфонирования и полимеризации превращается в окрашенный комплекс. Концентрацию полученного таким образом хромогена устанавливают по величине его оптической плотности. Поскольку развитие окраски со свободным холестерином идет более последовательно, чем с его эфирами, для повышения точности анализа применяют предварительный гидролиз эфиров холестерина до холестерина.

Реактивы. 1. Абсолютный этиловый спирт. Получают способом, описанным для определения холестерина по Ильку (см. предыдущий метод) и перегоняют.

2. Петролейный эфир после перегонки (фракция с температурой кипения +65-68 °С), можно также использовать фракции с более низкой температурой кипения (+40-60°С). Вместо петролейного эфира допустимо применение гексана.

3. Ледяная уксусная кислота.

4. Серная кислота для пробы Савая или х. ч.

5. Уксусный ангидрид.

6. Раствор КОН (10 г КОН растворяют в 20 мл дистиллированной воды).

7. Раствор спиртовой щелочи. Готовят непосредственно перед определением путем смешивания 6 мл раствора КОН (реактив 6) и 94 мл абсолютного этанола.

8. Стандартный раствор холестерина (10 мг/100 мл; 1,03 ммоль/л). Перед его приготовлением холестерин перекристаллизовывают 4 раза из абсолютного этилового спирта и высушивают до постоянного веса. 100 мг холестерина растворяют в 250 мл абсолютного этанола. Хранят при +4°С несколько месяцев.

9. Модифицированный реактив Либермана - Бурхарда. 20 объемных частей уксусного ангидрида, помещенного в стеклянную колбу, охлаждаются в ледяной бане до температуры ниже +10°С. Затем в колбу добавляют по каплям 1 объем концентрированной серной кислоты, смесь хорошо перемешивают и оставляют в ледяной бане на 10 мин. После этого в колбу доливают 10 объемных частей ледяной уксусной кислоты, содержимое опять хорошо перемешивают и нагревают до комнатной температуры. Реактив следует использовать в течение часа.

Ход определения состоит из следующих этапов: 1) гидролиз. 0,5 мл плазмы крови помещают в пробирку с хорошо притертой пробкой и туда же добав-

ляют 5 мл раствора спиртовой щелочи. Смесь встряхивают и ставят в водяную баню с температурой +37-40° на 55 мин;

2) экстракция. По окончании гидролиза пробу охлаждают до комнатной температуры, доливают 5 мл дистиллированной воды, снова охлаждают до комнатной температуры и добавляют 10 мл петролейного эфира. Пробу интенсивно встряхивают в течение 5 мин, а затем либо центрифугируют, либо оставляют стоять 10-15 мин для разделения фаз (на верхнюю, состоящую из петролейного эфира и содержащую ХС, и на нижнюю с водорастворимыми соединениями).

Из 10 мл петролейного экстракта для определения ХС берут 4 мл, а при использовании гиперхолестеринемической сыворотки - 2 мл. Эфир из взятых проб отгоняют на водяной бане при температуре +60-70 °С;

3) цветная реакция. К полученному сухому остатку доливают 5 мл реактива Либермана - Бурхарда, пробирку с пробой тщательно встряхивают и оставляют на 30-35 мин, после чего раствор колориметрируют или на спектрофотометре при длине волны 620 нм или на ФЭЖе с красным светофильтром;

4) расчет. При проведении каждой серии определений используют стандартный раствор холестерина. К 5 мл его добавляют 0,3 мл водного раствора КОН (реактив 6), затем проводят гидролиз и последующие процедуры так же, как для сыворотки крови.

Из 10 мл петролейного экстракта отбирают 1, 2, 3 мл (0,2, 0,4 и 0,6 мг ХС) для определения. Расчет производят следующим образом. Сначала находят оптическую плотность, соответствующую 1 мг холестерина (Ф):

$$\Phi = \frac{\text{Опт. плот. станд. раств.}}{\text{Колич. ХС в пробе в мг}}$$

Ошибка в величине Ф при исследовании трех стандартных проб не должна превышать 4 %. Дальнейший расчет содержания ХС осуществляют по формуле:

$$a \text{ ммоль/л} = \frac{\text{Опт. плот. пробы}}{\Phi} \cdot \frac{10}{4} \cdot \frac{2,6}{0,5},$$

где 10 -общий объем петролейного экстракта (мл); 4-объем петролейного экстракта (мл), взятый для определения; 0,5 -объем плазмы (мл), взятый для исследования; 2,6 - фактор пересчета на значение концентрации холестерина (ммоль/л).

Литература:

Колб В.Г., Камышников В.С. Справочник по клинической химии// Мн.: Беларусь, 1982. 367 с.

6.3 Методы определения свободного и эстерифицированного холестерина в сыворотке крови

Как для определения общего холестерина, так и для исследования его фракций используют экстракционные способы (непрямые) и методы без экстракции холестерина (прямые).

Непрямые способы включают в себя экстракцию общего холестерина, осаждение свободного холестерина и колориметрическое исследование свободного холестерина в осадке или эфиров холестерина в надосадочной жидкости.

Для экстракции холестерина из сыворотки крови рекомендуют различные органические жидкости и их смеси: этиловый спирт-диэтиловый эфир, ацетон-этиловый спирт, хлороформ, изопропиловый спирт и другие. В последнее время чаще применяют изопропиловый спирт (изопропанол), так как он в течение короткого времени и без нагревания полностью осаждает белки и разрушает связи липидов с белками. Кроме того, изопропиловый спирт является хорошим растворителем стандартного холестерина. Поэтому изопропиловый спирт наиболее часто используют для экстракции холестерина из сыворотки крови.

Свободный холестерин способен образовывать с дигитонином, томатином, пиридинсульфатом и другими веществами труднорастворимые соединения. Большинство авторов применяют для осаждения свободного холестерина водно-спиртовой или изопропаноловый раствор дигитонина.

К прямым относят кинетические и энзиматические методы. Принцип кинетических способов основан на том, что при температуре +55-65 °С хлорное железо вступает в реакцию и со свободным и с верифицированным холестерином, в то время как при +20°С хлорное железо в течение первых 2 ч реагирует только со свободным холестерином. Методы этой группы могут давать завышение результатов вследствие появления мутности в окрашенном растворе, поэтому они не нашли широкого применения.

Энзиматические способы базируются на окислении свободного холестерина до холестенона и перекиси водорода. Реакция катализируется ферментом холестериноксидазой. О содержании холестерина судят по интенсивности светопоглощения холестенона (при 240 нм) или перекиси водорода. Чаще определяют перекись водорода, которая под влиянием каталазы окисляет метанол до формальдегида, последний же дает цветную реакцию с ацетилацетоном. Методы этой группы характеризуются высокой специфичностью и чувствительностью, они технически просты, но требуют применения дефицитных и дорогостоящих реактивов.

Для колориметрического исследования фракций холестерина используют рассмотренные цветные реакции.

В настоящее время в лабораторной практике распространены непрямые способы определения свободного и эстерифицированного холестерина. Из них наиболее приемлемы те, в которых общий холестерин экстрагируют изопропиловым спиртом, а свободный холестерин осаждают дигитонином. Указанные методы более точны, но вместе с тем более трудоемки и менее воспроизводимы, чем прямые.

Литература:

Колб В.Г., Камышников В.С. Справочник по клинической химии// Мн.: Беларусь, 1982. 367 с.

6.3.1 Непрямой метод определения свободного и эстерифицированного холестерина в сыворотке крови по реакции Златкиса - Зака

Принцип. Общий холестерин экстрагируют изопропиловым спиртом. Свободный холестерин осаждают дигитонином и устанавливают в осадке по реакции Златкиса - Зака. Содержание эстерифицированного холестерина находят по разности уровней общего и свободного холестерина.

- Реактивы. 1. Изопропиловый спирт.
2. Уксусная кислота ледяная.
 3. Серная кислота концентрированная.
 4. Ортофосфорная кислота концентрированная.
 5. Основной раствор хлорного железа. 2,5 г хлорного железа ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) растворяют при нагревании на водяной бане в 80 мл ортофосфорной кислоты, охлаждают, объем доводят до 100 мл ортофосфорной кислотой.
 6. Рабочий раствор хлорного железа. 8 мл основного раствора хлорного железа осторожно смешивают с 80 мл серной кислоты, охлажденную смесь дополняют серной кислотой до объема 100 мл. Реактив стабилен, если хранить его в посуде из темного стекла при комнатной температуре в течение месяца.
 7. Раствор дигитонина. 1 г дигитонина растворяют при нагревании на водяной бане в 50 мл этилового спирта, охлажденный раствор доливают дистиллированной водой до 100 мл и фильтруют.
 8. Ацетон.
 9. Основной стандартный раствор холестерина. 40 мг холестерина растворяют в 100 мл изопропилового спирта, 1 мл раствора содержит 0,4 мг холестерина.
 10. Рабочий стандартный раствор холестерина. К 20 мл основного раствора добавляют изопропиловый спирт до объема 100 мл. 1 мл рабочего раствора содержит 0,08 мг холестерина. Хранят в посуде из темного стекла в холодильнике.

Ход определения. К 0,2 мл сыворотки доливают при постоянном встряхивании 4,8 мл изопропилового спирта. Содержимое пробирок тщательно перемешивают и оставляют стоять на 10 мин при комнатной температуре. Затем пробирки центрифугируют 5 мин и осторожно отсасывают надосадочную жидкость (экстракт). В экстракте определяют общий и свободный холестерин.

Для исследования общего холестерина проводят опытную пробу, К 1,0 мл экстракта добавляют 2,0 мл ледяной уксусной кислоты, содержимое пробирки перемешивают, затем приливают 2,0 мл раствора хлорного железа, смесь энергично встряхивают и оставляют стоять на 10-15 мин, после чего измеряют оптическую плотность пробы на ФЭКе в кювете с толщиной слоя 5 мм (длина волны 560 нм). Результаты сравнивают с аналогичными данными контрольной пробы. Контрольную пробу ставят так же, как опытную, но вместо экстракта берут 1,0 мл изопропилового спирта.

Для определения свободного холестерина также проводят опытную пробу. К 2,0 мл экстракта добавляют 1,0 мл раствора дигитонина, смесь оставляют в пробирках, закрытых пробками, на 30 мин, после чего центрифугируют 10 мин. Надосадочную жидкость осторожно отсасывают и убирают, к осадку приливают 3,0 мл ацетона и смесь вновь центрифугируют 5 мин. Надосадочную жидкость осторожно удаляют, а пробирки оставляют стоять открытыми в течение 5-10 мин для испарения остатков паров ацетона. В пробирку с осадком свободного холестерина добавляют 1,0 мл изопропилового спирта и 2,0 мл ледяной уксусной кислоты, все перемешивают и доливают 2,0 мл рабочего раствора хлорного железа, содержимое пробирок вновь энергично встряхивают (осадок

полностью растворяется из-за выделения тепла). Через 10-15 мин измеряют плотность опытных проб на ФЭКе при длине волны 560 нм. Результаты сравнивают с аналогичными данными контрольной пробы.

Контрольную пробу готовят следующим образом. Смешивают 1,0 мл изопропилового спирта и 2,0 мл ледяной уксусной кислоты. Добавляют 2,0 мл рабочего раствора хлорного железа, смесь энергично встряхивают и оставляют стоять на 10-15 мин.

Для приготовления стандартной пробы к 1,0 мл рабочего стандартного раствора доливают 2,0 мл ледяной уксусной кислоты, все перемешивают, добавляют 2,0 мл рабочего раствора хлорного железа, содержимое пробирки встряхивают и через 10-15 мин измеряют оптическую плотность раствора. Результаты сравнивают с аналогичными данными контрольной пробы.

Экстинкция стандартной пробы соответствует концентрации общего холестерина 200 мг/100 мл, свободного холестерина - 100 мг/100 мл (для установления уровня свободного холестерина берут в 2 раза больше экстракта).

Содержание общего холестерина рассчитывают по формуле:

$$\frac{E_{оп.}}{E_{ст.}} \cdot 200 = a \text{ мг/100 мл}, \frac{E_{оп.}}{E_{ст.}} \cdot 5,18 = a \text{ ммоль/л},$$

где a - концентрация общего холестерина в исследуемой пробе; 200 - коэффициент пересчета в размерность мг/100 мл; 5,18 - коэффициент перевода в единицы СИ.

Содержание свободного холестерина:

$$\frac{E_{оп.}}{E_{ст.}} \cdot 100 = a \text{ мг/100 мл}, \frac{E_{оп.}}{E_{ст.}} \cdot 2,59 = a \text{ ммоль/л},$$

где 100 - коэффициент пересчета в размерность мг/100 мл; a - концентрация свободного холестерина в исследуемой пробе; 2,59 - коэффициент перевода в единицы СИ.

Примечания: 1. Сыворотка должна быть свободной от гемолиза. 2. Повышенное содержание билирубина не влияет на результаты определения.

Литература:

Колб В.Г., Камышников В.С. Справочник по клинической химии// Мн.: Беларусь, 1982. 367 с.

6.3.2 Определение свободного и эстерифицированного холестерина в сыворотке крови прямым методом, основанным на реакции Либермана - Бурхарда

Принцип. Свободный холестерин осаждают дигитонином и устанавливают в осадке по реакции Либермана - Бурхарда.

Реактивы. 1. Холестериновый реактив. 5,55 г 2,5 - диметилбензолсульфокислоты растворяют в 100 мл ледяной уксусной кислоты. Смешивают 3 объема уксусного ангидрида, 1 объем раствора 2,5-диметилбензолсульфокислоты и 1 объем ледяной уксусной кислоты.

2. Раствор дигитонина в изопропиловом спирте. 250 мг дигитонина вносят в 50 мл изопропанола при подогревании содержимого колбы на водяной бане и после охлаждения доливают раствор изопропиловым спиртом до 100 мл.

3. Изопропиловый спирт.

4. Серная кислота концентрированная.

5. Стандартный раствор холестерина-дигитонина. 200 мг холестерина и 888 мг дигитонина растворяют в 80 мл уксусной кислоты в мерной колбе на 100 мл при нагревании ее на водяной бане. После охлаждения дополняют до метки уксусной кислотой.

6. Стандартный раствор для определения общего холестерина. 200 мг холестерина на 100 мл раствора уксусной кислоты. Стабилен, если содержать при комнатной температуре 6-7 дней.

Для исследования общего холестерина готовят опытную пробу. К 0,05 мл сыворотки добавляют 2,5 мл холестеринового реактива, пробирку помещают в водяную баню при температуре +25 °C на 5-10 мин. Затем в нее доливают 0,5 мл концентрированной серной кислоты и вновь ставят в ВОДЯНУЮ баню на 10 мин. Оптическую плотность пробы измеряют на ФЭЖе в кювете с толщиной слоя 5 мм (длина волны 560-590 нм). Результаты сравнивают с аналогичными данными контрольной пробы. Контрольную пробу ставят так же, как опытную, но вместо сыворотки берут 0,05 мл дистиллированной воды.

Стандартную пробу обрабатывают как опытную, но вместо сыворотки используют 0,05 мл стандартного раствора для общего холестерина.

Опытная проба для определения свободного холестерина. К 0,05 мл сыворотки добавляют 1,0 мл раствора дигитонина, смесь оставляют на 10 мин, затем центрифугируют 10 мин. Надосадочную жидкость тщательно отсасывают и выливают. К осадку прибавляют 3 мл холестеринового реактива, содержимое пробирки перемешивают и центрифугируют. К 2,5 мл надосадочной жидкости приливают 0,5 мл концентрированной серной кислоты, раствор помещают в водяную баню при +25 °C на 10 мин, после чего измеряют его плотность на ФЭЖе в кювете с толщиной слоя 5 мм (длина волны 560-590 нм). Результаты сравнивают с аналогичными данными контрольной пробы.

Для приготовления контрольной пробы на сыворотку к 0,05 мл сыворотки добавляют 1,0 мл изопропилового спирта, смесь оставляют на 10 мин, затем центрифугируют 10 мин. Надосадочную жидкость сливают, а осадок обрабатывают так же, как опытную пробу.

Для получения стандартной пробы к 0,05 мл дигитонин-холестеринового стандартного раствора приливают 3,0 мл холестеринового реактива, все тщательно перемешивают. К 2,5 мл смеси добавляют 0,5 мл концентрированной серной кислоты и обрабатывают так же, как опытную пробу. Контрольную пробу проводят аналогично стандартной, но вместо стандартного раствора берут 0,05 мл изопропилового спирта.

Расчет концентрации свободного холестерина (в мг на 100 мл) производят по формуле:

$$\frac{E_{оп.} - E_{к.пр.сыв.}}{E_{ст.}} \cdot 200,$$

где $E_{к. пр. сыв.}$ - экстинкция контрольной пробы на сыворотку; 200 - показатель концентрации холестерина стандартного раствора. В литературе нет общего мнения о колебании уровня свободного холестерина (даже в процентах от общего холестерина). По данным большинства авторов, свободный холестерин

составляет в среднем 30%, а эстерифицированный - 70% от общего холестерина.

Литература:

Колб В.Г., Камышников В.С. Справочник по клинической химии// Мн.: Беларусь, 1982. 367 с.

7 ИССЛЕДОВАНИЕ ПИГМЕНТНОГО ОБМЕНА

По данным современных исследований, срок жизни эритроцитов в среднем составляет 110-130 дней. По окончании этого периода они разрушаются в клетках ретикулоэндотелиальной системы костного мозга, печени, селезенки и некоторых других органов. Процессу распада подвергается и содержащийся в эритроцитах гемоглобин.

Вначале происходит разрыв метинового мостика между I и II пиррольными ядрами порфиринового кольца с одновременным окислением двухвалентного железа в трехвалентное. Образующийся таким образом пигмент зеленого цвета получил название вердоглобин (вердогемоглобин, холеглобин, псевдогемоглобин). Дальнейшие превращения приводят к потере вердоглобином железа и глобина, в результате чего порфириновое кольцо разворачивается в цепь и формируется желчный пигмент зеленого цвета - биливердин. Почти весь биливердин ферментативным путем восстанавливается в основной и важнейший красно-желтый пигмент желчи - билирубин, являющийся нормальной составной частью сыворотки крови. Этот свободный (несвязанный) билирубин (линейный тетрапиррол) в силу нерастворимости в воде не переходит в мочу и дает непрямую реакцию ван ден Берга (то есть реагирует с диазореактивом лишь после предварительного растворения в спирте). Следовательно, непрямой билирубин представляет собой свободный билирубин. Последний в клетках печени под влиянием фермента трансферазы связывается с глюкуроновой кислотой, что сообщает ему хорошую растворимость в воде. Благодаря этому связанный билирубин легко выделяется с мочой и реагирует с диазореактивом сразу же после прибавления его к сыворотке желтушных больных. Установлено, что связанный билирубин (прямой) представлен двумя пигментами: моно- и диглюкуронидом; последний составляет 75-80 % выделяемого желчью пигмента. Таким образом, билирубинглюкурониды - это прямой билирубин.

7.1 Методы определения билирубина в сыворотке крови

В настоящее время для определения билирубина в сыворотке крови используют:

I. Колориметрические диазометоды, основанные на образовании азобилирубина (красно-розового цвета) при добавлении к сыворотке диазофенилсульфоновой кислоты (и других диазосоединений). К ним относятся: 1. Метод ван ден Берга. 2. Способы с применением акселераторных веществ, обладающих свойством ускорять реакцию между непрямым билирубином и диазореактивом в водной среде путем повышения растворимости свободного билирубина или каталитическим способом. В качестве акселераторов используют: метиловый спирт, кофеин и бензоат натрия, кофеин и мочевины, бензоат натрия и мочевины, ацетамид (дифилин), уксусную кислоту.

II. Спектрофотометрические методы, базирующиеся на том, что общий билирубин дает характерную абсорбционную зону при 450- 460 нм.

III. Хроматографические методы.

IV. Способы, основанные на распределении фракций билирубина в различных растворителях.

V. Флюориметрические и другие методы.

Большинство колориметрических способов определения билирубина базируется на реакции ван ден Берга. Она протекает в две стадии. Вначале под воздействием соляной кислоты разрывается тетрапирроловая цепь и образуются два дипиррола. Затем два дипирроловых производных диазотируются диазофенилсульфоновой кислотой с превращением их в азобилирубин.

Оригинальным методом ван ден Берга устанавливают лишь характер реакции (прямая, непрямая, замедленная), то есть отмечают преобладание в сыворотке крови того или иного билирубина.

Метод Йендрашика, Клеггорна и Грофа дает возможность фракционно устанавливать содержание билирубина. Он прост, удобен, не связан с применением дефицитных реактивов и является наиболее приемлемым для практических лабораторий.

Йендрашик с соавт. указывают, что для исследования билирубина в сыворотке крови существуют нейтральные, щелочные и кислотнo-щелочные азометоды. Наиболее чувствительны модификации способа с определением на конечном этапе кислого или щелочного азопигмента. Кислый азозеленый, образующийся при рН 0,8 обладает гораздо более высоким коэффициентом молярной экстинкции по сравнению с таковым розового азопигмента. Однако в кислой среде очень часто наблюдается появление мутности.

Типичный азобилирубин появляется только в слабокислой или в нейтральной среде. В сильнокислой же или щелочной среде ход реакции иной. Поэтому нельзя утверждать, что при щелочном или кислом рН полученный продукт идентичен азобилирубину.

В щелочной среде розовый азопигмент превращается в стабильный продукт зеленого цвета, интенсивность окраски которого измеряется при длине волны 600-610 нм. В этой зоне спектра желтые, красные и коричневые пигменты имеют крайне незначительную абсорбцию, что в большой степени повышает специфичность метода. Йендрашик с соавт. предпочитают щелочной способ кисломu также потому, что при его использовании удается избежать осаждения белков. Считается, что во многих случаях весьма удобным является упрощенный нейтральный метод определения билирубина в сыворотке крови с колориметрией при длине волны 530 нм. Однако при этом необходимо учитывать низкую чувствительность диазореакции, которая к тому же может не давать стойких величин абсорбции; при постановке способа очень важно следить за рН среды. Пробы могут давать помутнение (особенно в диапазоне рН 3,5-6,0 - кислая среда), зависящее от белков сыворотки.

Разделение билирубина на фракции (ди-, моноглюкуроныды) методом хроматографии или с применением органических растворителей позволяет подойти к более глубокой оценке процессов, происходящих в печени. Однако сложность технического исполнения указанных способов затрудняет распространение их в клинической практике.

Определение рекомендуется осуществлять сразу же после забора проб, чтобы избежать окисления билирубина на свету. Гемолиз сыворотки снижает количество билирубина пропорционально присутствию гемоглобина. Следовательно, сыворотка крови не должна быть гемолизирована.

Для избежания ошибки, связанной с появлением мутности, рекомендуется ставить контрольные пробы на каждую сыворотку.

В качестве унифицированного метода для определения билирубина и его фракций в сыворотке крови предложен способ Йендрашика, Клеггорна и Грофа с измерением оптической плотности азопигмента в нейтральной или слабокислотной среде при зеленом светофилт্রে (530 нм).

Методом выбора может служить щелочной способ с измерением оптической плотности зеленого (или синего) азопигмента при красном светофилт্রে (600-610 нм).

Отечественной промышленностью освоено широкое производство наборов для определения билирубина в сыворотке крови по методу Йендрашика, Клеггорна, Грофа.

На окраску билирубина оказывает существенное влияние наличие белка в пробе, поэтому все стандартные растворы билирубина должны содержать белок. Правда, в поддержании постоянной концентрации белка нет особой необходимости, поскольку окраска азобилирубина не меняется даже при 50-кратном разведении белка. Цвет азобилирубина в белковых растворах оказывается интенсивнее, чем окраска билирубина в слабых щелочных растворах. Вот почему способы приготовления стандартных проб билирубина на белковых растворах являются наиболее правильными. К ним относится получение билирубинового стандартного раствора в буферированной сыворотке человека по Шеллонгу и Венде.

Фирма «Лахема» выпускает готовые наборы реактивов, предназначенные для определения билирубина («Билирубин») и построения калибровочной кривой («Билирубин-эталон»). Последние содержат препараты лиофилизированного билирубина и альбумина.

Наиболее высокой чувствительностью обладает флюориметрический способ исследования билирубина.

Литература:

Колб В.Г., Камышников В.С. Справочник по клинической химии// Мн.: Беларусь, 1982. 367 с.

7.1.1 Определение содержания билирубина и его фракций в сыворотке крови колориметрическим диазометодом (по Йендрашику, Клеггорну, Грофу)

Принцип. При взаимодействии сульфаниловой кислоты с азотистокислым натрием образуется диазофенилсульфоновая кислота, которая, реагируя со связанным билирубином сыворотки, дает розово-фиолетовое окрашивание. По интенсивности его судят о концентрации билирубина, вступающего в прямую реакцию. При добавлении к сыворотке крови кофеинового реактива несвязанный билирубин переходит в растворимое диссоциированное состояние, благодаря чему он также вызывает розово-фиолетовое окрашивание раствора со смесью диазореактивов. По интенсивности последнего фотоколориметрически определяют концентрацию общего билирубина. По разнице между общим и связанным билирубином находят содержание несвязанного билирубина, дающего непрямую реакцию.

Реактивы. 1. Кофеиновый реактив. 5 г чистого кофеина, 7,5 г бензойно-кислого натрия (C_6H_5COONa), 12,5 г кристаллического уксуснокислого натрия (CH_3COONa) растворяют в 90 мл дистиллированной воды, нагревают содержимое колбы до $+ 50-60^\circ C$ и хорошо перемешивают. После охлаждения доводят дистиллированной водой до 100 мл (некоторые авторы рекомендуют доводить объем до 200 мл или до 1 л). Раствор годен в течение двух недель.

2. Физиологический раствор (раствор $NaCl$, 9 г/л).

3. Диазосмесь: а) диазореактив I. 5 г сульфаниловой кислоты растворяют при подогревании в 300-400 мл дистиллированной воды, прибавляют 15 мл концентрированной соляной кислоты (плотность 1,19 кг/л). Если часть сульфаниловой кислоты остается в осадке, колбу помещают в теплую воду и ее содержимое помешивают. Только после полного растворения сульфаниловой кислоты и охлаждения раствора объем колбы доводят дистиллированной водой до 1 л. Реактив стойкий, хранится в посуде из темного стекла; б) диазореактив II. Раствор азотистокислого натрия ($NaNO_2$, 0,5 г/100 мл). Реактив нестойкий, содержится в склянке темного стекла около 2-3 недель. Первый признак его непригодности - появление желтого оттенка.

Перед работой смешивают 10 мл диазореактива I и 0,3 мл диазореактива II.

Ход определения. В три пробирки (для определения общего билирубина, связанного билирубина и постановки контрольной реакции на цвет сыворотки) вводят реактивы согласно схеме (табл. 5).

Табл. 5 Данные для определения билирубина в сыворотке крови

| Реактив | Общий билирубин | Связанный билирубин | Контрольная проба |
|-------------------------|-----------------|---------------------|-------------------|
| Сыворотка | 0,50 | 0,50 | 0,50 |
| Кофеиновый реактив | 1,75 | — | 1,75 |
| Физиологический раствор | — | 1,75 | 0,25 |
| Диазосмесь | 0,25 | 0,25 | — |

При определении общего билирубина пробу для развития окраски оставляют стоять на 20 мин. При дальнейшем стоянии пробы окраска не изменяется.

Для исследования связанного билирубина колориметрирование осуществляют спустя 5-10 мин после добавления диазосмеси, так как при длительном стоянии пробы в реакцию вступает свободный билирубин.

Контрольную пробу на мутность сыворотки ставят для каждой опытной пробы.

Колориметрируют растворы на фотоэлектроколориметре при зеленом светофильтре (длина волны 500-560 нм) в кювете с шириной слоя 5 мм.

Расчет производят по калибровочному графику. Находят содержание общего и связанного билирубина в мкмоль/л. Для определения уровня несвязанного (свободного) билирубина из цифры общего его содержания вычитают показатель связанного билирубина (прямого).

Литература:

Колб В.Г., Камышников В.С. Справочник по клинической химии// Мн.: Беларусь, 1982. 367 с.

7.1.2 Определение билирубина в малом объеме сыворотки крови

При выявлении гипербилирубинемии можно применять микрометод в модификации Т. Б. Доброседовой и А. С. Циркиной.

Количество сыворотки, необходимое для исследования общего, связанного и свободного билирубина, составляет 0,4 мл. Сыворотку разводят равным объемом физиологического раствора. Дальнейшее определение проводят согласно схеме (табл. 6).

Табл. 6. Данные для определения билирубина в малом объеме сыворотки крови

| Реактивы | Общий билирубин | Билирубин связанный | Контрольная проба |
|--|-----------------|---------------------|-------------------|
| Сыворотка, разведенная физиологическим раствором 1:1 | 0,25 | 0,25 | 0,25 |
| Кофеиновый реактив | 2,00 | — | 2,00 |
| Физиологический раствор | — | 2,00 | 0,25 |
| Диазосмесь | 0,25 | 0,25 | — |
| Итого | 2,50 | 2,50 | 2,50 |

Колориметрию и расчет производят так же, как это рекомендуется в унифицированном методе; поскольку сыворотки взято в опыт 0,125 мл, полученный результат умножают на 4 (при учете разведения).

Примечание. Реактивы готовят так же, как и в унифицированном методе Йендрашика, Клеггорна. Грофа.

В связи с тем что билирубин сыворотки крови обладает характерной зоной светопоглощения в области 450 нм, в последние годы были предложены прямые фотометрические методы его определения. Их использование особенно важно в практике экспресс-анализа гипербилирубинемий. Л. Г. Чеховской и А. С. Циркиной был предложен Колориметрический экспресс-метод без применения каких-либо реактивов, состоящий в установлении содержания билирубина путем фотометрии проб на ФЭКе с синим светофильтром (длина волны 450 нм является оптимальной). Этот способ может быть эффективен для быстрой ориентировочной оценки уровня билирубина в сыворотке крови при массовых обследованиях.

Nefel (1978), исследовав визуально 1691 сыворотку, нашел, что вначале необходимо провести тщательную визуальную оценку сыворотки и что количественно билирубин следует определять только в иктеричных сыворотках.

Для полуколичественного установления билирубина в сыворотке крови Schyffz разработал «Bilur Test» (Германия). В основе его лежит цветная реакция взаимодействия билирубина с диазониевой солью 2,6-дихлор-бензол-флюоборатдиазония. Через 1 мин после пропитывания полоски сывороткой появляющуюся окраску сравнивают с приданной цветной шкалой. С помощью этих полосок можно быстро ориентироваться в степени гипербилирубинемии.

Построение калибровочной кривой для определения билирубина сыворотки крови

ви

1. Метод Шеллонга и Венде (1960) с использованием стабилизирующего свойства белка сыворотки крови.

Реактивы для построения калибровочной кривой. 1. 15 мл свежей негемолизированной сыворотки.

2. Основной стандартный раствор билирубина. В колбе емкостью 50 мл растворяют 40 мг билирубина (имеющийся в продаже билирубин реагирует непрямо) в 30-35 мл 0,1 моль/л раствора углекислого натрия (10,6 г безводного Na_2CO_3 доводят до 1 л дистиллированной водой). Содержимое колбы хорошо взбалтывают, не допуская образования пузырьков, доводят до метки 0,1 моль/л раствором Na_2CO_3 и все несколько раз перемешивают. Полученный раствор (80 мг/100 мл) стоек в течение 10 мин от начала приготовления. В дальнейшем происходит окисление билирубина.

3. Рабочий раствор билирубина. К 7 мл свежей негемолизированной сыворотки доливают 1,0 мл свежеприготовленного раствора билирубина (80 мг/100 мл или 1370 мкмоль/л) и 0,05 мл (1 каплю) 4 н раствора уксусной кислоты (22,6 мл ледяной уксусной кислоты доводят до 100 мл дистиллированной водой). Все тщательно перемешивают. При этом выделяются пузырьки углекислого газа. Рабочий раствор стоек в холодильнике не более суток. Он содержит точно на 10 мг/100 мл (171 мкмоль/л) билирубина больше, чем в сыворотке, взятой для приготовления раствора. Чтобы исключить при расчете количество билирубина, содержащееся в этой сыворотке, в процессе стандартизации пользуются соответствующей компенсационной жидкостью.

Для приготовления компенсационной жидкости смешивают 7 мл той сыворотки, которую использовали для получения рабочего стандартного раствора билирубина, 1,0 мл 0,1 моль/л раствора Na_2CO_3 и 0,05 мл (1 каплю) 4 н раствора уксусной кислоты.

Для построения калибровочных кривых обычно делают 5-6 разведений с различным содержанием билирубина (табл. 7).

Табл. 7 Данные для построения калибровочной кривой по методу Шеллонга и Венде

| № пробирок | Рабочий раствор билирубина (мл) | Физиологический раствор (мл) | Количество билирубина (мг) в пробе (0,5 мл) | Концентрация билирубина (мг/100 мл. мкмоль/л) | |
|------------|---------------------------------|------------------------------|---|---|----|
| 1 | 0,05 | 0,45 | 0,005 | 1 | 17 |
| 2 | 0,10 | 0,40 | 0,010 | 2 | 34 |
| 3 | 0,15 | 0,35 | 0,015 | 3 | 51 |
| 4 | 0,20 | 0,30 | 0,020 | 4 | 68 |
| 5 | 0,25 | 0,25 | 0,025 | 5 | 85 |

Стандартные пробы (0,5 мл) обрабатывают параллельно, по вышеописанному методу, причем пробы одинаковой концентрации исследуют 4-5 раз. Из данных всех определений выводят среднее значение экстинкции для рабочего раствора билирубина какой-либо одной концентрации.

При построении калибровочного графика к каждой пробе добавляют по 1,75 мл кофеинового реактива, так как в качестве стандартного используют свободный билирубин. Контролем служит компенсационная жидкость, из кото-

рой готовят разведения аналогично стандартным пробам, то есть берут 0,05; 0,10; 0,15; 0,20; 0,25 мл ее и доводят физиологическим раствором до объема 0,5 мл. Далее контрольные пробы обрабатывают так же, как опытные (или стандартные) пробы.

Калибровочную кривую строят, откладывая на оси ординат разность оптических плотностей опытных и контрольных проб, а на оси абсцисс - соответствующие цифры концентрации билирубина в мкмоль/л.

Литература:

Колб В.Г., Камышников В.С. Справочник по клинической химии// Мн.: Беларусь, 1982. 367 с.

7.1.3 Ультрамикрометод определения билирубина в капиллярной крови (по Rote)

Кровь берут в микрогематокритную трубку, обработанную гепарином, и центрифугируют. Трубку разламывают в том месте, где находится граница между эритроцитами и плазмой, и плазму отсасывают. Для проведения анализа 0,01 мл плазмы добавляют к 0,04 мл 4 г/100 мл раствора сывороточного альбумина, смешивают с 0,6 мл 85 г/100 мл H_3PO_4 . После инкубации пробы при 0°C в течение 3 мин к ней добавляют 3 мл воды и не позднее чем через 15 мин измеряют флюоресценцию с длимой волны возбуждения 420 нм и длиной волны эмиссии 480 нм. Установлено, что при тщательной работе можно избежать ошибочного занижения результатов, вызываемого гемолизом проб.

Литература:

Колб В.Г., Камышников В.С. Справочник по клинической химии// Мн.: Беларусь, 1982. 367 с.

8 ИССЛЕДОВАНИЕ МИНЕРАЛЬНЫХ ВЕЩЕСТВ КРОВИ

В диагностических целях очень важно определять в различных биологических жидкостях электролиты (катионы, анионы). Среди макроэлементов особого внимания заслуживает исследование содержания натрия и калия в эритроцитах и плазме крови. Для исследования концентрации этих электролитов используют:

1. Химические методы: а) определение натрия гравиметрическим, титриметрическим, колориметрическим способами; б) установление калия комплексонометрическим титрованием, колориметрическим и другими методами.

2. Пламенная спектрофотометрия: а) атомно-эмиссионная, б) атомно-абсорбционная.

3. Рентгеновская спектроскопия.

4. Нейтронно-активационный анализ.

5. Потенциометрическое определение.

6. Пламенная фотометрия.

Химические методы определения натрия, основанные на осаждении его сложной тройной солью уранилмарганцанатрияацетата или уранилмагниянатрияацетата, трудоемки и неточны.

Большинство химических способов исследования калия чаще всего базируется на образовании сложных комплексных солей калия. Калий в основном осаждают в форме: 1) кобальтинитрита, из которого затем выделяют кобальтат. Последний титруют с помощью комплексона (двунатриевой соли этилендиаминтетраацетата) в присутствии мурексида; 2) купрогексанитрита - о содержании калия судят по количеству связанного нитрита.

Наиболее надежными из химических методов определения калия в биологических жидкостях являются методы комплексонометрического титрования.

Метод атомно-эмиссионной спектрофотометрии основан на испускании света атомами под действием высокой температуры.

Способ атомно-абсорбционной спектрофотометрии базируется на поглощении света атомами исследуемого элемента.

Все эти способы определения калия требуют применения дорогой аппаратуры.

Методы рентгеновской спектроскопии, нейтронноактивационный анализ отличаются простотой техники и более высокой чувствительностью, чем другие, однако они не получили широкого распространения из-за необходимости использования очень высокой температуры.

Для потенциометрического определения калия и натрия отечественной промышленностью в последнее время освоен выпуск иономеров.

8.1 Исследование электролитов в крови и моче методом пламенной фотометрии

Метод пламенной фотометрии основан на способности элементов возбуждаться и испускать лучи света определенной длины волны при сжигании солей минеральных веществ в пламени. Излучения различных элементов выде-

ляют посредством специальных светофильтров. Попадая на фотоэлемент, световой поток возбуждает фототок, который регистрируют гальванометром.

Пламенная фотометрия характеризуется высокой точностью, чувствительностью, быстротой (если химические методы осуществляются в течение 1,5 ч, то пламенная фотометрия - всего за 10 мин), надежностью, простотой определения, что очень важно при массовых обследованиях. Особое преимущество рассматриваемого метода заключается в том, что для реакции требуется минимальное количество исследуемого материала, которое может быть недостаточным для определения химическими методами.

Поэтому в качестве унифицированных для определения натрия и калия в биологических жидкостях предлагаются методы пламенной фотометрии (с построением калибровочных кривых). В низкотемпературном пламени ($+1200^{\circ}\text{C}$: смесь светильный газ-воздух) практически возбуждаются лишь атомы щелочных и щелочноземельных металлов. В высокотемпературном пламени ($4-2300^{\circ}\text{C}$: смесь ацетилен-кислород воздуха; $+2500-2700^{\circ}\text{C}$: водород-кислород и $+3000-3500^{\circ}\text{C}$: ацетилен-кислород) возбуждаются также атомы ряда тяжелых металлов.

Определение концентрации исследуемого элемента можно осуществлять двумя способами: непосредственным - по данным измерения абсолютной интенсивности излучения или же по методу внутреннего стандарта, в котором излучение исследуемого элемента сравнивают с излучением другого элемента, добавляемого к пробе в определенной концентрации и служащего внутренним стандартом (элементом для сравнения).

Применение метода внутреннего стандарта до некоторой степени уменьшает величину погрешностей, вызываемых различием состава анализируемого и стандартного растворов, изменением режима сгорания аэрозоля. Во все пробы и в калибровочные растворы вводят всегда одинаковое количество родственного элемента (элемента для сравнения)-лития. При построении калибровочных графиков на оси ординат откладывают не показания прибора по исследуемому катиону, а отношение показаний по этому элементу к показанию по литию; на ось абсцисс наносят значения концентрации изучаемого катиона (натрия или калия). Определение методом внутреннего стандарта можно проводить только на приборах, имеющих светофильтр для лития.

8.1.1 Определение электролитов в крови и моче методом пламенной фотометрии

Исследование ионов K и Na в цельной крови не может служить достаточно достоверным показателем минерального обмена, так как сдвиги, происходящие в содержании электролитов в форменных элементах и в сыворотке крови, часто идут в противоположных направлениях. В связи с этим для постановки анализа более правильно определять концентрацию электролитов в плазме крови.

Как известно, концентрация калия в эритроцитах значительно превышает таковую в плазме крови. Поэтому калий выходит из эритроцитов даже через неповрежденную оболочку. Исходя из этого определять уровень калия в плазме нужно не позже $\frac{3}{4}$ -1 ч после взятия у обследуемого крови. Содержание калия и

натрия в эритроцитах можно исследовать двумя способами - прямым и косвенным.

При косвенном вычисляют разницу между содержанием электролитов в цельной крови и плазме. Предпочтительнее электролиты определять непосредственно в эритроцитах (прямым путем).

Подготовка биологического материала к анализу. Установление интересующих компонентов проводят в разведенных водных растворах плазмы крови и отцентрифугированной суточной моче. При этом допустимо применять следующие разведения: для определения в крови натрия - 1 : 100; калия - 1 : 10, 1 : 20 и 1 : 100; кальция - 1:10 или 1:20; уровня натрия и калия в моче - 1:200. Спинномозговую жидкость, экссудаты, трансудаты разводят так же, как плазму. Желудочный сок разбавляют дистиллированной водой в 50 раз и затем делают разведения, как и при анализе плазмы крови.

При определении электролитов в эритроцитах в качестве антикоагулянта обычно применяют гепарин, добавляемый из расчета 1 капля (0,02 мг) на 5-10 мл крови; можно также распылять мелкодисперсный порошок щавелевокислого аммония (оксалата аммония) на стенках центрифужной пробирки.

Гепаринизированную кровь центрифугируют, отделяют плазму, эритроциты гемолизируют и используют для анализа.

Существует много модификаций, касающихся режимов центрифугирования и способов гемолиза эритроцитов. Последние вызывают различными методами: 1) дистиллированной водой; 2) раствором уксусной кислоты с последующим разведением дистиллированной водой; 3) замораживанием в холодильнике с быстрым размораживанием. После двух замораживаний наступает полный гемолиз.

В зависимости от времени и скорости центрифугирования концентрация ионов калия и натрия в эритроцитах меняется в широких пределах: для калия - от 76,8 (нижние границы) до 205,3 ммоль/л (верхние границы); для натрия - от 11,3 до 34,8 ммоль/л.

Центрифугирование необходимо проводить в строго определенных условиях (количество оборотов в минуту, продолжительность процесса). Оптимальный режим-центрифугирование в течение 15 мин при 3000 об/мин; затем плазму с верхним слоем эритроцитов отсасывают и осуществляют вторичное центрифугирование на протяжении 30 мин при 3000 об/мин.

Следует заметить, что рекомендации относительно режима центрифугирования зачастую не могут быть использованы из-за указания не величины фактора разделения, а скорости вращения ротора центрифуги. Данное обстоятельство усугубляется и тем, что в лабораториях, как правило, отсутствует постоянный тахометрический контроль за режимом работы центрифуг.

Для выбора оптимального режима центрифугирования крови можно рекомендовать простой методический прием, апробированный в лаборатории биохимии Харьковского НИИ общей и неотложной хирургии В. И. Губским и В. И. Проценко. Сущность его состоит в построении графика зависимости концентрации электролитов в эритроцитах от частоты вращения ротора центрифуги при постоянной экспозиции, равной 30 мин. Оказалось, что частота враще-

ния ротора центрифуги, достаточная для максимально полного отделения плазмы и получения стабильных результатов при определении натрия, должна быть не менее 4000 об/мин.

Для измерения концентрации калия в эритроцитах режим центрифугирования не должен превышать 5000 об/мин, поскольку при больших скоростях вращения регистрируется снижение эритроцитарного содержания калия.

После первичного отделения эритроцитов удается установить для каждой центрифуги режим работы, достаточный для окончательного отделения эритроцитов от плазмы, и одновременно избежать разрушения клеток. Работа на выявленном плато позволяет получить стабильные результаты и предотвратить ошибки, обусловленные недостаточной обработкой крови.

Эритроциты гемолизируют дистиллированной водой и разводят для исследования натрия 1:26, калия - 1:260.

Приготовление стандартных растворов для определения электролитов. Основные стандартные растворы получают из дважды перекристаллизованных химически чистых солей хлористого натрия, хлористого калия и углекислого кальция, высушенных до постоянного веса (NaCl можно прокалить и охладить в эксикаторе).

Стандартные растворы готовят исходя из используемого разведения биологической жидкости. Для компенсации ионного воздействия в стандартные растворы для калия добавляют натрий. Указанные растворы для натрия однокомпонентны, так как содержание калия и кальция после разведения практически не влияет на результаты исследования.

Приготовление основных стандартных растворов: 1) раствор соли натрия - 1 г/л. 2,5418 г хлористого натрия х. ч., высушенного до постоянного веса, вносят в мерную колбу емкостью 1000 мл, растворяют и доводят до метки дистиллированной водой. 1 мл раствора содержит 1 мг натрия;

2) раствор соли калия - 1 г/л. 1,9069 г хлористого калия х. ч., высушенного до постоянного веса, помещают в мерную колбу емкостью 1000 мл, растворяют и доливают до метки дистиллированной водой. 1 мл раствора содержит 1 мг калия;

3) раствор соли кальция - 1 г/л. 2,4970 г углекислого кальция х. ч., высушенного при t 100-120° С до постоянного веса, растворяют в 50 мл 1 н раствора соляной кислоты и доводят дистиллированной водой до 1000 мл в мерной колбе. 1 мл этого раствора содержит 1 мг кальция.

Рабочие стандартные растворы для определения калия в плазме крови готовят, беря за основу средний уровень калия (18 мг/ 100 мл; 4,62 ммоль/л) и натрия в плазме (310 мг/100 мл; 134,8 ммоль/л), а также используя разведение плазмы (1:20). В 5 мерных колб емкостью 100 мл вносят соответственно 0,6; 0,8; 1,0; 1,2; 1,4 мл раствора калия, а затем в каждую из них добавляют по 16,5 мл основного стандартного раствора хлористого натрия и указанное в табл. 8 количество раствора углекислого кальция.

Рабочие стандартные растворы для определения натрия в плазме крови готовят, учитывая применяемое разведение плазмы (1:100) и средний уровень в ней натрия (134,8 ммоль/л). В 7 мерных колб емкостью 100 мл вносят соответ-

ственно 2,6; 2,8; 3,0; 3,4; 3,8; 4,0; 4,2 мл раствора натрия и доводят объем до метки дистиллированной водой (табл. 9).

Однокомпонентный характер рабочих стандартных растворов натрия объясняется тем, что в плазме крови калия и кальция содержится значительно меньше, чем натрия, и их присутствие практически не влияет на результаты исследования.

Приготовление рабочих стандартных растворов для установления калия и натрия в эритроцитах показано в табл. 10, 11.

Табл. 8 Данные к приготовлению рабочих стандартных растворов для определения калия в плазме крови

| Основные стандартные растворы (мл) | | | Дистиллированная вода до 100 мл | Концентрация | | | | | |
|------------------------------------|------|-------------------|---------------------------------|--|----|--------------------------------|--|----|-----|
| КС1 | NaCl | CaCO ₃ | | калия | | | кальция | | |
| | | | в рабочем растворе (мг/100 мл) | в плазме с учетом разведения 1:20 (мг/100 мл, ммоль/л) | | в рабочем растворе (мг/100 мл) | в плазме с учетом разведения 1:20 (мг/100 мл, ммоль/л) | | |
| 0,6 | 16,5 | 0,2 | 82,7 | 0,6 | 12 | 3,07 | 0,2 | 4 | 1,0 |
| 0,8 | 16,5 | 0,4 | 82,3 | 0,8 | 16 | 4,10 | 0,4 | 8 | 2,0 |
| 1,0 | 16,5 | 0,5 | 82,0 | 1,0 | 20 | 5,12 | 0,5 | 10 | 2,5 |
| 1,2 | 16,5 | 0,6 | 81,7 | 1,2 | 24 | 6,15 | 0,6 | 12 | 3,0 |
| 1,4 | 16,5 | 0,8 | 81,3 | 1,4 | 28 | 7,17 | 0,8 | 16 | 4,0 |

Примечание. Стандартные растворы электролитов желательно содержать в полиэтиленовой посуде (бутылях, стаканчиках).

Табл. 9 Данные к приготовлению рабочих стандартных растворов для определения натрия в плазме крови

| Основной стандартный раствор NaCl (мл) | Дистиллированная вода (мл) | Концентрация натрия | | |
|--|----------------------------|------------------------------------|---|-------|
| | | в стандартном растворе (мг/100 мл) | с учетом разведения плазмы в 100 раз (мг/100 мл, ммоль/л) | |
| 2,6 | 97,4 | 2,6 | 260 | 113,1 |
| 2,8 | 97,2 | 2,8 | 280 | 121,8 |
| 3,0 | 97,0 | 3,0 | 300 | 130,5 |
| 3,4 | 96,6 | 3,4 | 340 | 147,9 |
| 3,8 | 96,2 | 3,8 | 380 | 165,3 |
| 4,0 | 96,0 | 4,0 | 400 | 174,0 |
| 4,2 | 95,8 | 4,2 | 420 | 182,6 |

Табл. 10 Данные к приготовлению рабочих стандартных растворов для определения калия в эритроцитах

| Основной стандартный раствор (мл) | Дистиллированная вода (до 100 мл) | Концентрация калия | | |
|-----------------------------------|-----------------------------------|------------------------------------|--|-------|
| | | в стандартном растворе (мг/100 мл) | с учетом разведения эритроцитов 1 : 260 (мг/100 мл, ммоль/л) | |
| 1,1 | 98,9 | 1,1 | 286 | 73,2 |
| 1,2 | 98,8 | 1,2 | 312 | 79,8 |
| 1,3 | 98,7 | 1,3 | 338 | 86,5 |
| 1,4 | 98,6 | 1,4 | 354 | 90,8 |
| 1,5 | 98,5 | 1,5 | 390 | 100,0 |
| 1,6 | 98,4 | 1,6 | 416 | 106,1 |

Табл. 11 Данные к приготовлению рабочих стандартных растворов для определения натрия в эритроцитах

| Основной стандартный раствор NaCl (мл) | Основной стандартный раствор KCl (мл) | Дистиллированная вода до 100 мл | Концентрация натрия | | |
|--|---------------------------------------|---------------------------------|------------------------------------|---|------|
| | | | в стандартном растворе (мг/100 мл) | с учетом разведения эритроцитов 1 : 26 (мг/100 мл, ммоль/л) | |
| 0,4 | 14 | 85,6 | 0,4 | 10,4 | 4,5 |
| 0,5 | 14 | 85,5 | 0,5 | 13,0 | 5,6 |
| 1,0 | 14 | 85,0 | 1,0 | 26,0 | 11,3 |
| 1,5 | 14 | 84,5 | 1,5 | 39,0 | 16,9 |
| 2,0 | 14 | 84,0 | 2,0 | 52,0 | 22,6 |
| 2,5 | 14 | 83,5 | 2,5 | 65,0 | 28,3 |

Для повседневного построения калибровочных кривых с учетом разных биологических жидкостей требуется много времени и определенных навыков. Это неудобно при проведении срочных анализов в плазме, эритроцитах, моче, диализате и т. д.

В. Г. Баринов (1973) предложил упрощенный вариант калибровки пламенного фотометра. Метод заключается в следующем.

Ход исследования. Для каждой из биологических жидкостей (плазмы, эритроцитов, мочи) готовят основные и рабочие стандартные растворы по общепринятым способам. Аппарат настраивают на стандартный режим, поочередно пропускают рабочие растворы для определения калия и натрия в плазме, эритроцитах и моче. Однократно строят кривые для перечисленных жидкостей. Эти кривые взаимно контролируют друг друга и отражают настройку аппарата, что дает возможность в дальнейшем отказаться от выведения повседневных кривых для каждого биологического субстрата отдельно и пользоваться только стандартным раствором для плазмы. Таким образом, чтобы исследовать электролиты в плазме, эритроцитах и моче, достаточно осуществить юстировку аппарата по стандартному раствору для плазмы, после чего произвести определение солей в соответствующей биологической жидкости.

Поскольку содержание калия в эритроцитах намного выше, чем в плазме, исследуемая плазма (сыворотка) не должна иметь даже следов гемолиза. При этом сыворотку выделяют не позже чем через 2 ч после взятия крови.

Литература:

Колб В.Г., Камышников В.С. Справочник по клинической химии// Мн.: Беларусь, 1982. 367 с.

8.2 Методы определения кальция в сыворотке крови

Кальций сыворотки крови находится в формах: 1) свободного ионизированного кальция; 2) связанного с белками, недиффундирующего кальция; 3) кальция недиссоциированного, но способного к диффузии через полупроницаемые мембраны.

Эритроциты содержат приблизительно 0,5 ммоль/л Са, лейкоциты - около 2,5 ммоль/л, сыворотка - 4,5-6,0 ммоль/л, цельная кровь - 2,5-3,5 ммоль/л. Диагностическое значение имеет определение кальция только в плазме (сыворотке), где его концентрация более постоянна.

Химические методы исследования общего кальция в сыворотке крови можно разделить на две большие группы: прямые и непрямые, состоящие в предварительном осаждении кальция в виде труднорастворимых в воде соединений.

Большинство применявшихся ранее методов определения общего кальция в крови основывалось на выделении его оксалатом аммония в форме щавелевокислой соли, а также на осаждении кальция пикролоновой, хлоранилиновой кислотами (либо пикролонатом, хлоранилатом) с последующим исследованием осадка гравиметрическим, колориметрическим или чаще всего титриметрическим (например, перманганатометрическим) способами. Методы этой группы отличаются плохой воспроизводимостью результатов, большой трудоемкостью, многочисленными источниками ошибок, обусловленных необходимостью многократного промывания осадка, его высушивания, прокаливания, растворения в минеральных кислотах и т. д.

В этой связи несравненно больший интерес представляют прямые методы определения общего кальция: колориметрические (с глиоксальбис [2-оксианилом] - реактивом ГБОА, с о-крезолфталеинкомплексом - о-КФК; с мурексидом, с метил-тимоловым синим и другими реактивами), флюориметрические, пламенно-фотометрические, титриметрические (комплексометрические), а также способ атомно-абсорбционной спектроскопии, признанный всеми как референтный.

Предприятие «Лахема» (Чехия) предлагает использовать для исследования общего кальция спектрофотометрический метод, основанный на цветной реакции с глиоксальбис[2-оксианилом]. Проведение ее затрудняется малой растворимостью ГБОА в воде, а также нестабильностью образующегося комплекса в щелочной среде (оптимальные условия для протекания реакции создаются при рН 11,0-12,6). Достаточную растворимость ГБОА в щелочных растворах обеспечивает добавка метанола или этанола. В неводных средах разрушение комплекса происходит несколько позднее, чем в воде: считают, что он стабилен

в течение 15 мин. Фирма «Лаксема» (Чехия) поставляет в нашу страну наборы реактивов для определения кальция указанным методом.

о-Крезолфталеинкомплексон в отличие от реактива ГБОА формирует комплекс, стабильный в течение нескольких часов и нечувствительный к температурным воздействиям. К сожалению, метод, основанный на использовании о-КФК, недостаточно специфичен, поскольку магний и соли тяжелых металлов мешают определению кальция данным способом. Правда, эта интерференция может быть подавлена цианистым калием (ядовит) и некоторыми другими реактивами, например сульфатом, ацетатом натрия.

Колориметрические способы с применением мурексида или метил-тимолового синего не получили широкого распространения главным образом потому, что цветной комплекс кальция с мурексидом неустойчив, а таковой с метил-тимоловым синим обнаруживает малый предел линейности калибровочной кривой (несмотря на высокую чувствительность метода, специфичность и стабильную окраску комплекса).

Определение кальция сыворотки на пламенном фотометре не так удобно, как пламеннофотометрическое исследование калия и натрия. Оно требует более высоких температур и в большей степени, чем определение K^+ и Na^+ , зависит от содержания других ионов в сыворотке, прежде всего натрия, карбонат- и сульфат-ионов. Флюориметрические методы точны, но для их исполнения необходима дорогостоящая аппаратура.

В настоящее время наиболее распространенным в клинике методом является комплексонометрическое определение кальция в сыворотке крови. В большинстве случаев оно сводится к прямому титрованию разведенной сыворотки комплексоновым раствором при подходящих реакции (рН) среды и индикаторе.

При исследовании кальция в качестве комплексона чаще всего используют двунатриевую соль этилендиаминтетрауксусной кислоты (трилон Б, комплексом III, хелатон III, версен), этиленгликольбисаминоэтилтетрауксусную кислоту (обладающую большим сродством к кальцию, чем к магнию), а в качестве индикаторов - мурексид (дает нечеткий переход окраски), флюорексон, кальред, эриохром черный Т (этот реактив неустойчив в растворах) и некоторые другие.

Основное неудобство титрометрических методов состоит в том, что индикаторный переход не всегда удается зафиксировать точно. Для объективизации этого процесса некоторые авторы предлагают проводить титрование фотометрически. Однако различие в окраске опытных и контрольных проб само по себе служит источником ошибок при фотометрической регистрации процесса титрования.

Используют также методы, базирующиеся на физических свойствах кальция: полярографический, спектрографический, нейтронно-активационный анализ, абсорбционная пламенная фотометрия.

Наиболее точным является способ атомно-абсорбционной спектроскопии, принятый в ряде стран в качестве референтного для оценки надежности других методов определения кальция.

Определение физиологически активного, ионизированного кальция стало возможно с применением ионоселективных электродов, для чего используют метод прямого потенциометрического измерения.

Литература:

Колб В.Г., Камышников В.С. Справочник по клинической химии// Мн.: Беларусь, 1982. 367 с.

8.2.1 Определение общего кальция в сыворотке крови фотометрическим методом, основанным на реакции с глиоксальбис[2-оксианилом]

Принцип. Раствор ГБОА образует с ионами кальция в щелочной среде комплекс красного цвета, интенсивность которого определяют фотометрически.

Реактивы. 1. 0,4 н раствор NaOH (готовят из фиксанала или из крепкого раствора NaOH точно известной концентрации, например, 500 г/л).

2. Метанол, очищенный дистилляцией.

3. Раствор глиоксальбис[2-оксианила] в метаноле-0.1 г/100 мл.

4. Эталонный (стандартный) раствор кальция- 100 мг/л, или 2,50 ммоль/л. Углекислый кальций (CaCO₃) высушивают при температуре +100-120° С. 0,125 г. CaCO₃ растворяют при нагревании в 30-40 мл 0,1 н раствора HCl. Охлаждают, переливают в колбу на 500 мл и доводят объем до метки водой.

Ход определения. В чистую пробирку вносят 1 мл дистиллированной воды, 0,02 мл свежей сыворотки и добавляют 2 мл раствора ГБОА. Содержимое пробирки перемешивают и оставляют на 30 мин (более длительное стояние также не мешает определению) при комнатной температуре. Затем в неё доливают 0,5 мл раствора едкого натра и содержимое вновь перемешивают. Одновременно ставят контрольную пробу на реактивы (что необязательно) и пробу со стандартным раствором (0,02 мл его проводят через все этапы методики). Измерение осуществляют в промежутке между 5 и 15 мин с момента добавления щелочи. Экстинкцию опытного и стандартного растворов измеряют по отношению к дистиллированной воде (или контрольной пробе) на ФЭКе с зеленым светофильтром (длина волны 540 нм) в кюветах с шириной слоя 10 мм. Результаты оценивают по формуле:

$$\frac{E_{оп}}{E_{ст}} \cdot 2,50 = a \quad \text{ммоль/л Ca}^{2+}$$

где 2,50 - показатель концентрации стандартного раствора кальция в ммоль/л (10 мг/100 мл).

Расчет можно производить и по калибровочной кривой, построенной для интервала концентраций 0,25-3,00 ммоль/л (1-12 мг/ 100 мл). Верность калибровочной кривой необходимо периодически контролировать.

Литература:

Колб В.Г., Камышников В.С. Справочник по клинической химии// Мн.: Беларусь, 1982. 367 с.

8.2.2 Определение общего кальция в сыворотке и плазме крови по цветной реакции с о-КФК

Принцип. Раствор о-КФК образует с кальцием в щелочной среде комплекс красно-фиолетового цвета. Интенсивность окраски пропорциональна концентрации кальция.

Реактивы. 1. Калий-боратный буфер. В мерной колбе вместимостью 1 л к 300 мл дистиллированной воды добавляют 200 г борной кислоты, доливают 580 мл 5 н едкого кали и растворяют при + 56° С. Объем доводят до 1 л дистиллированной водой.

2. Глициновый буфер - 2 моль/л. В мерной колбе вместимостью 50 мл растворяют 7,5 г глицина в 40 мл дистиллированной воды и доливают объем до метки. Добавляют 2 капли хлороформа. Хранят в холодильнике.

3. Раствор 8-оксихинолина (оксина) в абсолютном спирте - 1 г/100 мл.

4. Оксиновый буфер. В мерную колбу вместимостью 500 мл вносят 12,5 мл калий-боратного буфера, приливают 5 мл глицинового буфера, 300 мл дистиллированной воды; 5 н едким кали доводят рН раствора до 10,5-10,6, добавляют 50 мл 1 г/100 мл раствора 8-оксихинолина и доводят объем до метки дистиллированной водой. Проверяют рН.

5. Рабочий крезолфталеиновый раствор. 10 мг о-КФК растворяют в 100 мл оксинового буфера. Реактив хранят в холодильнике 2- 3 дня.

6. Основной калибровочный раствор. 0,2497 г высушенного углекислого кальция растворяют в 5 мл 1 н соляной кислоты в мерной колбе вместимостью 100 мл, доливают объем до метки дистиллированной водой, накапывают несколько капель хлороформа. 1 мл раствора содержит 1 мг кальция (100 мг/100 мл раствора). Из него готовят рабочие калибровочные (стандартные) растворы, содержащие по 5,0; 7,5; 10,0; 12,5; 15,0 мг кальция в 100 мл и по 3 мг магния. Для этого к 5-15 мл основного калибровочного раствора добавляют по 1 мл раствора, содержащего 3 мг магния в 1 мл (2,5 г $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ растворяют в дистиллированной воде в мерной колбе вместимостью 100 мл), доводят объем водой до 100 мл и доливают еще несколько капель хлороформа.

Ход определения. В пробирку с 3 мл рабочего раствора вносят 0,05 мл сыворотки, содержимое перемешивают. Через 5 мин измеряют оптическую плотность раствора на ФЭКе с зеленым светофильтром (длина волны 500-560 нм) в кювете с толщиной слоя 5 мм. Результаты сравнивают с аналогичными данными контрольной пробы. Окраска стабильна в течение нескольких часов после добавления сыворотки. Параллельно с опытной пробой ставят стандартную. В контрольную пробу вместо сыворотки добавляют дистиллированную воду.

Расчет ведут по правилу пропорций или по калибровочному графику.

Литература:

Колб В.Г., Камышников В.С. Справочник по клинической химии// Мн.: Беларусь, 1982. 367 с.

8.3 Исследование магния в сыворотке (плазме) крови, эритроцитах, моче

Методы определения содержания магния можно разбить на следующие группы:

I. Химические: 1) титрометрические: комплексометрическое титрование, которое подразделяется на визуальное и фотоэлектрическое; 2) колориметрические, основывающиеся на реакциях с молибдатом, титановым желтым и с магоном.

II. Методы пламенной фотометрии.

III. Способ пламенной спектрофотометрии (атомно-абсорбционный).

IV. Спектрографические.

V. Флюориметрические.

В методах комплексометрического титрования используют комплексы III (трилон Б); в качестве индикатора применяют эриохром черный, хром темно-синий, мурексид, кальцеин.

Методом комплексометрического титрования определяют суммарное содержание кальция и магния и количество кальция; концентрацию магния находят по разности двух определений. Эти методы (визуальные и фотометрические) неточны, а потому не могут применяться в качестве унифицированных.

Колориметрические методы можно разделить на прямые и непрямые. Первые основаны на образовании окрашенных соединений магния в щелочных растворах с титановым желтым и другими веществами.

В непрямых методах содержание магния рассчитывают по количеству связанного реактива. По точности и простоте прямые методы предпочтительнее непрямых. Из прямых способов наиболее чувствительны те, которые базируются на цветной реакции магния с титановым желтым (Колгофф, 1927) и магоном (Боон, 1962).

Методы этой группы различаются по способу осаждения белков.

Определение магния способом фотометрии пламени не получило распространения, так как оно возможно лишь на фотометрах, имеющих светофильтр для магния; присутствие других щелочных и щелочноземельных металлов мешает исследованию этого элемента.

В последние годы для определения магния пользуются атомно-абсорбционным методом. Одним из основных преимуществ его является простота и высокая чувствительность. Однако в клинических исследованиях этот способ используется еще сравнительно мало из-за дороговизны аппаратуры.

Спектрографический и люминесцентный методы исследования магния с 8-оксихинолином, реактивом «люмомагнезон ИРЕА» и другими труднодоступны для применения в широкой клинической практике.

Таким образом, в качестве унифицированных рекомендуются два метода определения магния: по цветной реакции с титановым желтым и магоном.

Литература:

Колб В.Г., Камышников В.С. Справочник по клинической химии.// Мн.: Беларусь, 1982. 367 с.

8.3.1 Определение магния в сыворотке (плазме) крови и эритроцитах по цветной реакции с титановым желтым

Принцип. Магний реагирует с титановым желтым в щелочной среде с образованием окрашенных соединений. Интенсивность окраски пропорциональна концентрации магния.

Реактивы. 1. Раствор вольфрамвокислого натрия - 10 г/100 мл.
 2. 0,67 н раствор серной кислоты.
 3. Раствор едкого натра - 6 г/100 мл.
 4. 0,2 н раствор едкого натра.
 5. Раствор солянокислого гидроксилamina (2 г/100 мл). Хранят в склянке из темного стекла.

6. Раствор титанового желтого - 0,075 г/100 мл. 18,7 мг титанового желтого растворяют в небольшом количестве дистиллированной воды в мерной колбе на 25 мл и доводят дистиллированной водой до метки. Держат в склянке из темного стекла в холодильнике, срок хранения - 10 дней.

7. Раствор метилового красного в 96° этаноле - 0,1 г/100 мл.

8. Стандартный раствор. 0,2026 г кристаллического сернокислого магния ($MgSO_4 \cdot 6H_2O$) растворяют в небольшом количестве дистиллированной воды в мерной колбе на 1 л и доливают дистиллированной водой до метки. 1 мл раствора содержит 0,02 мг магния.

Ход определения. В центрифужную пробирку вносят 2 мл дистиллированной воды, 1 мл сыворотки (плазмы), 1 мл раствора вольфрамвокислого натрия, содержимое пробирки смешивают, добавляют 1 мл раствора серной кислоты и вновь тщательно перемешивают стеклянной палочкой. Через 15 мин пробу центрифугируют при 3,5-4 тыс. об/мин в течение 10 мин (или фильтруют через бумажный фильтр). Центрифугат (фильтрат) должен быть прозрачным. К 2,5 мл центрифугата (фильтрата), перенесенным в мерную центрифужную пробирку на 10 мл, вносят 1 каплю индикатора - метилового красного и нейтрализуют 0,2 н раствором едкого натра до появления желтой окраски.

К содержимому пробирки добавляют 1 мл 2 г/100 мл гидроксилamina, 1 мл раствора титанового желтого и 2 мл реактива 3 - едкого натра. Затем объем раствора доводят до 10 мл дистиллированной водой, пробу фотометрируют на ФЭКе с зеленым светофильтром при длине волны 500-560 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. Результаты сравнивают с данными контрольной пробы.

Контрольную пробу ставят параллельно опытной, беря вместо сыворотки дистиллированную воду.

Расчет производят по калибровочному графику. Из основного стандартного раствора готовят разведения (табл. 12).

Табл. 12. Данные для построения калибровочного графика

| Основной стандартный раствор (мл) | Количество Mg в основном стандартном растворе (мг) | Дистиллированная вода до 6 мл | Концентрация Mg в пробе (мг/100 мл. ммоль/л) | |
|-----------------------------------|--|-------------------------------|--|------|
| | | | 1 | 0,41 |
| 0,25 | 0,005 | 5,75 | 1 | 0,41 |
| 0,50 | 0,010 | 5,50 | 2 | 0,82 |
| 0,75 | 0,015 | 5,25 | 3 | 1,23 |
| 1,00 | 0,020 | 5,00 | 4 | 1,65 |
| 1,25 | 0,025 | 4,75 | 5 | 2,06 |
| 1,50 | 0,030 | 4,50 | 6 | 2,47 |

Добавляют 1 мл раствора гидроксилamina, 1 мл раствора титанового желтого и 2 мл реактива едкого натра (3).

Измеряют оптическую плотность стандартных проб в условиях, описанных для фотометрирования опытной пробы.

Литература:

Колб В.Г., Камышников В.С. Справочник по клинической химии// Мн.: Беларусь, 1982. 367 с.

8.3.2 Определение магния в эритроцитах

Гепаринизированную кровь центрифугируют в течение 30 мин при 3000 об/мин. К 0,5 мл (1 объем) эритроцитной массы доливают 2,5 мл (5 объемов) дистиллированной воды; после гемолиза добавляют 1 мл (2 объема) 0,67 н M_2SO_4 , 1 мл (2 объема) раствора вольфрамвокислого натрия (10 г/100 мл). Содержимое пробирки тщательно перемешивают, через 15 мин фильтруют. Далее определение ведут так же, как в центрифугате (фильтрате) сыворотки (плазмы).

Исследование магния в сыворотке (плазме) крови и моче по цветной реакции с магоном производят готовым набором реактивов, выпускаемым фирмой «Лаксма» (Чехия). При этом концентрацию магния в биологических жидкостях следует выражать в ммоль/л, используя для этого необходимый коэффициент пересчета.

При токсемии беременных, раке, хронической сердечной недостаточности, остром и хроническом панкреатите наблюдается выраженное снижение содержания магния в сыворотке крови.

Увеличение содержания магния в сыворотке отмечается при анурии, хронической почечной недостаточности и поражении почек, сопровождаемом гиперкалиемией.

Литература:

Колб В.Г., Камышников В.С. Справочник по клинической химии// Мн.: Беларусь, 1982. 367 с.

8.4 Методы определения хлорид-ионов в крови, моче и спинномозговой жидкости

Хлор находится в организме в ионизированном состоянии, преимущественно в виде аниона солей Na, K, Ca, Mg и играет большую роль в создании осмотического давления, участвует в регуляции кислотно-щелочного состояния организма. В крови хлор встречается главным образом в виде хлористого натрия. Его содержание в эритроцитах почти в 2 раза меньше, чем в плазме крови. Хлориды выводятся из организма в основном (на 90 %) с мочой, а также с потом и калом.

Для установления содержания хлорид-ионов в биологических жидкостях используются способы исследования, которые в зависимости от принципа определения можно объединить в несколько групп.

I. Осадочные методы (аргентометрические) основаны на способности ионов серебра образовывать с ионами хлора нерастворимые соли. Количество осаждающего вещества эквивалентно содержанию хлорид-ионов. Конец реакции устанавливают по прекращению выпадения осадка или с помощью индикатора.

Осадочные методы включают в себя: удаление белка, осаждение ионов хлора и взаимодействие специального реактива с индикатором. В зависимости от того, какое вещество применяют в качестве осаждающего реагента или индикатора, осадочные методы можно разделить на следующие группы:

1. Методы, базирующиеся на принципе Мора. Белок осаждают спиртом, ионы хлора связывают азотнокислым серебром; индикатором является хромат калия. В конечной точке титрования формируется осадок красного цвета Ag_2CrO_4 .

2. Методы обратного титрования, основанные на принципе Фольгарда. Белок осаждают любым кислым осадителем, ионы хлора - серебром, его избыток титруют раствором роданистой соли; индикатор - железоаммиачные квасцы. В конечной точке титрования жидкость окрашивается в красноватый цвет.

3. Методы, базирующиеся на осаждении ионов хлора йодно-кислым серебром. Белок удаляют фосфорной, вольфрамовой и другими кислотами, смесь встряхивают с избытком твердого йодата серебра и фильтруют. Образуется осадок AgCl , а растворенный йод определяют титрометрически или колориметрически.

4. Методы с применением адсорбционных индикаторов (дихлорфлюоресцеин, эозин). Эти индикаторы адсорбируются в виде анионов на положительно заряженной поверхности хлорида серебра. Адсорбированный индикатор и тот же индикатор в растворе отличаются по цвету.

II. Ртутьметрические методы, в которых хлориды титруют непосредственно азотнокислой ртутью. По израсходованному количеству ее исследуют концентрацию хлорид-ионов.

Из способов этой группы наиболее широкое распространение получил метод Шэлса (1941) и его модификации.

III. Колориметрические методы, основанные на образовании цветных соединений хлора с различными реактивами: тиоционатом ртути и ртутным хлоранилатом.

IV. Электрохимические методы исследования.

V. Способы, базирующиеся на окислительно-восстановительных реакциях.

VI. Изотопные методы.

Метод Мора (1856) основан на формировании в конечной точке титрования хромата серебра (красного цвета).

Недостатки методов, использующих принцип Мора, состоят в том, что: 1) окраска, появляющаяся в конечной точке титрования, нечеткая; 2) титрование нужно проводить в нейтральной среде; 3) моча не должна содержать белок и органические вещества, например пурины, которые тоже осаждаются азотнокислым серебром. Методы, базирующиеся на принципе Фольгарда, в отличие от способа Мора дают возможность титровать даже сравнительно сильнокислые растворы. Однако им также присущи многие недостатки.

Йодометрические способы более чувствительны, чем метод Фольгарда, однако на окраску раствора и способность йодата серебра к растворению могут

влиять изменения концентрации, кислотности, температуры растворов, наличие небольшой примеси хлоридов в воде, реактивах и т. д.

Из методов с адсорбционным индикатором наибольшее распространение получили способы с применением дихлорфлюоресцеина (Франко, Клейн, 1951). Преимущество метода заключается в контрастном переходе окраски из зеленой в розовую при титровании азотнокислым серебром.

Недостатки: 1) при использовании адсорбционных индикаторов важным условием является величина рН; 2) для получения более точных результатов необходимо проводить титрование при минимальном освещении; 3) требуется точная концентрация индикатора, так как при его излишке раствор окрашивается в желтый цвет, что делает неясным изменение окраски.

Из группы ртутнометрических методов широко применяется метод О. Шэлса и С. Шэлса (1941), в котором в качестве индикатора используют спиртовой раствор дифенилкарбазона. Способ технически прост, точен, занимает мало времени, а потому наиболее удобен для клинико-диагностических лабораторий.

Очень точны и удобны электрохимические методы исследования хлора, однако они требуют специальной аппаратуры, что затрудняет их распространение в практике.

Методы, основанные на окислительно-восстановительных реакциях, микродиффузионный способ Конвея (1950), изотопные способы не применяются широко в практике.

В качестве унифицированного предложен меркуриметрический метод определения хлора в сыворотке крови, моче и спинномозговой жидкости с примененном в качестве индикатора дифенилкарбазона.

Литература:

Колб В.Г., Камышников В.С. Справочник по клинической химии// Мн.: Беларусь, 1982. 367 с.

8.4.1 Определение ионов хлора в сыворотке крови, моче и спинномозговой жидкости меркуриметрическим методом с индикатором дифенилкарбазоном

Принцип. Хлориды биологических жидкостей титруют нитратом ртути, используя в качестве индикатора дифенилкарбазон. В эквивалентной точке избыток нитрата ртути образует с индикатором комплекс, окрашенный в синелиловый цвет.

Реактивы. 1. Раствор азотнокислой ртути. 2,0 г азотнокислой ртути $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ х. ч. растворяют в 200 мл дистиллированной воды, добавляют точно 20 мл 2 н HNO_3 и разводят водой до 1 л. Реактив стойкий.

2. Раствор индикатора. 100 мг дифенилкарбазона растворяют в 100 мл 96° этанола. Хранят в темной склянке в течение месяца.

3. 2 н раствор азотной кислоты. Готовят из фиксаля или разбавлением 14 мл концентрированной HNO_3 до 100 мл дистиллированной водой.

4. 0,01 н стандартный раствор хлора. 584,5 мг NaCl х. ч., высушенного до постоянного веса при температуре 4- 120° С, растворяют в небольшом количестве дистиллированной воды и доливают объем до 1л. 1 мл этого раствора содержит 0,01 ммоль хлора.

Ход определения. В небольшой стаканчик помещают 1,8 мл дистиллированной воды, добавляют 0,2 мл исследуемой биологической жидкости, 4 капли индикатора и титруют смесь азотнокислой ртутью из 2-миллилитровой пипетки (или лучше из микробюретки с делениями на 0,01 мл) до появления синефиолетового окрашивания (перемена окраски в конечной точке титрования отчетливо заметна).

Для стандартизации раствора азотнокислой ртути к 2 мл стандартного раствора хлористого натрия приливают 4 капли раствора индикатора и титруют раствором азотнокислой ртути так же, как опытную пробу.

$$a \text{ ммоль хлора в 1 л} = \frac{0,02 \cdot A \cdot 5 \cdot 1000}{B} = \frac{A \cdot 100}{B}$$

где 0,02 - ммоль хлора в 2 мл стандартного раствора хлористого натрия; 5-1000 - коэффициент пересчета на 1000 мл биологической жидкости; А - количество раствора азотнокислой ртути, пошедшее на титрование опытной пробы; Б - количество азотнокислой ртути, пошедшее на титрование стандартного раствора хлористого натрия (мл).

Для удобства в работе количество раствора азотнокислой ртути, необходимое для титрования опытной пробы (А), можно умножить на фактор Ф, который равен 100/Б, так как количество раствора азотнокислой ртути, пошедшее на титрование стандартного раствора NaCl, является постоянной величиной в течение нескольких дней.

Примечания: 1. Раствор азотнокислой ртути готовят и из красной окиси ртути. Для этого 1,083 г красной окиси ртути растворяют в 11.0 мл концентрированной азотной кислоты и доливают водой до 1000 мл. Раствор стойкий.

2. Раствор индикатора должен иметь оранжево-красную окраску. Реактив нужно менять, если окраска становится желтой или вишнево-красной, так как в этом случае он не дает отчетливой конечной точки титрования.

3. Удаление белков усиливает изменение цвета в конечной точке титрования, но оно не является обязательным. При этом результаты определения на 1-2 ммоль/л превышают те которые получаются с фильтратом сыворотки.

4. Если моча имеет щелочную реакцию (pH>8), необходимо ее подкислить разведенной азотной кислотой до слабо кислой реакции.

Исследование в биологических жидкостях хлоридов титрометрическим методом с индикатором дифенилкарбазоном очень удобно производить с использованием набора реактивов фирмы «Лахема» (Чехия), рассчитанного на 1000 микроопределений хлор-ионов (см. прилагаемую к реактивам инструкцию). В нашу страну поставляют также из Чехии наборы реактивов для спектрофотометрического определения хлорид-ионов. Метод основывается на способности хлорид-ионов освобождать из хлораниловокислой ртути хлора и иловую кислоту в количестве, пропорциональном содержанию ионов хлора в исследуемом образце. Описание метода подробно изложено в прилагаемой к набору инструкции. Объем исследуемого материала варьирует в пределах от 0,025 до 0,05 мл. Нормативы те же.

Литература:

Колб В.Г., Камышников В.С. Справочник по клинической химии// Мн.: Беларусь, 1982. 367 с.

8.5 Неорганический фосфор

Общий фосфор крови представлен кислоторастворимой и кислотонерастворимой фракциями. Первая образована неорганическим фосфором, пирофосфатами (АТФ, АДФ и другими), гексозофосфатами, глицерофосфатами и т. д. В состав минерального кислотонерастворимого фосфора входят фосфор фосфолипидов и нуклеопротеидов. При определении липидного и нуклеинового фосфора органический фосфор путем минерализации переводят в неорганический. Для исследования последнего предложены спектрофотометрические, колориметрические, пламеннофотометрические, комплексометрические методы. Из них наибольшее распространение получили колориметрические методики, основанные на определении фосфора в виде синего фосфорномолибденового комплекса, получившего название молибденовой сини. Принцип метода заключается во взаимодействии фосфора с молибденовой кислотой с образованием фосфорномолибденовой кислоты, которая восстанавливается в присутствии избытка молибдата до синего фосфорномолибденового комплекса. Реакция, приводящая к появлению молибденовой сини, до сих пор еще окончательно не изучена.

В качестве восстановителей, необходимых для образования молибденовой сини, применяются гидрохинон, эйконоген (1-амино-2-нафтол-4-сульфоновая кислота), двухлористое олово, амидол (2,4 - диаминофенолгидрохлорид), аскорбиновая кислота, тиомочевина.

В нашей стране чаще пользуются методами с употреблением в качестве восстанавливающих веществ гидрохинона, аскорбиновой кислоты и эйконогена, за рубежом - методами с использованием эйконогена и двухлористого олова.

Самый чувствительный - это способ с применением двухлористого олова. Недостатком указанного метода является неудобство работы с этим восстановителем из-за узких пределов допустимой кислотности. Кроме того, по сравнению с другими способами он более сложен, иногда наблюдается помутнение молибденовой сини.

Метод с использованием аскорбиновой кислоты в качестве восстановителя обладает большей точностью и чувствительностью. Недостаток его в том, что некоторые вещества (уксуснокислый, сернокислый Na, хлористый Na, соли мышьяка и другие) в определенных концентрациях могут инактивировать аскорбиновую кислоту, менять кислотность среды и мешать образованию фосфорномолибденового комплекса. Кроме того, при отклонении от хода выполнения методики аскорбиновая кислота восстанавливает молибденовую и в отсутствие фосфора.

Из методов, базирующихся на применении в качестве восстанавливающего вещества эйконогена, обращает на себя внимание способ Фишке, Субарова (1925) и его модификация. Этот метод точный, его можно использовать для установления концентрации фосфора, варьирующей в широких пределах; окраска возникает быстро и держится долго. Он наиболее приемлем для определения неорганического фосфора в сыворотке крови.

Метод с гидрохиноном несколько уступает предыдущему в отношении точности, а также стабильности реактива (гидрохинон быстро разлагается, в связи с чем реактив нужно готовить перед употреблением).

Распространен также отличающийся высокой чувствительностью метод, основанный на образовании окрашенного комплекса неорганического фосфата с катионной формой малахитового зеленого в присутствии молибдата аммония.

В качестве унифицированного рекомендован колориметрический метод определения неорганического фосфора с восстанавливающим веществом эйконогеном.

Литература:

Колб В.Г., Камышников В.С. Справочник по клинической химии// Мн.: Беларусь, 1982. 367 с.

8.5.1 Определение неорганического фосфора в сыворотке крови и моче по восстановлению фосфорномолибденовой кислоты

Принцип. После осаждения белков в центрифугате остается неорганический фосфор, который при взаимодействии с молибденовой кислотой образует фосфорномолибденовую кислоту. Последняя восстанавливается эйконогеном до синего фосфорномолибденового комплекса. Интенсивность окраски прямо пропорциональна концентрации неорганического фосфора в биологическом субстрате.

Реактивы. 1. Раствор трихлоруксусной кислоты -10 г/100 мл.

2. Раствор молибденовокислого аммония. 5 г молибденовокислого аммония доводят до 100 мл 5 н раствором серной кислоты при постоянном помешивании содержимого склянки до полного растворения.

3. 5 н H_2SO_4 . Готовят добавлением к 860 мл дистиллированной воды 140 мл концентрированной H_2SO_4 , ρ 1,84 кг/л.

4. Раствор аминафтаолсульфоной кислоты (эйконогена). 6 г кислого сернистокислого натрия (гидросульфита натрия) или мета-бисульфита натрия ($Na_2S_2O_5$) растворяют полностью в 20-25 мл воды, после чего в раствор добавляют 0,1 г эйконогена. Эйконоген переходит в водную фазу медленно, при помешивании стеклянной палочкой. Отдельно в небольшом количестве воды растворяют 1,2 г безводного сернистокислого натрия (сульфита натрия). Оба раствора смешивают и объем доводят до 50 мл дистиллированной водой. Через 2-3 ч реактив фильтруют. Хранят в холодильнике в посуде из темного стекла.

5. Основной стандартный раствор од незамещенного фосфорнокислого калия, высушенного до постоянного веса при $+120^\circ C$. 0,4389 г KH_2PO_4 растворяют в дистиллированной воде в мерной колбе на 100 мл. 1 мл этого раствора содержит 1 мг фосфора.

Из основного готовят рабочий раствор с содержанием 0,02 мг фосфора в 1 мл. Для этого 2 мл основного стандартного раствора фосфора доводят дистиллированной водой в мерной колбе до 100 мл.

Ход определения. 1 мл сыворотки смешивают с 4 мл дистиллированной воды и 5 мл трихлоруксусной кислоты. Через 10 мин пробу центрифугируют. К 5 мл центрифугата приливают 1 мл молибденовокислого аммония, 0,2 мл раствора эйконогена и 1,8 мл дистиллированной воды. Через 20 мин стояния при

комнатной температуре пробу колориметрируют на ФЭКе с красным свето-фильтром (длина волн – 660-680 нм) в кювете с шириной слоя 10 мм. Результаты сравнивают с данными контрольной пробы.

Контрольную пробу ставят так же, как опытную, но вместо центрифугата берут 2,5 мл трихлоруксусной кислоты и 2,5 мл дистиллированной воды.

Расчет производят по калибровочной кривой. Из рабочего стандартного раствора готовят разведения (табл. 13).

После 20-минутного стояния пробы колориметрируют так же, как опытные. Результаты сравнивают с данными контрольной пробы на реактивы.

Примечания: 1. При отсутствия эйконогена можно использовать раствор аскорбиновой кислоты (1 г/100 мл), приготовленный перед работой на 0,1 н растворе соляной кислоты.

2. При определении неорганического фосфора в моче ее разводят в 10 раз и дальнейшую обработку разведенной мочи осуществляют аналогично сыворотке.

Летом содержание фосфора несколько большее, чем зимой.

В настоящее время в нашу страну поставляют наборы реактивов (фирма «Лахема», Чехия), позволяющие определять по интенсивности образования молибденованадатофосфорной кислоты содержание как неорганического, так и липидного (после минерализации сгустка крови) фосфора (см. прилагаемую к наборам инструкцию).

Табл. 13 Данные для построения калибровочной кривой

| № пробы | Рабочий стандартный | Раствор трихлоруксусной кислоты (мл) | Раствор молибденово-аммония (мл) | Раствор эйкогена (мл) | Дистиллированная вода (мл) | Содержание фосфора в пробе | | |
|---------|---------------------|--------------------------------------|----------------------------------|-----------------------|----------------------------|----------------------------|-----------|---------|
| | | | | | | мг | мг/100 мл | ммоль/л |
| 1 | раствор (1,0) | сухой (2,5) | кислого (1,0) | ногена (0,2) | 3,8 | 0,01 | 2 | 0,65 |
| 2 | (1,0) | кислоты (2,5) | аммония (1,0) | 0,2 | 3,3 | 0,02 | 4 | 1,29 |
| 3 | 1,5 | 2,5 | (1,0) | 0,2 | 2,8 | 0,03 | 6 | 1,94 |
| 4 | 2,0 | 2,5 | 1,0 | 0,2 | 2,3 | 0,04 | 8 | 2,58 |
| 5 | 2,5 | 2,5 | 1,0 | 0,2 | 1,8 | 0,05 | 10 | 3,23 |

Литература:

Колб В.Г., Камышников В.С. Справочник по клинической химии// Мн.: Беларусь, 1982. 367 с.

8.5.2 Колориметрическое определение содержание фосфора в сыворотке крови по Бригсу в модификации Лебедева П.Т., Усовича А.Г. (1965).

В пробирку отмеривают 2 мл сыворотки крови, прибавляют 6 мл дистиллированной воды и 2 мл 20 %-го раствора ТХУ, для осаждения белков. Раствор хорошо перемешивают, оставляют стоять несколько минут и затем фильтруют через беззольный фильтр не содержащий фосфатов. В новую пробирку пипеткой берут 2,5 мл полученного фильтрата, прибавляют 0,5 мл раствора молибденовокислого аммония, 0,5 мл раствора гидрохинона и оставляют на 5 минут. После этого в пробирку добавляют по каплям 2 мл раствора сульфита и карбоната натрия и 0,5 мл дистиллированной воды. Через 10 минут измеряют оптическую плотность раствора (кювета на 3 мл, красный светофильтр, область

пропускания 650-700 нм) и по калибровочной кривой находят содержание фосфора в исследуемой пробе, выражаемое в мг%. Калибровочную кривую строят по данным оптической плотности стандартных растворов, содержащих 2,0; 4,0; 6,0; 8,0 и 10,0 мг% фосфора, в данном случае KH_2PO_4 . Полученные результаты переводили в единицы СИ, путем умножения на коэффициент пересчета равный 0,323, получая конечные данные в ммоль/л.

Уровень фосфора зависит: 1) от функции паращитовидных желез, 2) щитовидных желез, 3) регулирующего действия витамина D, 4) функции почек.

Гиперфосфатемия встречается при почечной недостаточности, гипопаратиреозе, акромегалии, диабете, кетозе, приеме больших доз витамина D, ультрафиолетовом облучении, в некоторых случаях при аддисоновой болезни, спазмофилии, болезни Иценко-Кушинга. Гиперфосфатемия при нефритах и нефрозах является одним из неблагоприятных прогностических признаков. Эти заболевания часто сопровождаются понижением резервной щелочности. Увеличение содержания фосфатов в крови наблюдается при токсикозах беременности. Гиперфосфатемия свойственна периоду заживления костных переломов (это благоприятный признак). Мышечная работа сопровождается повышением содержания неорганических фосфатов в результате расщепления органических фосфорных соединений (АТФ).

Гипофосфатемия часто бывает при рахите. Очень важно, что снижение уровня неорганического фосфора в сыворотке крови отмечается в ранней стадии рахита, когда клинические симптомы еще недостаточно выражены. Гипофосфатемия при рахите может перейти в гиперфосфатемию, что нередко сопровождается явлениями спазмофилии. Снижение содержания фосфатов в крови наблюдается при остеомаляции, пеллагре, длительном лечении инсулином и хлористым кальцием. Гипофосфатемия нередко наблюдается у новорожденных, при гиперпаратиреозе, гиперинсулинизме, микседеме. Гипофосфатемия может быть и алиментарного происхождения - вследствие потребления бедной фосфатами пищи и нарушения всасывания фосфатов в кишечнике.

Для диагностики различных патологических состояний важное значение имеет установление количественного соотношения между содержанием кальция и неорганического фосфора в крови. При рахите количество выделяемого с мочой фосфора увеличивается в 2 - 10 раз по сравнению с нормой. Повышение выделения фосфатов с мочой отмечается при распаде клеток (например, при лейкозах, гипертиреозе, диабете, менингите).

Снижение выделения фосфатов с мочой можно наблюдать при туберкулезе, лихорадочных состояниях, острой желтой атрофии печени, недостаточной функции почек, акромегалии.

Литература:

Лебедев П.Т., Усович А.Т. Методы исследования кормов, органов и тканей животных// Россельхозиздат, М., 1965, 711 с.

8.6 Определение меди, цинка и железа в сыворотке крови

Наиболее оптимальным методом определения микроэлементов по мнению Боровик-Романовой Т.Ф. и др (1973), Фомина А.А. и др (1973), Кузнецова С.Г. (1997) и Verman E. (1965) является метод атомно-абсорбционной спектро-

скопии, так как в процессе массовых исследований коэффициент вариации результатов определения данных элементов не превышает 2-5 %.

При определении железа к 2 мл сыворотки добавляют 0,1 мл 4М HCl, а затем через час приливают 1 мл 20 %-ной трихлоруксусной кислоты (ТХУ). Содержимое пробирки перемешивают и центрифугируют при 3000 об/мин в течение 10 мин. Из верхнего слоя жидкости отбирают точно половину первоначального объёма (1,55) в сухую пробирку, добавляют 0,5 мл ацетона и раствор распыляют в обедненное воздушно-ацетиленовое пламя, при длине волны 248,3 нм. Калибровочные растворы готовят смешиванием 2 мл исходного раствора с содержанием железа в интервале 0-3 мкг/мл, 0,1 мл 4М HCl, 1 мл 20 %-ной ТХУ и 1 мл ацетона. Содержание железа в калибровочном растворе в пересчете на исходные образцы эквивалентно концентрации 0-3 мг/л. Вследствие высокой чувствительности измерений меди и цинка сыворотку крови можно анализировать без предварительного концентрирования. Для увеличения точности определения из сыворотки крови удаляют белки следующим образом: отбирают 1 мл сыворотки и 1 мл 10 %-ной ТХУ в центрифужную пробирку. Содержимое пробирки тщательно перемешивают и центрифугируют при 3000 об/мин в течение 10 мин. Верхний слой раствора распыляют в обедненное воздушно-ацетиленовое пламя при длине волны для меди – 324,7 нм и цинка – 213,8 нм. Калибровочные растворы готовят на основе 5 %-ной ТХУ. Концентрация меди или цинка в калибровочных растворах составляет 0-1 мкг/мл. Концентрацию элемента рассчитывают, умножая найденное по калибровочному графику значение на фактор разведения, выражая концентрацию элементов в мг/л.

Литература:

Под ред. Кальницкого Б.Д. Методы биохимического анализа (справочное пособие)// Боровск, 1997. 356 с.

9 ПОКАЗАТЕЛИ НЕСПЕЦИФИЧЕСКОЙ РЕЗИСТЕНТНОСТИ ОРГАНИЗМА

БАСК является интегральным фактором естественной резистентности гуморального типа, свидетельствующим о способности крови к самоочищению. Бактерицидность крови связана с наличием в сыворотке особых растворимых веществ, убивающих и растворяющих микробные клетки; она распространяется на разные микробы.

К настоящему времени получено достаточно доказательств тому, что БАСК характеризуется значительными колебаниями у животных разных видов в норме и при воздействиях внешней среды. Снижение её уровня наблюдается чаще, чем повышение, что характерно в основном для различных стрессовых ситуации, при нарушении условий кормления, содержания и возникновении заболеваний, протекающих в скрытой или хронической форме. В то же время повышение бактерицидности крови отмечается при остром течении заболеваний и при стимулирующем действии различных факторов.

9.1 Методика определения БАСК.

Наибольшее распространение в практике получил упрощенный фотонелометрический метод определения БАСК по О.В. Смирновой и Т.А. Кузьминой.

Необходимое оборудование: ФЭК-М с зеленым светофильтром, кюветы №2, стерильные пробирки и пипетки, стерильный физиологический раствор, мясо-пептонный бульон (МПБ) Хоттингера, суточная культура кишечной палочки, исследуемая сыворотка, горелки.

Ход определения. На физиологическом растворе готовят смесь из суточной культуры эшерихий, определяют её плотность на ФЭК-е. Она должна быть в пределах 0,48. В пробирки наливают по 4,5 мл стерильного мясо-пептонного бульона, в опытную пробирку добавляют 1 мл исследуемой сыворотки, в контрольную – 1 мл физиологического раствора. Затем во все пробирки вносят с помощью шприца или микропипетки по одной капле 24-часовой культуры эшерихий. Содержимое пробирок перемешивают и стерильной пипеткой отбирают по 2 мл для измерения на ФЭК-е оптической плотности (D). Смесь, оставшуюся в пробирках, инкубируют в термостате при 37° С 3 ч. После этого вновь измеряют оптическую плотность содержимого пробирок. БАСК вычисляют следующим образом:

$$БАСК\% = 100 - \frac{D_0 \text{ через } 3ч - D_0 \text{ перед инкубацией}}{D_K \text{ через } 3ч - D_K \text{ перед инкубацией}} * 100$$

Литература:

Под ред. Маслянюк Р.П. Иммунологические методы исследования в животноводстве.- Львов, 1987. – 48 с.

9.2 Нормальные антитела (гетероагглютинины)

К числу важных факторов естественной резистентности животных относятся гетероагглютинины, способные вступать в реакции с антигенами, с которыми организм ранее не встречался. Они в основном связаны с иммуноглобулинами класса М. Существует два типа таких антител. Одни из них направлены против определенных изоантигенов, например, эритроцитарных антигенов, что

лежит в основе подразделения животных по группе крови. Распределение последних подчиняется правилу Ландштейнера о том, что сыворотки постоянно содержат против соответствующих агглютиногенов. Соответствующие друг другу агглютинины и агглютиногены существовать вместе не могут. Антитела, присутствующие в сыворотке одного животного и специфические в отношении другого животного того же вида, были названы изоантителами.

Нормальные антитела второй категории направлены против антигенов, не относящихся к изоантигенам, - это естественные противомикробные агглютинины. Их появление объясняется тем, что с момента рождения организм заселяется многочисленными представителями микрофлоры внешней среды, многие из которых становятся его пожизненными обитателями, составляя нормальную аутофлору тела. Мертвые и живые клетки бактерий вместе с кормом и водой поступают в желудочно-кишечный тракт, подвергаясь, разрушению пищеварительными ферментами, а их антигенные вещества, всасываясь, оказывают определенное влияние на аппарат иммуногенеза и индуцируют образование антител. В результате этого с возрастом животных появляются нормальные, то есть возникшие спонтанно, без искусственной иммунизации, антитела. Титр их невысок (по реакции агглютинации - 1:10 -1:40) и взаимодействуют они часто с представителями кишечной микрофлоры.

Нормальные антитела выполняют защитную функцию. Им отводится решающая роль как фиксатора антигенов. Образующийся при этом комплекс легче ассимилируется клетками организма. Велика их роль и у «входных ворот» инфекции - на слизистых оболочках дыхательного и пищеварительного трактов. Чаще всего эти антитела представлены секреторными иммуноглобулинами класса А. Секреторные антитела способны агглютинировать бактерии, ограничивая их распространение. Одновременно они препятствуют заселению микробами эпителиального слоя пищеварительного и респираторного тракта. Например, у новорожденных телят со слаборазвитой системой секреторных антител антигены молока часто попадают в кровь, что ведет к появлению агглютининов к белкам молозива и молока. Следовательно, при дефиците секреторных антител класса А может происходить аллергия организма животных в связи с постоянным образованием сывороточных антител к кормовым антигенам.

При целом ряде заболеваний различной природы титр нормальных антител остается и норме. Снижение количества гетероагглютининов отмечается при иммунологической недостаточности, возникающей на фоне нарушения условий выращивания животных.

Следует отметить, что независимо от механизма возникновения естественных гетероагглютининов титр их в большинстве случаев отражает состояние зрелости иммунной системы, и поэтому может быть использован в качестве теста реактивности организма к определенной группе антигенов. Чаще всего наряду с другими факторами резистентности определению подвергаются нормальные антитела к эритроцитам барана и к кишечной палочке.

Наиболее приемлемой и простой считается методика, предложена О. В. Бухариным и А. П. Лудой.

Вариант 1. Необходимые ингредиенты: физиологический раствор, исследуемая сыворотка, 2,5%-ная взвесь эритроцитов барана.

Ход определения. Предварительно следует инактивировать исследуемую сыворотку в течение 30 мин. при +56°C. В опыте используют сыворотку, разведенную на физиологическом растворе в соотношениях 1:2 - 1:512. Первое разведение получают смешиванием 0,5 мл цельной сыворотки с 0,5 мл физиологического раствора, последующие - перенесением по 0,5 мл смеси из первой пробирки в последующую. Затем во все пробирки вносят по 0,1 мл 2,5%-ной взвеси бараньих эритроцитов и выдерживают при температуре +5°C.

Учет реакции производится по максимальному титру сыворотки, который образует на дне пробирки типичный ажурный осадок «зонтик» (реакция на 4 креста), а также по последней пробирке, в которой остаются следы частичной гемагглютинации (реакция на 1 крест).

Вариант II. Необходимые ингредиенты: физиологический раствор, исследуемая сыворотка, суточная культура кишечной палочки.

Ход определения: разведения сыворотки готовят в обыкновенных или агглютинационных пробирках. В опыте используют сыворотку, разведенную на физиологическом растворе в соотношениях от 1:2 до 1:512. Разведение 1:2 получают смешиванием 0,25 мл цельной сыворотки с 0,25 мл физиологического раствора, последующие - перенесением 0,25 мл смеси из предыдущей пробирки в последующую. Во все пробирки с готовыми разведениями исследуемой сыворотки вносят по 2 капли убитой двухмиллиардной взвеси суточной культуры кишечной палочки. После этого пробирки оставляют на 2 ч. в термостате при 37°C и на 20 ч. - при комнатной температуре. Учет реакции агглютинации производится по максимальному разведению, которое вызывает четкую агглютинацию (реакция на 4 креста), а также по последней пробирке, в которой имеются видимые следы частичной агглютинации (реакция на 1 крест). Результаты реакции учитывают при помощи агглютиноскопа. За титр принимают то наибольшее разведение сыворотки, в котором отмечается хорошо видимая агглютинация при сопоставлении с контрольной сывороткой и диагностикумом (бактериальной культурой).

Литература:

Под ред. Маслянюк Р.П. Иммунологические методы исследования в животноводстве.- Львов, 1987. – 48 с.

9.3 Комплемент

Термином комплемент принято считать цитотоксическую систему из 11 сывороточных белков, участвующую в различных иммунных реакциях.

Комплемент содержится и свежей сыворотке крови, лимфе и тканевых жидкостях человека и различных животных. Максимальное количество комплемента находится в свежей сыворотке морской свинки. В сыворотке крупного рогатого скота в 6-8 раз меньше.

Оптимальной средой для определения активности комплемента является физиологический раствор поваренной соли и кислая среда (рН в пределах 6-6,5). Для сохранения его свойства используют различные способы консервиро-

вания. Лучшим считается лиофильная сушка - высушивание сыворотки в замороженном состоянии.

Ход определения: титрование комплемента по 50%-ному гемолизу. 50% - гемолитическая единица активности комплемента (CH_{50}) - это такое его количество, при котором происходит 50%-ный лизис определенного содержания (0,5-1,0 мл) сенсibilизированных эритроцитов в течение 45-60 мин. при 37°C.

Необходимые ингредиенты: 3%-ная взвесь отмытых эритроцитов барана, гемолитическая система (сыворотка, разведенная по тройному титру), физиологический раствор, исследуемая сыворотка.

Приготовление взвеси эритроцитов барана. Кровь у барана берут из яремной вены (200 мл) в стерильную банку со стеклянными бусами, встряхивают 5-6 мин. для предотвращения свертывания крови. Затем дефибрированную кровь фильтруют через 2 слоя марли, центрифугируют и отмывают трижды в 5-10-кратном объеме физиологического раствора (после третьего отмывания надосадочная жидкость должна быть бесцветной). Кровь барана можно хранить в холодильнике 3-5 дней. Из плотного осадка готовят 3%-ную взвесь эритроцитов в физиологическом растворе. Густота взвеси эритроцитов оказывает значительное влияние на титр комплемента. Поэтому для стандартизации взвеси эритроцитов барана пользуются фотоэлектронеметрическим методом. Для этой цели берут 3 десятимиллиметровые кюветы, наливают в первую лизированную кровь (к 1 мл приготовленной 3%-ной взвеси эритроцитов добавляют 9 мл дистиллированной воды), во вторую и третью - растворитель (1 мл физиологического раствора и 9 мл дистиллированной воды). В левый кюветодержатель ставят кювету с растворителем, в правый - с лизированной кровью. Определяют оптическую плотность лизированной крови при зеленом светофильтре. Если 3%-ная взвесь эритроцитов барана приготовлена правильно и шкала оптической плотности показывает 0,4, то к приготовленной взвеси нужно добавить еще эритроциты. При оптической плотности выше 0,4 к приготовленной взвеси бараньих эритроцитов следует добавить физиологический раствор.

Титрование комплемента начинается с подготовки гемолитической системы. С этой целью смешивают равные объемы 3%-ной взвеси эритроцитов барана и гемолитической сыворотки, разведенной по тройному титру (если титр сыворотки 1:1500, то разведение следует приготовить 1:500), причем рекомендуется вливать сыворотку во взвесь эритроцитов. Полученную смесь ставят в термостат при 37°C на 30 мин.

Исследуемую сыворотку разводят 1:10 и разливают в 5 пробирок по 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5 мл. Затем в каждую пробирку вносят физиологический раствор, доводя объем до 1,5 мл и добавляют по 1,5 мл гемолитической системы. Пробирки ставят в термостат на 45 мин., затем 10 мин. охлаждают в холодильнике, 10 мин. центрифугируют при 1500 об/мин, и определяют оптическую плотность надосадочной жидкости на ФЭК-е с зеленым светофильтром против воды (кювета-3 мл). Параллельно с опытом ставят 2 контроля: № 1 - 1,5 мл дистиллированной воды +1,5 мл взвеси эритроцитов (для получения 100% гемолиза) и № 2 - 1,5 мл физиологического раствора +1,5 мл взвеси эритроцитов (чтобы опреде-

лить оптическую плотность контроля № 1, показания которого соответствуют 100%-ному гемолизу). Полученное значение делят на 2, что соответствует 50%-ному гемолизу.

Литература:

Под ред. Маслянюк Р.П. Иммунологические методы исследования в животноводстве.- Львов, 1987. – 48 с.

9.4. Бета-лизин

Бета-лизин является одной из важных бактерицидных систем сыворотки крови животных, отличающейся термостабильностью и избирательностью в отношении грамположительных бактерий. По своей природе. Бета-лизин представляет катионный белок. Его молекулярная масса варьирует в пределах 5500-6000. Максимальный бактерицидный эффект отмечается при рН 5,75-8,0 и ионной силе 0,15-0,20.

По мнению большинства авторов, бета-лизин имеет тромбоцитарное, происхождение. Тромбоциты содержат два компонента, которые вместе с бикарбонатными ионами составляют систему, действующую бактерицидно на микробы. Оба компонента присутствуют в кроличьей и крысиной сыворотке и тромбоцитах, но отсутствуют у крупного рогатого скота; они освобождаются при разрушении тромбоцитов и ответственны за бактерицидность крови. Предположительный механизм бактерицидного действия этих веществ - изменение проницаемости мембран чувствительных клеток и блокада их окислительного метаболизма.

В настоящее время наиболее широкое распространение получил модифицированный метод О.В. Бухарина, А.П. Луда, Р.И. Бигеевой, основанный на определении активности бета-лизина фотонейтриметрически. О бета-литической активности сыворотки судят по изменению оптической плотности мясопептонного бульона при добавлении к нему стандартного количества микробной взвеси *Bac. subtilis* в присутствии испытуемого материала или без него. Для этого в 2 пробирки с 2,7 мл стерильного МПБ вносят по 0,1 мл хорошо диспергированной микробной взвеси эталонной культуры (100 тыс. клеток на 1 мл) и по 0,2 мл испытуемой сыворотки крови. Контролем служат 2 аналогичные пробирки с 2,7 мл МПБ и 0,1 мл культуры (без сыворотки). Содержимое одной параллельной пары пробирок (опыт и контроль) подвергают нефелометрии непосредственно в день проведения опыта. Таким образом получают данные об исходной оптической плотности в опыте и контроле. Содержимое второй пары пробирок колориметрируют после 18-часовой инкубации в термостате. Оптическую плотность определяют с зеленым светофильтром против дистиллированной воды.

Активность бета-лизинов определяют по следующей формуле, в %:

$$100 - \frac{\text{оптическая плотность опыта через 18 ч} - \text{исходная плотность опыта}}{\text{оптическая плотность контроля через 18 ч} - \text{исходная плотность контроля}} \times 100$$

Ускоренный метод определения активности бета-лизина по О. В. Бухарину. Необходимые реактивы и оборудование: 20-часовая агаровая культура *Bac. subtilis*, ФЭК, сахароза, стерильный физиологический раствор, пробирки, пипетки на 1,0; 2,0; 5,0 мл, горелка.

Ход определения: 20-часовую агаровую культуру *Bac. subtilis* (штамм 83) смывают раствором сахарозы (рН 6,2) и готовят микробную взвесь, густота которой соответствует оптической плотности на ФЭК-е 0,50 (правый барабан, кювета № 2, зеленый светофильтр). Затем к 0,4 мл приготовленной взвеси добавляют 0,2 мл изотонического раствора хлористого натрия (контроль) или 0,2 мл испытуемой сыворотки (опыт). Смесь инкубируют 2 ч. в термостате, после чего определяют конечную оптическую плотность в опытной и контрольной пробирках. Для удобства колориметрирования к 0,6 мл реакционной смеси (после инкубации в термостате) добавляют в обе пробирки по 0,6 мл 0,75 М, раствора сахарозы (общий объем смеси 1,2 мл). Оптическую плотность опытных образцов измеряют на ФЭК-е против исследуемой сыворотки (0,2 мл сыворотки +1 мл раствора сахарозы), а контрольных проб - против раствора сахарозы (1,2 мл). Исходную оптическую плотность измеряют, смешивая 0,2 мл исследуемой сыворотки, 0,4 мл взвеси тест-культуры и 0,6 мл раствора сахарозы. Активность бета-лизинов определяют по формуле (%):

$$\text{Активность бета - лизина(\%)} = \frac{D_1 - D_2}{D_1} \times 100$$

где D_1 -оптическая плотность проб до инкубации;

D_2 -оптическая плотность проб после инкубации.

В связи с тем, что в контрольной пробе оптическая плотность за 2 ч. инкубации в термостате не изменилась, ее не принимают во внимание.

Бета-лизины содержатся не только в сыворотке крови, но и в других тканях: в молоке, экстрактах щитовидной железы, надпочечниках, почках, селезенке, костном мозге и др.

Активность бета-лизинов у коров различного возраста составляет 69-75%, у молодняка крупного рогатого скота - 65-72%.

Изменение активности бета-лизина при различных состояниях организма. По общепринятому мнению бета-лизины относятся к тем механизмам защиты организма, которые первыми реагируют на неблагоприятное воздействие окружающей среды. У коров, склонных к повторным, рецидивирующим заболеваниям вымени, отмечается выраженный дефицит активности бета-лизинов. Эта дефектность в активности бета-лизинов, как и некоторых других факторов естественной резистентности, может быть одной из причин частых возникновений воспалительных процессов.

Таким образом, определение активности бета-лизина может быть рекомендовано во всех случаях, когда ставится задача оценить уровень неспецифического звена иммунной системы животного. Особенно информативен этот тест при определении устойчивости организма к грамположительным, микроорганизмам (в том числе к кокковой флоре).

Литература:

Под ред. Маслянюк Р.П. Иммунологические методы исследования в животноводстве.- Львов, 1987. – 48 с.

9.5 Лизоцим

Лизоцим относится к одному из важнейших факторов естественной резистентности организма. После опытов Лащенко, доказавшего бактерицидный

эффект протеолитического фермента (мурамидазы) куриного яйца, это вещество было обстоятельно изучено Флемингом и названо лизоцимом. Его молекула состоит из простой полипептидной цепи со 129 последовательно расположенными аминокислотами, связанными между собой дисульфидными мостиками из остатков цистеина. Молекулярная масса лизоцима равна 14500, изоэлектрическая точка — 11,1.

Ферментативная активность лизоцима заключается в том, что разрушает связь между N-ацетилмураминовой кислотой и N-ацетилглюкозамином в мукополисахариде, образующем оболочку многочисленных микробов, особенно грамположительных. Есть мнение, что образующиеся глюкопептиды обладают адьювантной активностью: стимулируют продукцию антител, повышают митотическую активность, индуцируют гиперчувствительность замедленного типа.

С бактериолитической функцией, очевидно, связана высокая концентрация лизоцима в секретах оболочек, контактирующих с внешним миром, - слезах, бронхиальном секрете, в молоке, а также в нейтрофильных гранулоцитах и моноцитах. Установлено, что одна нейтрофильная клетка повышает активность лизоцима в сыворотке на 0,004-0,144 %, а одна моноцитарная клетка - на 0,0363-0,118 %. Наиболее богата лизоцимом слизь носа, низкий уровень фермента выявлен в молоке, сыворотке крови, коже.

Нормальное содержание лизоцима в крови на 3/4 обеспечивается производящими его клетками крови. Он поступает в кровь из распадающихся нейтрофилов, поэтому деструкция значительного их количества сопровождается преходящим повышением концентрации лизоцима в крови.

Лизоцим выводится из организма животных почками. Благодаря низкой молекулярной массе его, он легко проходит через неповрежденный клубочковый фильтр, но полностью реабсорбируется в проксимальных канальцах. Моча здоровых животных не содержит лизоцима или в ней обнаруживаются его следы. Выделение его с мочой в большом количестве может быть следствием двух причин: 1) серьезным повреждением эпителия канальцев при нефритах. В этом случае даже при нормальном содержании лизоцима в крови лизоцимурия, как правило, незначительна - до 10-20 мкг/мл; 2) концентрацией фермента в крови выше пороговой - 45-50 мкг/мл. При значительном увеличении фильтрационной фракции реабсорбция становится недостаточной для обратного всасывания содержащегося в первой моче лизоцима, вследствие чего этот фермент в большом количестве выделяется с мочой.

Существует несколько методов определения этого фермента: титрование в пробирках, оценка активности по степени мутности с использованием ФЭК-а, метод диффузии в агаре. Наиболее приемлемыми в практике считаются первые два метода.

Определение титра лизоцима по З. В. Ермольевой и И. С. Буяновской. Необходимые пробирки и реактивы: термостат, стерильные пробирки и пипетки, физиологический раствор, суточная тест-культура микрококка, оптический стандарт мутности (10 ед.).

Ход определения: Тест культуру *Micrococcus lysodeikticus* выращивают на косом агаре. Взвесь суточной агаровой культуры микрококка готовят по го-

сударственному стандарту мутности (10 ед.) на физиологическом растворе. Исследуемую сыворотку разводят физиологическим раствором в 10, 20, 40 и т. д. до 1:640 или 1:10, 1:100, 1:1000 и т.д. и разливают по 1 мл в пробирки. Во все пробирки добавляют 1 мл стандартизованной взвеси микробов, встряхивают и ставят их в термостат на 3 ч. при 37°C. Учет реакции производят по степени просветления сыворотки. Титром лизоцима считают последнее разведение, в котором происходит полный лизис микрококка.

Нефелометрический метод определения активности лизоцима по В. Г. Дорофейчику. Необходимые приборы и реактивы: ФЭК-56 или ФЭК-56М, термостат, стерильные пробирки и пипетки, физиологический раствор, суточная культура микрококка, исследуемая сыворотка.

Ход определения: Из суточной агаровой культуры микрококка готовят микробную взвесь на физиологическом растворе (рН 7,2-7,4), стандартизуют на ФЭКе при зеленом светофильтре в кюветах № 2. Оптическая плотность взвеси должна быть в пределах 0,46-0,50. К 1,47 мл приготовленной микробной взвеси добавляют 0,03 мл исследуемой сыворотки животного, пробирку встряхивают, затем полученную смесь выливают в стерильную кювету и определяют оптическую плотность - D_0 . Содержимое кюветы переливают в пробирку и ставят в термостат на 1 ч. при температуре 37°C, после чего вновь определяют оптическую плотность - D . По таблице, предложенной О. В. Бухариным вычисляют количество лизоцима в сыворотке крови в мкг/мл.

Литература:

Под ред. Маслянюк Р.П. Иммунологические методы исследования в животноводстве.- Львов, 1987. – 48 с.

9.6 Фагоцитарная активность лейкоцитов

Явление фагоцитоза было открыто и изучено И. И. Мечниковым в 1882 г. Он установил, что фагоцитоз - это врожденная реакция организма, проявляющаяся в способности клеток-фагоцитов захватывать проникающие в тело животного частицы и переваривать их.

Осуществляя функцию внутриклеточного пищеварения, свойственную простейшим организмам, фагоцитоз филогенетически является наиболее древним механизмом защиты.

Процесс фагоцитоза осуществляется микрофагами (гранулоцитами крови) и макрофагами (моноциты крови, клетки пульпы селезенки, эндотелия кровеносных сосудов, полибластами, гистиоцитами и др.). Нейтрофильные гранулоциты крови чаще всего фагоцитируют возбудителей острых инфекций, а макрофаги поглощают и переваривают самых разнообразных микробов - кислотоустойчивых, патогенных, спирохет, грибов, а также эритроциты, лейкоциты, элементы дегенеративных и умирающих тканей.

В настоящее время фагоцитоз рассматривается как сложная, многоступенчатая реакция, начинающаяся с захвата фагоцитом чужеродных субстанций и кончающаяся ее перевариванием. Кроме того, фагоцитоз осуществляется макрофагами, является первой фазой специфической иммунной реакции. В результате этого процесса происходит видоизменение антигена с высвобождением большого количества антигенных детерминант, что усиливает иммуногенез

и обеспечивает длительное сохранение антигена на клеточной мембране в легкодоступной форме.

В гранулах фагоцитов содержится набор неферментных катионных белков, лизоцим, миелопероксидаза, за счет которых происходит подавление активности фагоцитированных бактерий. Кислые гидролазы способны разрушать в фаголизосоме нейтрофилов только те бактерии, которые подвергались действию вышеуказанных субстанций. Фагоцитоз малоэффективен, когда лейкоциты взвешены в жидкой среде, но значительно активизируются благодаря волокнистым или мембранным структурам, как фибрин или эритроциты, которые «помогают» притягивать бактерии к клеткам. На прилипание и поглощение антигенных веществ фагоцит отвечает повышением уровня метаболической активности. Происходит трехкратное поглощение кислорода и глюкозы, усиливается интенсивность аэробного и анаэробного гликолиза. Это состояние обмена веществ при фагоцитозе получило название «метаболического взрыва». Фагоцитозу способствуют нормальные или иммунные антитела, комплемент, пропердин, лизоцим.

В животноводстве значительно чаще изучается фагоцитарная активность нейтрофилов, чем макрофагов, что связано с относительной доступностью и легкостью выполнения данного исследования.

Фагоцитарная активность лейкоцитов изменяется у животных в связи с возрастом, условиями кормления и содержания, а также при различных заболеваниях. Причем часто наблюдается диссоциация отдельных звеньев этого процесса - разобщение поглотительной и переваривающей активности нейтрофилов. Полное угнетение фагоцитарного процесса встречается при иммунодефицитах, заболеваниях желудочно-кишечного тракта молодняка животных - колибактериозах, энтеритах вирусной и бактериальной природы. Существенно снижается фагоцитарная активность лейкоцитов у больных животных с пиогенными инфекциями, особенно у животных раннего возраста, при токсических формах острых пневмоний, что, вероятно, обусловлено интоксикацией, гипоксемией, нарушением обменных процессов.

Методика определения фагоцитарной активности лейкоцитов. Для этой цели предложено несколько равноценных методов. Наибольшее применение получил метод, описанный В. В. Никольским.

Ход определения: Непосредственно перед опытом суточную культуру (золотистый или белый стафилококк) смывают физиологическим раствором с МБА и доводят бактериальную взвесь до концентрации 1 млрд микробных тел в 1 мл (по стандарту мутности).

Исследуемую кровь в количестве 0,2 мл берут из вены в стерильную бактериологическую пробирку, содержащую гепарин из расчета 15 ЕД на 1 мл и добавляют 0,1 мл бактериальной взвеси. Пробирку осторожно встряхивают и помещают в термостат на 30 мин. при 37°C, после чего на предметных стеклах готовят мазки па бактериально-лейкоцитарной взвеси, находящейся над осадком эритроцитов, фиксируют их смесью Никифорова и окрашивают по Романовскому-Гимзе. Мазки можно обрабатывать по Романовскому в модификации Филипсона. В них подсчитывают процент активно фагоцитирующих нейтрофи-

лов, то есть активность фагоцитоза (АФ) и число микробов, в среднем приходящихся на один фагоцит, - интенсивность фагоцитоза (ИФ). Завершенность фагоцитарной реакции (ЗФ) учитывают по методу З. Е. Матусис и С. И. Пылаевой в модификации Е. А. Олейниковой с соавторами. Для определения ЗФ из пробирки производят два посева - первый (исходный или контрольный) непосредственно после добавления бактерий к крови и встряхивания, второй - после 2-часовой инкубации смеси в термостате при 37°C. Высевы осуществляют мерной петлей (диаметр 2 мм) на один из секторов чашки Петри с мясо-пептонным агаром, тщательно расштриховывая высеваемый материал от периферии к центру чашки. ЗФ учитывают по высеваемости бактерий в баллах: от 0 - отсутствие роста, до 10 баллов - сплошной рост. Коэффициент бактерицидности представляет величину, обратную логарифму числа выросших колоний. Выделяют 5 степеней завершенности фагоцитоза:

1-я - высокая ЗФ (рост 0-2 балла), коэффициент бактерицидности 1,0-0,82);

2-я - средняя ЗФ (рост 3-4 балла), коэффициент бактерицидности 0,81-0,45);

3-я - слабая ЗФ (рост 5-6 баллов), коэффициент бактерицидности 0,44-0,32);

4-я - очень слабая (7 баллов), коэффициент бактерицидности 0,31-0,29);

5-я - ЗФ отсутствует (8-10 баллов) или 0,28-0,25.

Кроме того, вычисляют эффективность фагоцитоза (ЭФ), которая является интегральным показателем фагоцитарной активности лейкоцитов:

$$\text{ЭФ} = \text{АФ} \times \text{ИФ} \times \text{ЗФ}$$

Среднюю ошибку определяют по формуле:

$$\text{ЭФ} = (\text{АФ} \times \text{ИФ} \times \text{ЗФ}) + (\text{АФ} \times \text{ИФ} \times \text{ЗФ}) + (\text{АФ} \times \text{ИФ} \times \text{ЗФ}).$$

Согласно другой широко применяемой экспресс-методике в пробирку с 1 мл цитратной крови добавляют 0,5 мл взвеси 2-миллиардной суточной культуры золотистого стафилококка. Лейкоцитарно-микробную смесь после предварительного перемешивания помещают в термостат при 37°C на 15-30 мин. Затем из смеси готовят мазки на предметных стеклах, их высушивают на воздухе, фиксируют в смеси Никифорова и окрашивают по Романовскому-Гимзе. Учет результатов производят аналогично описанному выше.

В последние годы получил широкое распространение **тест восстановления нитросинего тетразолия** для оценки фагоцитарной активности лейкоцитов. Сущность реакции заключается в том, что зрелые гранулоциты способны фагоцитировать бесцветный краситель тетразолиевого ряда - нитросиний тетразолий (НСТ) и затем восстанавливать его в нерастворимый формазан, отличающийся темно-синим окрашиванием.

Ход определения: Венозную кровь в количестве 1 мл смешивают в пробирке с 25 ЕД гепарина. 0,1 мл гепаринизированной крови, обогащенной лейкоцитами, смешивают с равным количеством раствора НСТ в фосфатном буфере. Смесь инкубируют сначала в воздушном термостате при 37°C в течение 20 мин., а затем 20 мин. при комнатной температуре. Следует строго придерживаться постоянного времени инкубации, так как наряду с другими факторами

срок инкубации оказывает решающее влияние на показатели восстановления НСТ нейтрофилами. После инкубации осторожно делают мазки на предметных стеклах, которые окрашивают по Паппенгейму-Крюкову. Затем исследуют 100 нейтрофилов; НСТ — позитивными считают клетки с крупными и мелкими темно-синими зернами формазана. Результат теста выражают в процентах нейтрофилов, способных восстанавливать НСТ.

Необходимое оборудование и реактивы: лабораторный микроскоп, стерильные пробирки, пипетки, предметные стекла, 0,2%-ный раствор НСТ в изотоническом растворе хлористого натрия (он может храниться в холодильнике при +4°C в течение 10 дней); 0,15 М фосфатный буфер (рН-7,2). Раствор НСТ в фосфатном буфере готовят непосредственно перед опытом путем смешивания равных количеств 0,2%-ного раствора НСТ и 0,15 М фосфатного буфера.

Учет реакции: При определении антимикробного потенциала нейтрофилов, отражающего бактерицидный эффект пероксидазных систем, в мазках крови под иммерсией подсчитывают 100 гранулоцитов и определяют интенсивность отложения в цитоплазме формазана в виде гранул темно-синего цвета. Для оценки используют 4 степени восстановления нитросинего тетразолия: нулевая степень - отсутствие гранул формазана в цитоплазме; первая - наличие в цитоплазме единичных зерен формазана; третья - мелкие или крупные зерна формазана покрывают почти всю цитоплазму; четвертая - гранулами формазана покрыта вся цитоплазма, нередко и ядро клетки.

Литература:

Под ред. Маслянюк Р.П. Иммунологические методы исследования в животноводстве.- Львов, 1987. – 48 с.

10 ПОКАЗАТЕЛИ СПЕЦИФИЧЕСКОЙ РЕЗИСТЕНТНОСТИ ЖИВОТНЫХ

10.1 Иммуноглобулины

Иммуноглобулины относятся к семейству белков, синтезируемых клетками лимфоидной ткани в ответ на антигены различной природы. Представителями этого семейства являются сывороточные иммуноглобулины, иммуноглобулиновые рецепторы лимфоидных клеток и группа белков, представляющих собой продукты незавершенного синтеза или катаболизма иммуноглобулинов. Все эти типы иммуноглобулинов имеют общий принцип строения и функциональное родство, которое заключается в участии их как важнейшего фактора устойчивости животных к заболеваниям и обеспечения регуляции гомеостаза. Биологические функции иммуноглобулинов разнообразны. В качестве антител они способны специфически взаимодействовать с антигеном, вызвавшим их образование. Кроме того, выполняя различные эффекторные функции, такие как способность связывать комплемент, фиксироваться на клетках, избирательно проникать через клеточные мембраны и др.

В настоящее время выделено и описано 5 классов иммуноглобулинов: IgG, IgM, IgA, IgD, IgE, отличающихся по биологическим, физико-химическим и антигенным свойствам. Все они имеют два типа полипептидных цепей: легкие с молекулярной массой 20000 и тяжелые, молекулярная масса которых варьирует от 53000 до 75000 дальтон. Количество легких и тяжелых цепей у иммуноглобулинов различных классов неодинаково, но их соотношение всегда равно 1.

В структурном и функциональном отношении наиболее изучены иммуноглобулины класса G. Они составляют 70-80% сывороточных глобулинов у животных. Их молекулярная масса равна 150-160 тыс., константа седиментации - 7S. Молекула IgG состоит из двух тяжелых и двух легких цепей. Обе имеют переменные и константные участки. Активный центр антител находится на переменном участке молекулы. В константных фрагментах располагаются участки фиксации комплемента, ответственные за прикрепление антител к клеткам, в частности, к макрофагам, лимфоцитам. В переменных фрагментах находятся участки - домены, определяющие изоантигенные различия молекул антител. IgG животных имеют несколько подклассов: IgG₁, IgG₂ в функциональном отношении составляют около 90% антител: антитоксинов, антибактериальных и противовирусных. IgG₁ проникают через эпителий молочной железы коров и играют важную роль в защите новорожденных телят от инфекции в составе молозива.

В последние годы всесторонне изучены иммуноглобулины класса M. К ним относятся такие виды антител, как опсоины, холодовые агглютинины, антистрептококковые и антипенициллиновые, нормальные противобактериальные, противовирусные и противозэритроцитарные. IgM - это сильный активатор комплементарной системы. Они образуются обычно первыми после антигенных раздражений, но вскоре заменяются антителами класса IgG. Они составляют приблизительно 10% сывороточных иммуноглобулинов. Молекулярная масса их равна приблизительно 1000000, константа седиментации - 19S. Молекулы

иммуноглобулинов класса М состоят из 5 субъединиц, аналогичных молекулам IgG, соединенных дисульфидными мостиками. Основной функциональной особенностью считают способность образовывать прочный комплекс с молекулой или корпускулой антигена, что является необходимым этапом процессов поглощения и переваривания антигенов фагоцитами.

Иммуноглобулины класса А - это так называемые: секреторные антитела. Принципиальная схема строения их молекулы напоминает молекулу IgG. В каждой молекуле имеется два активных центра, располагающихся в константных фрагментах. Молекулярная масса IgA равна 160000. Они содержатся преимущественно в различных секретах: молозиве, молоке, слюне, бронхиальном секрете, кишечнике. Основная масса их синтезируется клетками слизистых оболочек ротовой полости, дыхательных и кишечных путей, обеспечивая местный иммунитет и предохраняя организм от кишечных и респираторных заболеваний.

Что касается иммуноглобулинов классов Д и Е, то они с достоверностью обнаружены и описаны для человека и человекообразных обезьян.

Качественным и количественным определением сывороточных иммуноглобулинов пользуются в настоящее время для оценки функционального состояния В-системы иммунитета у животных. При этом применяют методы электрофореза, иммуноэлектрофореза, иммунодиффузии и осаждения солями серноокислых соединений.

Литература:

Под ред. Маслянюк Р.П. Иммунологические методы исследования в животноводстве.- Львов, 1987. – 48 с.

10.1.1 Электрофорез белков сыворотки крови в агаровом геле.

Необходимые приборы и реактивы: выпрямитель переменного тока мощностью до 500 в, кювета для разделения белков или ванночка, станок с рамкой для разлива агара на стекла (рамка размером 13x18,5 см), стеклянные пластинки размером 15x20 см, пробирки (термостойкие) на 50 мм³, водяная баня с подогревом до 100°С, стеклянные колбы для промывания и изготовления растворов (1-1,5% агар-агара), ампервольтметр для постоянного напряжения до 150 в, микропипетки на 0,05 мл, ванночки размером 18x24 см для промывания и окрашивания препаратов, буферный раствор медуна-вероналовый, рН-8,6, ионной силы амп. 0,05 а) одинарный (веронала 1,84 + медунала 10,32 г смешивают их в 1 л дистиллированной воды, кипятят на водяной бане до полного растворения ингредиентов).

Однобуферный раствор можно приготовить из двойного буфера (разведения). Для приготовления двойного буфера используют: 3,68 г веронала + 20,64 г медунала в дистиллированной воде. Содержимое перемешивают и кипятят на водяной бане до полного растворения ингредиентов. Разведением двойного буфера пополам дистиллированной водой получают одинарный буферный раствор.

Для обесцвечивания окрашенных фореграмм используют раствор уксусной кислоты: на 1000 мл дистиллированной воды добавляют 20 мл концентрированной уксусной кислоты и 15 мл глицерина.

Для фиксации разделенного белка в агаровом геле используют 0,2-процентный раствор уксусной кислоты (2 мл концентрированной уксусной кислоты в 1 л дистиллированной воды).

Окрашивание электрофореграмм осуществляют раствором амидочерного: амидочерный 10Б-0,25 г + ацетат натрия 0,1 Н-120 мл + уксусная кислота 1 Н - 120 мл + глицерин- 10 мл.

2-3%-ный раствор агар-агара готовят следующим образом: берут 20-30 г сухого продажного агара, промывают его в колбе емкостью 2-3 л в течение 2 суток в проточной воде при частом перемешивании. Затем к промытому и профильтрованному через марлю чистому агару добавляют 0,5 л дистиллированной воды и кипятят на водяной бане до полного растворения агара. После этого к раствору агара добавляют еще 0,5 л дистиллированной воды и опять кипятят в течение одного часа. Готовый раствор агар-агара в горячем состоянии разливают сквозь воронки с фильтровальными бумажками (можно через вату) в пробирки емкостью 50 мл до половины их объема. Сохраняют агар-агара в холодильнике в закрытом виде при температуре 4-5°C в течение до 3-х месяцев.

Ход определения: разогретый на водяной бане до жидкого состояния агар-агар после добавления к нему двойного буферного раствора в равном количестве выливают на обезжиренную и установленную в строго горизонтальном положении стеклянную пластинку. Перед этим края стеклянной пластинки покрывают полосками фильтровальной бумаги (5-6 см шириной) и прижимают их рамкой станка для обеспечения герметичности. Рамка может быть изготовлена из плексигласа, линолеума или эбонита, с внутренними размерами 13x18,5 см. После этого на уравновешенную пластинку выливают содержимое пробирки (50 мл) для образования равномерного слоя агар-агара толщиной 0,2 см. После застывания раствора внутренние края рамки отделяют от прилипшего агара с помощью ножа (лезвия), вынимают образовавшуюся агаровую пластинку из станка, устанавливают ее на подготовленный трафарет и по середине вырезают траншею размером 10x1 мм с интервалом 3-5 мм. Всего получается 8-9 желобков. В последние с помощью микропипетки разливают исследуемые образцы сыворотки крови в количестве 0,02 мл.

Подготовка материала для анализов. Сыворотку крови получают путем отстаивания крови в пробирке или центрифугированием при 3000 об/мин, в течение 5 мин. Пробы молока в количестве 50 мл разливают в пробирки и обезжиривают на центрифуге. Верхний слой жира отделяют от молока. К обезжиренному молоку добавляют по каплям 5%-ный раствор уксусной кислоты до осаждения казеина. Затем сыворотку отфильтровывают с помощью фильтровальной бумаги и используют для исследований. Учитывая, что в молоке коров содержится мало белка, для электрофоретического анализа используют большее количество исследуемых образцов (0,05-0,08 мл). Соответственно в агаровой пластинке пробивают в 3-4 раза большего размера желобки.

Ход электрофоретического анализа. После нанесения проб исследуемых сывороток на края агаровой пластинки накладывают сверху вторую полоску фильтровальной бумаги по размерам аналогичную первой.

Подготовка ванны: по обеим сторонам ванны в каждое корытце (их по 2 с каждой стороны) наливают одинарный раствор веронал-мединалового буфера (поровну, до 1/2 глубины). Для прохождения тока корытца с каждой стороны соединяют между собой полоской фильтровальной бумаги.

После подготовки ванночки готовую с исследуемым материалом агаровую пластинку устанавливаем на внутренние края корытца с таким расчетом, чтобы концы фильтровальной бумаги были утоплены в буферный раствор крайних корытца. Ванночку закрывают сверху плексигласовой (пластмассовой) крышкой для предотвращения испарения раствора и высыхания поверхности агаровой пластинки. Включают выпрямитель тока. Для нормального прохождения тока через раствор и агаровую пластинку и равномерного распределения белковых фракций в исследуемом материале необходимо, чтобы в течение первого часа напряжение тока было в пределах 40 в. В дальнейшем, в течение 3-х часов, напряжение тока на агаровых пластинках должно быть в пределах 70-75 в. Напряжение тока измеряют с помощью ампервольтметра.

После проведения электрофореза ток выключают, вынимают агаровую пластинку, обрезают края фильтровальной бумаги как ненужные.

Обработка агаровой пластинки сводится к помещению ее в ванночку и заливке 0,2 Н раствором уксусной кислоты на 12 ч. с последующей сменой этого раствора и дополнительным выдерживанием пластинки в нем в течение 12 ч. Затем пластинку внимательно вынимают из раствора кислоты в горизонтальном положении и высушивают при комнатной температуре или в термостате при 38-40°C. Высушенную агаровую пластинку окрашивают в кювете с помощью амидочерного красителя. В дальнейшем пластинку отмывают от краски 2%-ным раствором CH_3COOH с последующим промыванием водопроводной водой и высушиванием при комнатной температуре.

Анализ результатов исследований. Под влиянием электрического тока белки различных тканей мигрируют в направлении +электрода и распределяются в зависимости от молекулярной массы, изоэлектрической точки и других физических констант на отдельные фракции в такой последовательности: альбумины, α -, β - и γ - глобулины. Отдельные глобулиновые фракции разделяются на подфракции. В частности γ - глобулины (иммуноглобулины) у крупного рогатого скота четко подразделяются на γ_1 - и γ_2 -глобулины и по иммунохимическим свойствам соответствуют иммуноглобулинам классов G_1 и G_2 . Для определения процентного соотношения отдельных белковых фракций и выявления количества их в абсолютных величинах (из общего содержания белка) стеклянные пластинки с агаровым гелем разрезают на полоски, соответствующие отдельным фракциям и подфракциям и элюируют в растворе щелочи. Применяется расшифровка электрофореграмм на денситометре. Для этого пластины разрезают на соответствующие отдельным образцам полоски, но не на фракции. Денситометр записывает кривую на бумаге, площадь отдельных фракций которой определяют с помощью планиметра и выражают в процентах.

Литература:

Под ред. Маслянюк Р.П. Иммунологические методы исследования в животноводстве.- Львов, 1987. – 48 с.

10.1.2 Метод радиальной иммунодиффузии.

Метод разработан Дж. Фэйн и Г. Манчини для количественного определения антигенов. Он основан на взаимодействии антигена, радиально диффундирующего из лунки в агаровый гель, с гомологичными антителами, содержащимися в нем, что приводит к образованию в местах встречи реагентов специфического преципитата в виде кольца. При этом диаметр кольца преципитации, образующегося при внесении исследуемой сыворотки в лунки, вырезанные в слое агара, в котором предварительно диспергирована моноспецифическая сыворотка, прямо пропорционален концентрации исследуемого иммуноглобулина. Содержание иммуноглобулинов определяют относительно стандартной сыворотки крови животных с известной концентрацией иммуноглобулинов.

Необходимые приборы и реактивы: центрифуга на 1000 и 3000 об/мин., П-образные рамки из пластика, линолеума толщиной 1 мм, игла-пробойник с внутренним диаметром 2 мм, пробирки, пипетки, стаканы, термостойкие колбы, спирт, эфир, мединал, веронал, физиологический раствор, агар-агара, краситель амидо-черный, глицерин, ледяная уксусная кислота, моноспецифическая сыворотка крови животного, бумажный трафарет с разметкой лунок, микрошприц на 2 мкл, эксикаторы, полулогарифмическая линейка (бумага), измерительный циркуль (штангенциркуль), прищепки.

Ход определения. Стеклопластинки размером 9x12 см (возможно использование отмытых фотопластинок) покрывают равномерным слоем смеси «агар-моноспецифическая сыворотка». Для этого на пластину помещают П-образную рамку из пластика или другого материала толщиной 1 мм, сверху помещают вторую стеклянную пластинку, смоченную гидрофобной жидкостью (глицерином), и пространство между пластинами заливают смесью агара и антисыворотки в количестве 9 мл.

Для получения смеси агар-антисыворотка берут 3%-ный агар или агарозу и смешивают при 56°C в соотношении 1:1 с антисывороткой, в которой концентрация антител вдвое превышает рабочий титр (титр в РИД), указанный на ампуле. Разведения антисыворотки делают на 0,1 М веронал-мединаловом буфере с pH-8,6. После застывания агара с антисывороткой (через 20-30 мин.) скользящим движением сдвигают верхнее стекло и снимают рамку; на нижнем стекле остается ровный слой агара толщиной 1 мм.

В слое агара + моноспецифическая сыворотка пробойником вырезают лунки диаметром 2 мм на расстоянии 15 мм одна от другой, подкладывая под стекло специальный трафарет. На каждом стекле размещается 30 лунок. В лунки первого ряда вносят с помощью микрошприца по 2 мкл стандартной сыворотки неразведенной и в разведении 1:2, 1:4, 1:6. Такие разведения стандартной сыворотки необходимы для построения калибровочной кривой. Оставшиеся лунки заполняют сывороткой исследуемых животных в том же объеме (2 мкл). Поскольку проводится определение трех классов иммуноглобулинов, то соответственно осуществляется заливка агара с каждой моноспецифической сывороткой на трех пластинах одновременно. Пластины инкубируют во влажной камере в течение 24 ч. Для иммуноглобулинов класса G и A, а пластины с анти-M-сывороткой - 48 ч. По окончании инкубации при комнатной температуре

пластины промывают физиологическим раствором для прекращения диффузии, высушивают и окрашивают амидо-черным. После окрашивания стекла ополаскивают и подсушивают на воздухе.

Анализ результатов исследований. Диаметр колец преципитации измеряют с помощью измерительного циркуля, штангенциркуля. Уровень иммуноглобулинов определяют по калибровочной кривой, выражающей зависимость между уровнем иммуноглобулинов и диаметром колец преципитации. Построение калибровочной кривой проводится на основании измерения колец преципитации первых четырех лунок, в которых находилась стандартная сыворотка с известным содержанием иммуноглобулинов (на каждой коммерческой пробе указана концентрация отдельного класса иммуноглобулина в МЕ или мг/мл). На полулогарифмической линейке или бумаге по оси абсцисс откладывают диаметр колец стандартной сыворотки, а по оси ординат - известное количество иммуноглобулина в МЕ или мг/мл, содержащееся в стандартной сыворотке каждого разведения. Образовавшиеся точки соединяют прямой. Таким образом строят графики для каждого иммуноглобулина в отдельности. Во избежание ошибок желательно придать наклон этой кривой на 40-50°. В тех случаях, когда диаметр колец исследуемых сывороток превышает диаметр кольца неразведенной стандартной сыворотки, испытуемые образцы следует разводить. Для определения концентрации иммуноглобулинов в исследуемой сыворотке измеряют кольцо преципитации вокруг соответствующей лунки и откладывают его на оси абсцисс графика калибровочной кривой. Затем восстанавливают перпендикуляр до пересечения с кривой и точкой пересечения проецируют на ось ординат. Полученное значение соответствует уровню иммуноглобулина, выраженному в МЕ или мг/мл.

Оценка результатов. В норме содержание иммуноглобулинов варьирует у различных животных, а их уровень зависит от возраста, пола, физиологического состояния, условий внешней среды и др. Поэтому параметры нормальных значений у той или иной особи должны определяться в сыворотке их крови с учетом вышеизложенных факторов.

Для количественного определения иммуноглобулинов крупного рогатого скота можно пользоваться также методикой, описанной Е. В. Чернохвостовой, Г. П. Герман и С. Я. Гольдерман (1975), предусматривающей применение моноспецифических антисывороток к белкам человека, изготовленных на кроликах и овцах, поскольку у них выражены перекрестные реакции. Особенно отчетливо выражена активность антисывороток к М и А-антителам. При использовании коммерческих иммунных сывороток следует давать предпочтение тем, которые содержат антитела не к цельной молекуле иммуноглобулинов, а к ее тяжелым цепям, поскольку они у всех белков постоянны и дают четкие перекрестные реакции, независимо от видовой принадлежности.

Литература:

Под ред. Маслянюк Р.П. Иммунологические методы исследования в животноводстве.- Львов, 1987. – 48 с.

10.1.3 Метод дискретного осаждения.

Данный метод описан М. А. Костына (1983) и может быть использован в любой научно-производственной лаборатории.

Определение иммуноглобулинов класса М. В мерной колбе на 1 л растворяют 0,28 г веронала, 0,21 г мединала и 0,024 г сернокислого цинка в бидистиллированной воде. Перед окончательным доведением раствора до метки проверяют рН, которое должно быть 7,5. Раствор хранят без доступа углекислоты воздуха.

Ход определения: К 6 мл цинкового раствора добавляют 0,1 мл исследуемой сыворотки и нефелометрируют. По оптической плотности определяют количество иммуноглобулинов класса М (макроглобулинов).

Для определения иммуноглобулинов класса А готовят реактив, в 1 л которого содержится 189,0 г сернокислого аммония и 29,3 г хлористого натрия. Реакция нейтральная; реактив хранится длительное время в закрытой посуде.

Ход определения: К 6 мл реактива добавляют 0,1 мл исследуемой сыворотки и нефелометрируют. По полученной оптической плотности и с помощью калибровочного графика находят количество иммуноглобулинов класса А. Для построения графика используют эталонные иммунные сыворотки крови человека и животных с заведомо известной концентрацией иммуноглобулина.

Например: в одной ампуле (1 мл) эталонной сыворотки содержится иммуноглобулинов класса:

| | | | |
|-----|-------|-----------|-----------|
| G — | 11,94 | мг/мл или | 1194 мг/% |
| M — | 1,33 | мг/мл или | 133 мг/% |
| A — | 1,88 | мг/мл или | 188 мг/% |

Берут одну стандартную ампулу сыворотки и добавляют 1 мл дистиллированной воды, растворяют без вспенивания. Затем ставят 9 пробирок, в которые предварительно было налито по 1 мл физиологического раствора. 1 мл раствора сыворотки переносят в 1-ю пробирку, тщательно перемешивают, затем берут 1 мл этого раствора и переносят во 2-ю пробирку и т. д. В 9-ой пробирке после перемешивания получают 2 мл. Таким образом добиваются нужного количества разведения стандартного раствора с заранее известным количеством белка. Оптическую плотность раствора измеряют на ФЭКе при длине волны 400 ± 5 им с использованием кювет на 10 мм. Контролем служит пробирка с теми же растворами, но без сыворотки.

Определение иммуноглобулинов класса G проводят в двух пробирках. Для первой пробирки готовят цинк-салициловый реактив большой ионной силы, в 1 мл которого содержится 1,875 г сульфата цинка и 57,14 г салицилового натрия. Значение рН такого раствора должно быть 7,3. В реакции первой пробирки используют сыворотку, из которой удалены бета-липопротеиды, поскольку они также осаждаются цинк-салициловым раствором и повышают показатели. Для их удаления нужно налить в пробирку 2 мл 0,025 М хлористого кальция, прибавить к нему 0,2 мл исследуемой сыворотки и 0,04 мл 1%-ного раствора гепарина. Смесь перемешивают, при этом раствор мутнеет от выпадения в осадок бета-липопротеидов. Эту смесь ставят на 30 мин. в холодильник для усиления реакции флоккуляции, а затем осадок отделяют центрифугирова-

нием 20 мин. при 4000 об/мин. Полученный супернатант используют для реакции в количестве 1,1 мл, что соответствует 0,1 мл нативной сыворотки крови. К 5 мл цинк-салицилового реактива прибавляют 1,1 мл супернатанта, при этом иммуноглобулины класса G интенсивно выпадают в осадок. В дальнейшем производят нефелометрическое измерение и по оптической плотности определяют количество иммуноглобулина.

В случае отсутствия прибора в условиях фермы количество иммуноглобулинов можно примерно определить визуально. Для этого в каждую руку берут по две пробирки (опытную и контрольную) и в зависимости от степени помутнения, рассматривают на темном или светлом фоне. Оценку помутнения на каждом фоне выражают в трех характеристиках: слабо выраженное, удовлетворительно и хорошо выраженное. Эти данные используют для ориентировочного определения концентрации иммуноглобулинов по калибровочной таблице (см. табл.).

Для определения концентрации иммуноглобулинов в молозиве, его вначале обезжиривают путем центрифугирования при 3000 об/мин, в течение 30 мин. Затем центрифужные пробирки ставят в морозильную камеру холодильника на 15-20 мин. для застывания жира. Последний удаляют проволоочной петлей. В зависимости от густоты, обезжиренное молозиво разбавляют дистиллированной водой в 5-10 раз и добавляют по каплям 10%-ный раствор уксусной кислоты до появления сгустка казеина. Сыворотку фильтруют через бумажный фильтр. Следует помнить, что в кислой реакции выделение иммуноглобулинов не происходит, поэтому сыворотку необходимо довести до нейтральной или слабокислой реакции 10%-ным раствором едкого натрия. Контролируют этот процесс рН-метром или универсальной индикаторной бумажкой. Полученные данные умножают на степень разведения молозива.

Калибровочную таблицу для колориметрического и визуального определения количества иммуноглобулинов получают путем разведения стандартной сыворотки животных или человека с заведомо известной концентрацией этих белков. Из такой сыворотки готовят несколько серий разведений и проводят реакцию с цинк-сульфатным раствором, как было указано выше.

По изменению уровня иммуноглобулинов в крови, молозиве, молоке и других тканях можно судить о поражении В-системы иммунитета или ее отдельных звеньев. Целый ряд заболеваний и нарушений обменных процессов различной этиологии сопровождается лимфопенией и гипогаммаглобулинемией, что приводит к развитию той или иной степени дефицита иммунной системы, называемой вторичным иммунодефицитом. Одним из показателей этого состояния является снижение концентрации всех или отдельных классов иммуноглобулинов в периферической крови.

Существует множество врожденных и приобретенных дисгаммаглобулинемий, для которых характерно изменение нормального соотношения отдельных классов иммуноглобулинов в сыворотке крови животных. Так, при введении кортикостероидов, антимаболитов, биологически активных веществ, в действии ионизирующей радиации доля IgG и IgA снижается или они полностью отсутствуют при значительном повышении содержания макроглобулинов

- IgM. Нарушение синтеза иммуноглобулинов класса А при нормальном или несколько повышенном содержании IgG и IgM отмечается у животных при заболеваниях желудочно-кишечного и респираторного тракта.

Количественное исследование иммуноглобулинов дает возможность судить о функциональной активности различных по локализации лимфоидных органов: селезенка, лимфатические узлы, пейеровы бляшки (ответственных в основном за биосинтез IgM и IgG). Определение уровня иммуноглобулинов абсолютное диагностическое значение имеет только при гипергаммаглобулинемиях или при селективном дефиците одного или несколько классов иммунных глобулинов.

При всех других состояниях организма оно имеет только вспомогательное значение, отражая изменение иммунологического статуса различных животных под действием различных повреждающих факторов, в том числе патогенного агента и его динамику в процессе лечения.

Литература:

Под ред. Маслянюк Р.П. Иммунологические методы исследования в животноводстве.- Львов, 1987. – 48 с.

10.2 Т- и В-системы иммунитета

Представление о том, что лимфоцит является центральной фигурой иммунной системы, является общепризнанным. Лимфоциты состоят из нескольких клеточных популяций, отличающихся друг от друга в морфологическом и функциональном отношении. Различают тимусзависимые - Т-лимфоциты, реализующие клеточные механизмы защиты, и тимуснезависимые или бурсозависимые - В-лимфоциты, осуществляющие иммунный ответ гуморального типа. Предшественником того и другого типа лимфоцитов является недифференцированная стволовая клетка, генерируемая костным мозгом. Стволовые клетки, поступающие в тимус, размножаются в нем и дифференцируются в Т-лимфоциты (timoциты). Они заселяют тимусзависимые участки лимфоузлов и селезенки. Другая часть стволовых клеток дифференцируется в В-лимфоциты под влиянием сумки Фабрициуса у птиц и неизвестного еще аналога у млекопитающих (наиболее вероятным претендентом на эту роль является костный мозг или лимфоидные структуры пищеварительного тракта). В-клетки заселяют тимуснезависимые зоны лимфоузлов и селезенки.

Исследования последних лет показали, что и сами популяции Т- и В-лимфоцитов не являются однородными. Среди Т-клеток различают ряд субпопуляций (Т₁, Т₂, Т₃). Аналогичные субпопуляции описаны также и среди В-лимфоцитов.

В-лимфоциты принимают активное участие в синтезе всех известных антител при обязательном участии Т-клеток, выступающих в роли инициаторов антителообразования. Результатом совместной работы этих клеток является синтез антител и иммуноглобулинов против всевозможных антигенных раздражителей.

Таким образом, от функционального состояния В-системы иммунитета зависит выраженность гуморальных механизмов защиты, то есть синтез специфических белков, обеспечивающих устойчивость животных к заболеваниям.

Функция Т-системы иммунитета более обширна: наряду с реализацией иммунного ответа клеточного типа они принимают участие в синтезе гуморальных антител (кооперация с В-клетками), способны влиять на характер и скорость нормальной дифференцировки других клеток в организме.

Литература:

Под ред. Маслянюк Р.П. Иммунологические методы исследования в животноводстве.- Львов, 1987. – 48 с.

10.2.1 Методы определения Т- и В-лимфоцитов

Наличие различных маркеров и рецепторов на поверхности лимфоцитов позволяет дифференцировать их друг от друга. Одним из характерных признаков Т-лимфоцитов животных является присутствие на их поверхности рецепторов для эритроцитов.

В-лимфоциты на клеточной мембране помимо собственных иммуноглобулинов содержат рецепторы для Fc-фрагмента и третьего компонента комплемента (C₃). Определение этих функциональных группировок и положено в основу методов определения количества Т- и В-клеток в крови.

Определение числа Т-лимфоцитов у животных проводят чаще всего с помощью метода спонтанного розеткообразования с эритроцитами барана. Клетки, образующие такие розетки, называются розеткообразующими. Доказательством того, что розеткообразующие клетки являются тимусзависимыми, служат следующие факты:

1. Среди клеток тимуса содержится почти 100% Е-РОК.
2. Антилимфоцитарная сыворотка, повреждающая преимущественно Т-лимфоциты, угнетает спонтанное розеткообразование.
3. При одновременном применении методов иммуофлюоресценции и розеткообразования ни в одном случае клетки, несущие поверхностные иммуноглобулины, не образовывали розетки к эритроцитам барана.
4. Обогащение популяции клеток Е-РОК приводит к усилению ответа на фитогемагглютинин (ФГА).

Розеткообразование представляет собой активный процесс и является функцией живых клеток, поэтому определение числа Т-лимфоцитов необходимо проводить сразу после взятия крови.

В-лимфоциты обнаруживают путем выявления на их поверхности либо рецепторов к Fc-фрагменту иммуноглобулинов и C₃, либо иммуноглобулиновых рецепторов. К рецептору для Fc-фрагмента иммуноглобулинов обычно присоединяется комплекс антиген-антитело-комплемент. В качестве антигена-индикатора чаще всего используют эритроциты. Эритроциты, сенсibilизированные антителами (ЕА) или антителами и комплементом (ЕАС), связываются с соответствующим рецептором В-лимфоцитов и образуют розетки. В первом случае они называются ЕА-РОК, во втором - ЕАС-РОК. ЕАС-роетки способны образовывать, в основном, В-лимфоциты. Это подтверждается такими фактами.

1. ЕАС-РОК отсутствуют в тимусе.
2. Они локализуются в В-зависимых областях лимфоидных органов.
3. Удаление из взвеси лимфоидных клеток ЕАС-РОК приводит к снижению числа клеток, содержащих на поверхности мембраны иммуноглобулины.

Метод ЕАС-розеткообразования позволяет определить число В-клеток у животных различных видов.

Необходимые реактивы и оборудование: гепарин, 10%-ный раствор желатина, 3%-ный раствор уксусной кислоты, среда 199, раствор Хенкса, 0,02%-ный раствор (в дистиллированной воде) акридинового оранжевого, 40%-ный формалин, гемолитическая сыворотка против эритроцитов барана, свежая мышьяная сыворотка, краска Романовского-Гимза, эритроциты барана и быка, пробирки с круглым дном меланжеры эритроцитарные и лейкоцитарные, предметные стекла, чашки Петри, камера Горяева, градуированные пипетки, микропипетки, центрифуга.

Определение числа Т- и В-лимфоцитов в крови животных проводятся в несколько этапов.

Методика выделения лимфоцитов из крови. Прежде всего необходимо подсчитать число лимфоцитов и дифференциальную формулу крови. Для этого 3-5 мл венозной крови вносят в пробирки с гепарином (из расчета 25 Ед/мл крови). Из гепаринизированной крови готовят мазки, фиксируют их метиловым спиртом или смесью Никифорова и окрашивают в течение 20 мин. по Романовскому-Гимзе. После подсчета формулы крови и общего числа лейкоцитов (меланжерным способом) определяют процент лимфоцитов.

Затем в пробирки с гепаринизированной кровью добавляют 10%-ный раствор желатина (из расчета 0,1 мл на 1 мл крови) и ставят смесь под углом 45°С в термостат. Через 40-45 мин. надсадочную жидкость отсасывают в пустую пробирку. Полученную клеточную взвесь дважды отмывают раствором Хенкса при 1000 об/мин, в течение 5 мин. (рН 7,2-7,4). Затем в ней вновь подсчитывают число лейкоцитов и доводят их концентрацию средой 199 до 2×10^6 в 1 мл. Выделенные клетки можно использовать для определения количества РОК. Однако, среди них, помимо лимфоцитов, будут присутствовать моноциты, нейтрофильные гранулоциты, эритроциты.

В дальнейшем выделяют из крови пул мононуклеарных клеток путем центрифугирования в градиенте плотности фиколл-верографина или полилюкинверографина. Смесь фиколл-верографина готовится следующим образом: 24,4 г фиколла растворяют в теплой дистиллированной воде, смешивают с 49,9 мл 75%-ного раствора верографина и доводят объем дистиллированной водой до 340 мл. Денсиметром определяют плотность раствора (она должна быть равной 1,077). Если плотность превышает указанную, то в раствор добавляют дистиллированную воду. Полученную смесь фильтруют и стерилизуют в автоклаве при температуре 120°С в течение 10 мин. Раствор хранится в холодильнике при температуре 4°С. Срок годности его не ограничен.

Смесь полиглюкин-верографин готовят так: смешивают 1 часть 75%-ного раствора верографина и 4 части 6%-ного раствора полиглюкина. Плотность раствора (она должна быть 1,113) определяют денсиметром. Стерилизуют его аналогично описанному выше.

С целью выделения мононуклеаров в градиенте плотности фиколл-верографина или полиглюкин-верографина наливают 2 мл смеси в центрифужные пробирки, после чего осторожно сверху по стенкам пробирки наслаивают

надосадочную жидкость, полученную после отстаивания крови с гепарином и желатином. Для выделения клеток не обязательно пользоваться силиконизированными пробирками. Пробирки центрифугируют в течение 30 мин. с интерфазной силой 400 g. Для определения числа оборотов центрифуги, соответствующих данной центрифужной силе, используют следующую формулу:

$$N = \frac{g \times 10^5}{1,1 \times R},$$

где N - число оборотов в минуту; g - центробежная сила; R - радиус, равный расстоянию от центра оси центрифуги до границы соприкосновения смеси фиколл-верографин с клеточной взвесью.

После центрифугирования эритроциты и гранулоциты оседают на дне, а сверху остаются мононуклеарные клетки - лимфоциты, моноциты. Надосадочную жидкость удаляют, белое кольцо, образовавшееся на границе раздела сред, осторожно отсасывают и выливают в пробирку с 5 мл раствора Хенкса. Клетки дважды отмывают раствором Хенкса при 1000 об/мин, в течение 10 мин. После этого подсчитывают число клеток и доводят средой 199 до концентрации $2 \cdot 10^6$ в 1 мл.

Подготовка индикаторов для определения Е- и ЕАК-РОК. В качестве индикаторной системы для определения Е-РОК служат эритроциты барана. Чтобы получить эритроциты, можно применять кровь одного и того же животного или же пул эритроцитов. В последнем случае их хранят в растворе Альсвера (2,05 г декстрозы, 0,8 цитрата натрия, 0,42 г хлорида натрия, 100 мл дистиллированной воды, рН раствора 6,1), подкисление проводят с помощью 10%-ного раствора лимонной кислоты. Стерилизуют раствор автоклавированием. Эритроциты можно хранить в течение 3 недель.

Перед проведением опыта берут 0,05 мл плотного осадка эритроцитов и трижды отмывают физиологическим раствором при 1500 об/мин. в течение 10 мин., после чего взвешивают в 10 мл среды 199 (получается 0,5%-ная взвесь) и используется для постановки реакции.

Индикаторной системой определения ЕАС-РОК служат эритроциты барана (при этом необходимо проводить контроль на образование Е-РОК) или эритроциты быка. В последнем случае индикаторная система пригодна для определения розеткообразующих клеток у животных других видов, кроме крупного рогатого скота. Эритроциты быка трижды промывают физиологическим раствором при 1000 об/мин, в течение 10 мин., после чего из плотного осадка готовят 5%-ную взвесь (0,2 мл осадка отмытых эритроцитов и 3,8 мл физиологического раствора). К 4 мл 5%-ной взвеси эритроцитов добавляют 4 мл кроличьей антисыворотки против соответствующих эритроцитов и инкубируют в течение 30 мин. при 37°C. После этого эритроциты вновь трижды отмывают физиологическим раствором, осадок взвешивают в 4 мл физиологического раствора и добавляют 4 мл свежей мышинной сыворотки и 3,6 мл физиологического раствора. После инкубации смеси при 37°C в течение 30 мин. эритроциты трижды отмывают физиологическим раствором. После этого эритроциты взвешивают в среде 199 и готовят 5%-ную взвесь. В таком состоянии нагруженные эритроциты можно хранить в течение 1 недели при 4°C. Этого количества

эритроцитов достаточно для исследований крови 80 животных. Для постановки опыта из 5%-ной взвеси готовят 0,5%-ную взвесь эритроцитов в среде 199.

При использовании эритроцитов барана можно пользоваться гемолитической системой против эритроцитов барана. Для обработки берут субагглютинирующую (половинную) дозу последнего разведения антисыворотки, еще вызывающую агглютинацию эритроцитов. При работе со стандартной гемолитической системой можно взять утроенный титр, вызывающий гемолиз эритроцитов. Например, при титре гемолитических антител 1:1200 готовят разведение сыворотки 1:400.

Если для реакции берут бычьи эритроциты, антисыворотки против них следует готовить самим. Получать их рекомендуется на пике первичного иммунного ответа после иммунизации кроликов бычьими эритроцитами. С этой целью кролику вводят внутривенно 20 мл 10%-ную взвесь эритроцитов быка тремя инъекциями в течение 10 ч. (10 мл первоначально и по 5 мл через 6 и 16 ч. после первой инъекции). Через 7 суток после первой инъекции у кролика берут кровь из вены и отделяют сыворотку, которую прогревают 30 мин. при 56°C для инактивации комплемента и определяют в ней титр антител и реакции геагглютинации. Сыворотку запаивают в ампулы и замораживают при -20°C. В таком виде ее можно хранить в течение 8-12 месяцев.

Проведение реакции розеткообразования. Техника постановки реакции Е- и ЕАС-РОК для определения Т- и В-лимфоцитов одинакова. В 2 пробирки вносят по 0,5 мл взвеси лейкоцитов (концентрация клеток 2×10^6 в 1 мл). В первую пробирку добавляют 0,5 мл 0,5%-ной взвеси эритроцитов барана (индикатор для Т-лимфоцитов), во вторую - 0,5 мл эритроцитов, нагруженных антителами и комплементом (индикатор для В-лимфоцитов). Смеси центрифугируют при 800 об/мин. в течение 3-5 мин., затем 5 мл инкубируют при температуре 37°C и 30 мин. при 12°C.

Объем взвеси эритроцитов и лейкоцитов можно уменьшить (до 0,1 мл), не изменяя соотношения между ними. В том случае соответственно можно уменьшить и количество взятой крови.

Учет результатов. Результаты учитывают путем подсчета РОК либо во взвеси, либо в фиксированных и окрашенных мазках.

1. При учете результатов реакции во взвеси реагирующая смесь после инкубации ресуспендируется осторожным встряхиванием пробирок по вертикали и горизонтали; ресуспендирование не должно быть излишним. После этого вносят по 0,1 мл 0,02%-ного раствора акридинового оранжевого, оставляют при комнатной температуре на 1-2 мин. и готовят препарат «раздавленная капля» (можно использовать камеру Горяева). Число РОК подсчитывают в смеси обычного и ультрафиолетового света, используя любой люминесцентный микроскоп. При этом хорошо видны ядра лейкоцитов окрашенные акридином, что позволяет отличать их от других клеток. Для освещения эритроцитов снизу подается рассеянный свет от обычного источника. Принимаются во внимание лишь те клетки, к поверхности которых прикреплено не менее 3 эритроцитов. Число РОК во взвеси учитывают после проведения реакции.

2. Учет результатов розеткообразования в мазках обычно проводится в тех случаях, когда лаборатория не имеет люминесцентного микроскопа. После инкубации в холодильнике из пробирок с реагирующей смесью удаляют надосадочную жидкость, осадок осторожно ресуспендируют. Затем пипеткой набирают взвесь клеток и переносят на предметное стекло (мазок не делают). После того, как капля растечется по поверхности стекла, его помещают в чашку Петри, на дне которой находится полоска марли, предварительно смоченная 10%-ным формалином. После фиксации клеток в течение 3-5 мин. парами формалина препарат высушивают на воздухе, дополнительно фиксируют 10 мин. метиловым спиртом и окрашивают по Романовскому-Гимзе. Фиксация мазков в парах формалина не влияет на процессы образования «розеток». Использование фиксированных препаратов позволяет подсчитывать РОК не сразу после проведения реакции, а в удобное для исследователя время. Недостаток способа заключается в том, что процесс приготовления и фиксации препарата может повлиять на течение реакции и изменить объективную картину.

Определение количества Е- и ЕАС-РОК проводят после подсчета 200 лимфоцитов. Из них определяют процент клеток, связавших 3-4 и более эритроцитов. Абсолютное содержание Е- и ЕАС-РОК в 1 мм^3 крови определяют по формуле:

$$X = A \times B \times C,$$

где А - количество лейкоцитов в 1 мм^3 крови; В - процент лимфоцитов в формуле крови; С - процент РОК (соответственно Е и ЕАС).

Уровень Т- и В-лимфоцитов у животных изменяется в связи с возрастом, физиологическим состоянием, условиями кормления и содержания, а также генетических факторов, что следует учитывать при проведении опытов.

Литература:

Под ред. Масляно Р.П. Иммунологические методы исследования в животноводстве.- Львов, 1987. – 48 с.

10.2.2 Реакция бласттрансформации лимфоцитов крови (РБТЛ)

Если тесты розеткообразования позволяют судить о количественном содержании и соотношении Т- и В-лимфоцитов в периферической крови, РБТЛ характеризует их функциональное состояние.

Трансформацию лимфоцитов наблюдал еще в 1902 г. Максимов. Однако, лишь в последние годы были разработаны тесты исследования активации, или бласттрансформации лимфоцитов и стала ясна их роль и началось выяснение их места в теоретической и практической биологии и ветеринарии.

Трансформация лимфоцитов в бласты - это процесс активации малых лимфоцитов, которые представляют собой находящиеся в состоянии покоя относительно неактивные Т- и В-лимфоциты крови. При индукции иммунного ответа на различные антигенные стимулы эти клетки, отвечая бласттрансформацией, обуславливают развитие специфического иммунитета клеточного или гуморального типа.

Для исследований функционального состояния различных субпопуляций лимфоцитов РБТЛ ставят в присутствии различных митогенов - растительных лектинов (экстракты различных растений) или токсинов микробов. Фитоген-

магглютинин (ФГА), широко используемый в настоящее время при проведении РБТЛ, представляет собой гетерогенный гликопротеид, с молекулярной массой 128000. Его получают из экстракта фасоли. ФГА обладает неспецифическим мутагенным действием, вызывает почти немедленную стимуляцию аденилатциклазы мембраны лимфоцитов, последующее быстрое увеличение внутриклеточной концентрации цАМФ, усиление синтеза РНК и ДНК и, как следствие, - бласттрансформацию клеток. Трансформации в бласты под влиянием ФГЛ подвергаются только Т-лимфоциты.

Методика постановки РБТЛ. К настоящему времени предложено несколько вариантов постановки РБТЛ. Наиболее приемлемой и распространенной представляется методика В. И. Субботиной-Чукальской.

Ход реакции. Гепаринизированную кровь (15 ЕД/мл гепарина) разливают по 0,5 мл в силиконизированные стерильные пробирки, закрытые резиновыми пробками, добавляют пенициллин и стрептомицин по 100 ЕД на 1 мл и 1,5 мл среды 199. Одна пробирка служит контролем - спонтанная бласттрансформация. Во вторую добавляют ФГЛ производства «Реанал» (Венгрия) из расчета 0,1 мл на 1 мл культуры. В остальные пробирки вносят тканевые антигены в нетоксической концентрации (2-3 мг/мл белка) по 0,1 мл на 1 мл среды. Содержимое пробирок осторожно перемешивают и помещают в термостат при температуре 37°C. После 72-120-часовой инкубации пробирки центрифугируют при 1000 об/мин. в течение 15 мин. Мазки готовят из белого осадка на поверхности эритроцитов и окрашивают их по Паппенгейму. В мазках подсчитывают 300-500 клеток, учитывая типичные бласты-клетки с крупным, центрально расположенным ядром, клетки с фигурами митоза, переходные клетки - лимфоциты с признаками трансформации, малые лимфоциты. Определяют процент бластов к общему числу сосчитанных клеток.

Динамические результаты РБТЛ помогают не только определить состояние иммунокомпетентности клеток, степень активности патологического процесса, но и контролировать эффективность проводимого лечения животных.

Использование РБТЛ в ветеринарной практике началось с гемалогии, где лимфоциты являлись субстратом болезни. Шрек и Рабинович впервые отметили, что периферические лимфоциты больных животных лимфолейкозом не реагируют на стимуляцию ФГА. В ряде опытов установлено, что лимфоциты от животных, положительно реагирующих на туберкулин при культивировании в присутствии туберкулинового очищенного белкового экстракта, подвергались усиленному митозу, тогда как лимфоциты от туберкулинотрицательных животных при культивировании в тех же условиях митозу не подвергались. Все это послужило толчком к использованию РБТЛ в присутствии ФГА и тканевых антигенов у животных и человека, страдающих аутоиммунными и различными воспалительными заболеваниями.

Изменение активности РБТЛ может быть выявлено в ветеринарной практике при заболеваниях самой различной этиологии. Причем, если спонтанная РБТЛ при этом не всегда достоверно отличается от РБТЛ здоровых животных, бласттрансформация лимфоцитов на ФГА и соответствующий тканевый анти-

ген всегда достоверно выше при обострении болезни и имеет тенденцию к нормализации на фоне адекватной терапии.

Литература:

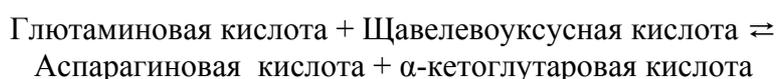
Под ред. Маслянюк Р.П. Иммунологические методы исследования в животноводстве.- Львов, 1987. – 48 с.

11 ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТОВ

11.1 Определение активности аминотрансфераз (трансаминаз)

При участии аминотрансфераз (КФ 2.6.1) в организме человека осуществляются процессы переаминирования (обратимого переноса аминокрупп аминокислот на кетокислоты). Наибольшее значение имеет исследование активности аспаратаминотрансферазы (L-аспартат: 2-оксоглутарат-аминотрансферазы; КФ 2.6.1.1) и аланинаминотрансферазы (L-аланин: 2-оксоглутарат-аминотрансферазы; КФ 2.6.1.2). Эти ферменты обладают большой каталитической активностью и широко распространены в различных органах и тканях - печени, мышце сердца, скелетной мускулатуре, почках и других.

Аспаратаминотрансфераза (АсТ) катализирует реакцию:



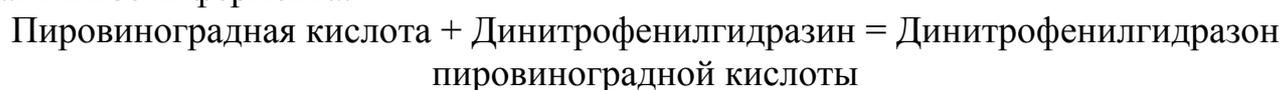
Аланинаминотрансфераза (АлТ) катализирует реакцию:



Существующие методы определения активности указанных аминотрансфераз в сыворотке крови можно разделить на две основные группы: колориметрические и спектрофотометрические.

В основе спектрофотометрических методов лежит использование оптического теста Варбурга. Эти методы являются наиболее специфичными и точными для исследования активности аминотрансфераз в сыворотке крови. Однако применение труднодоступных и дорогостоящих реактивов, а также необходимость измерения результатов на спектрофотометре не дают возможности широкого использования этих методов в клинических лабораториях.

Группа колориметрических методов основана на образовании окрашенного динитрофенилгидразона пировиноградной кислоты, освобождающейся в результате реакции переаминирования. Интенсивность окраски пропорциональна активности фермента.



Динитрофенилгидразоновые методы впервые предложили в 1950 г. Тангази, Уайт, Умбрайт. У нас в стране они получили известность в модификации Т. С. Пасхиной.

В последние годы появился облегченный и упрощенный метод Райтмана и Френкеля, основанный на том же принципе, что и способ в модификации Т. С. Пасхиной, но имеющий перед ним ряд преимуществ. Они состоят в исключении из хода определения активности ферментов: 1) перевода щавелевоуксусной кислоты в пировиноградную с применением анилина, 2) экстракции 2,4-ДНФ-гидразона пирувата толуолом. Метод Райтмана и Френкеля нашел широкое применение за рубежом. Будучи технически простым, он вместе с тем выявляет изменения активности фермента при различных заболеваниях и дает воспроизводимые результаты.

Азометоды основаны на образовании цветного соединения между щавелевоуксусной кислотой и 6-бензамидо-4-метокситолуидиндиазониевым хлоридом. Колориметрические методы этой группы просты и при наличии соответ-

вующих все еще дефицитных реактивов могут быть использованы для быстрого ориентировочного определения активности аспаратаминотрансферазы.

11.1.1 Колориметрический динитрофенилгидразинный метод исследования активности аминотрансфераз в сыворотке крови (по Райтману, Френкелю, 1957)

Принцип. В результате переаминирования, происходящего под действием АсТ и АлТ, образуются Щавелевоуксусная и пировиноградная кислота. Щавелевоуксусная кислота способна в процессе ферментативной реакции превращаться в пировиноградную кислоту. При добавлении кислого 2,4-динитрофенилгидразина энзиматический процесс останавливается и получается гидразон пировиноградной кислоты. Последний в щелочной среде дает окрашивание, интенсивность которого пропорциональна количеству образовавшейся пировиноградной кислоты.

Реактивы. 1. 0,1 моль/л фосфатного буфера, рН 7,4. Для приготовления буферного раствора смешивают 840 мл 0,1 моль/л раствора двузамещенного фосфата натрия $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (17,4 г кристаллической соли растворяют в 1 л дистиллированной воды; двузамещенный фосфорнокислый натрий, содержащий две молекулы воды, получают путем выветривания на воздухе в течение двух суток кристаллической соли, содержащей обычно 12 молекул воды; соль предварительно растирают в ступке в порошок) и 160 мл 0,1 моль/л раствора безводного однозамещенного фосфата калия KH_2PO_4 (13,6 г KH_2PO_4 растворяют в 1 л дистиллированной воды).

Буферный раствор с индикатором бромтимоловым синим (реактив 2) должен давать голубую окраску. В качестве консерванта к нему можно добавить 5-10 мл хлороформа.

2. Раствор бромтимолового синего -0,04 г/100 мл. 100 мг индикатора растворяют в ступке с 3,2 мл 0,05 н раствора едкого натра. Затем смесь смывают водой в мерную колбу емкостью 250 мл и доводят водой до метки.

3. Субстратный раствор для определения аспаратаминотрансферазы. 29,2 мг α -кетоглутаровой и 2,66 г DL-аспарагиновой кислот (при использовании вместо DL-аспарагиновой кислоты L-аспарагиновой, а вместо DL-аланина - L-аланина меру субстрата следует уменьшить вдвое) отвешивают на аналитических весах и вносят в 1 н раствор NaOH. Едкий натр приливают осторожно, небольшими порциями до полного исчезновения осадка и до получения смеси с рН 7,4 (для определения рН используют универсальную индикаторную бумагу или применяют рН-метр). Раствор переливают в мерную колбу емкостью 100 мл, ополаскивают посуду 0,1 ммоль/л фосфатным буфером (рН 7,4) и доводят им объем колбы до метки. Буферный раствор тщательно перемешивают, прибавляют 1 каплю хлороформа, разливают во флакончики из-под пенициллина и сохраняют в холодильнике в замороженном состоянии. Перед употреблением замороженный раствор следует полностью оттаять.

4. Субстратный раствор для определения активности аланинаминотрансферазы. 29,2 мг α -кетоглутаровой кислоты и 1,78 г DL-аланина (0,89 г L-аланина) отвешивают на аналитических весах. Дальше все выполняется по указаниям для первого субстратного раствора (реактив 3).

5. Раствор 2,4-динитрофенилгидразина. 19,8 мг 2,4 - динитрофенилгидразина растворяют в небольшом количестве 1 и раствора соляной кислоты при нагревании смеси на водяной бане. После того как раствор остынет, доводят его объем соляной кислотой до 100 мл. На следующий день реактив фильтруют. Раствор хранят в посуде из темного стекла в холодильнике. Годен в течение года.

6. 0,4 н NaOH, свободный от карбонатов. Реактив можно приготовить из сильно концентрированного раствора NaOH (50 г/100 мл), разбавляя его свежеекипяченой водой, свободной от карбонатов, до получения смеси с плотностью 1,016 кг/л при +20 °С или 1,018 кг/л при +15 °С. Однако предпочтительнее готовить реактив из фиксаля. Сосуды с реактивом и дистиллированной водой закрывают пробками с поглотительными трубками, наполненными натронной известью или гидроокисью бария.

7. Стандартный раствор пировинограднокислого натрия $\text{CH}_3\text{COCOONa}$. 11 мг точно взвешенного кристаллического пирувата натрия (белого цвета) растворяют в небольшом количестве дистиллированной воды, переносят в мерную колбу емкостью 100 мл и доводят объем дистиллированной водой до метки; 1,0 мл раствора содержит 110 мкг пирувата натрия, что соответствует 88 мкг пировиноградной кислоты. Раствор используют для построения калибровочного графика.

Ход определения активности аспаратаминотрансферазы (АсТ). Опытную пробу готовят следующим образом. В пробирку вносят 0,5 мл субстратного раствора и прогревают смесь при +37 °С в течение 5 мин (в практике лабораторной работы предварительный этап прогревания пробы нередко не выполняют). Затем добавляют 0,1 мл испытуемой сыворотки и пробирку помещают в термостат при +37 °С на 60 мин. После извлечения ее из термостата в содержимое пробирки доливают 0,5 мл динитрофенилгидразинового раствора, и пробы выдерживают в течение 20 мин при комнатной температуре для развития реакции. Затем добавляют 5 мл 0,4 н NaOH и после тщательного перемешивания раствора оставляют его при комнатной температуре на 10 мин для развития окраски. Оптическую плотность проб измеряют на ФЭКе с зеленым фильтром (530, 500-560 нм) в кювете с шириной слоя 10 мм. Результаты сравнивают с аналогичными данными контрольных проб.

Контрольная проба на реактивы содержит все ингредиенты опытной пробы за исключением сыворотки крови. Вместо нее берут 0,1 мл дистиллированной воды. Контрольную пробу инкубируют в тех же условиях, что и опытную.

Райтман, Френкель (1957) предлагают проводить контрольные пробы для каждой сыворотки. Контрольные пробы ставят так же, как опытные, по раствор 2,4-динитрофенилгидразина добавляют до их инкубации. Осуществление контрольной пробы для каждой сыворотки даст возможность получать более точные результаты.

Ход определения активности аланинаминотрансферазы (АлТ). В пробирку вносят 0,5 мл субстратного раствора для исследования АлТ, затем добавляют 0,1 мл испытуемой сыворотки и помещают смесь на 30 мин в термостат для инкубации при +37°С.

Дальнейший ход анализа осуществляют так же, как и при определении АсТ.

Аминотрансферазную активность сыворотки рассчитывают по калибровочной кривой. В пробирки наливают ингредиенты, указанные в табл. 14, перемешивают их, добавляют по 0,5 мл 2,4-динитрофенилгидразина и через 20 мин приливают по 5 мл 0,4 н раствора NaOH. Затем измеряют оптическую плотность проб на фотоэлектроколориметре с зеленым светофильтром (530 нм) в кюветах с шириной слоя 10 мм, сравнивают с аналогичными данными контрольной пробы, в которую вместо раствора пировиноградной кислоты добавляют дистиллированную воду.

Табл. 14 Данные к построению калибровочного графика для определения активности аминотрансфераз

| № пробирок | Стандартный раствор пирувата натрия (мл) | Содержание пировиноградной кислоты | | Дистиллированная вода (мл) | Колич. ммоль пировиноградной кислоты на 1 л сыворотки за 1 ч инкубации, выражающее активность | |
|------------|--|------------------------------------|----------|----------------------------|---|-----|
| | | (мкг) | (мкмоль) | | АсТ | АлТ |
| 1 | 0,05 | 4,4 | 0,05 | 0,55 | 0,5 | 1,0 |
| 2 | 0,10 | 8,8 | 0,10 | 0,50 | 1,0 | 2,0 |
| 3 | 0,15 | 13,2 | 0,15 | 0,45 | 1,5 | 3,0 |
| 4 | 0,20 | 17,7 | 0,20 | 0,40 | 2,0 | 4,0 |
| 5 | 0,25 | 22,0 | 0,25 | 0,35 | 2,5 | 5,0 |
| 6 | 0,30 | 26,4 | 0,30 | 0,30 | 3,0 | 6,0 |

При построении калибровочного графика на оси ординат откладывают найденную величину оптической плотности, на оси абсцисс - соответствующее ей содержание пировиноградной кислоты (ммоль).

Начиная с величины экстинкции 0,30, график, как правило, отклоняется от прямой. Для соблюдения прямой пропорции между концентрацией вещества и оптической плотностью при показателях экстинкции выше 0,30 эти сыворотки (с большой ферментативной активностью) разводят какой-либо инактивированной сывороткой. Полученные цифры умножают на величину разведения.

Перевод принятых ранее единиц ферментативной активности (норма для АсТ – 8-40 ед., для АлТ – 5-30 ед.) в ммоль пировиноградной кислоты на 1 л сыворотки за 1 ч инкубации при +37 °С производят по формулам:

$D/88$ - для аспаратаминотрансферазы,

$D \cdot 2/88$ - для аланинаминотрансферазы,

где D - показатели активности ферментов, выраженные в старой размерности (единицах ферментативной активности); 88 - коэффициент пересчета, численно равный молекулярной массе пировиноградной кислоты.

Примечания: 1. Сыворотка не должна быть гемолизирована. При хранении ее в рефрижераторе активность фермента не претерпевает существенных изменений в течение одной недели. Однако лучше всего применять сыворотку в первые двое суток.

2. Бактериальное загрязнение субстрата приводит к понижению показателей реакции. Субстрат с помутнением нельзя использовать для анализа.

3. Содержание большого количества карбоната в реактиве 6 занижает результаты. Раствор щелочи следует хранить в плотно закупоренной стеклянной посуде.

4. Раствор едкого натра добавляют в пробирку равномерно. Неравномерное доливание раствора едкого натра может стать причиной различной интенсивности окраски при одинаковом содержании кетоислоты в образце.

5. Посуда должна быть тщательно вымыта. Остатки мыльного порошка на стенках пробирки, в которую была собрана кровь или где хранится сыворотка, снижают показатели определения активности ферментов.

6. Райтман и Френкель (1957) рекомендуют строить калибровочную кривую по изменению оптической плотности, связанной с увеличением концентрации пирувата и соответственно снижением концентрации α -кетоглутарата (измеряется оптическая плотность их динитрофенилгидразонов). Л. Н. Делекторская и ряд других исследователей предлагают наиболее распространенный и упрощенный метод построения калибровочного графика - по пиринограднокислому натрию.

7. Согласно исследованиям Н. И. Панченко, Н. К. Масленниковой, Э. С. Коган (1974), следует избегать разведения сывороток более чем в 10 раз. В противном случае сказывается «эффект разведения»: непропорциональное повышение активности фермента, так, при разбавлении сыворотки больных острым гепатитом 1:200 активность возрастает (в расчете на неразведенную сыворотку) для АсТ в 28, для АлТ - в 55 раз.

8. При определении активности АлТ рекомендуется инкубировать сыворотку в течение 1 ч. а не 30 мин. поскольку в последнем случае полученный результат следует умножать на 2. Это обстоятельство тоже может привести к более высоким показателям активности АлТ, так как для данного фермента зависимость между временем инкубации и активностью не прямо пропорциональна.

В настоящее время для исследований активности аминотрансфераз в нашу страну поставляют из Чехии выпускаемые фирмой «Лахема» соответствующие наборы реактивов, рассчитанные на определение активности одного (АсТ, АлТ) или двух ферментов.

По разработкам лаборатории готовых стандартных форм ВНИИ прикладной биохимии с 1976 г. в нашей стране осуществляется выпуск наборов химических реактивов для исследования активности аспартат- и аланинаминотрансфераз в сыворотке крови. В основу анализа положен метод Райтмана и Френкеля. Количество реактивов рассчитано для проведения 200 определений.

Литература:

Колб В.Г., Камышников В.С. Справочник по клинической химии// Мн.: Беларусь, 1982. 367 с.

11.2 Определение активности фосфатаз

Фосфатазы, или гидролазы фосфомоно- и фосфодиэфиров — ферменты, отщепляющие остаток фосфорной кислоты от ее органических эфирных соединений. Их можно разделить на фосфомоноэстеразы (КФ 3.1.3) и фосфодиэстеразы (КФ 3.1.4). Первые гидролизуют простые эфиры фосфорной кислоты. В зависимости от рН, при котором проявляется их наибольшая ферментативная активность, различают кислую и щелочную фосфатазу.

Термином «щелочная фосфатаза» (фосфомоноэстераза I, фосфогидролаза моноэфиров ортофосфата; КФ 3.1.3.1) обозначают целый ряд ферментов с оп-

тимумом активности при рН от 8,6 до 10,1. Сильным активатором ее являются ионы магния.

Щелочная фосфатаза содержится практически во всех тканях человеческого организма. Особенно много ее обнаруживается в костной ткани, паренхиме печени, почек, предстательной, молочной железах и клетках слизистой оболочки кишечника. Печень удаляет фермент с желчью. Содержание щелочной фосфатазы у детей в 1,5- 3,0 раза выше, чем у взрослых.

Болгарские исследователи при электрофорезе в агаровом геле выделили пять изоферментов щелочной фосфатазы (ЩФ), специфичные для печени (печеночная, ЩФ₁), костной ткани (костная, ЩФ₂), тонких кишок (кишечная, ЩФ₃), плаценты (плацентарная, ЩФ₄, появляющаяся во второй половине беременности), желчных путей (холестатическая, ЩФ₅). Различают еще почечную фосфатазу, а также изофермент ЩФ «Реган». Этот изофермент обнаруживается у 1/6 всех онкологических больных и 1/3 тех больных, у которых отмечается повышение активности щелочной фосфатазы.

Кислая фосфатаза (фосфогидролаза моноэфиров ортофосфата; КФ 3.1.3.2) представляет собой смесь трех основных разновидностей изоферментов, обозначаемых римскими цифрами II, III, IV.

Фосфомоноэстераза II (оптимальное действие при рН 4,6) в противоположность остальным кислым фосфатазам сильно ингибируется тартратом (на этом и основывается определение простатического изоэнзима фермента); ионы магния на нее не влияют. Фосфомоноэстераза II содержится главным образом в предстательной железе. Активность кислой фосфатазы (КФ) в сыворотке крови человека невелика. Кислая фосфатаза III (рН 3,4-4,4) находится в печени и других паренхиматозных органах, кислая фосфатаза IV (рН 5,2-6,2) - в эритроцитах. Изоэнзим КФ обнаруживается также в тромбоцитах. Еще большее количество форм изоферментов кислой фосфатазы выявлено с использованием методов электрофореза. Так, благодаря их применению найдены 7 клеточно-специфичных изоферментов белой крови, 7 фракций изоферментов КФ в печени, 5 фракций изоферментов в простате, 7 фракций изоферментов в эпидидимисе, одна фракция в коже. Методом энзим-электрофореза в полиакриламидном геле обнаружено 7 фракций изоферментов у здоровых взрослых людей и 6 фракций изоферментов у здоровых детей (Н. А. Андреев, Д. П. Андерсоне, 1978).

Щелочная фосфатаза сыворотки крови стабильна, поэтому сыворотка может храниться при комнатной температуре (лучше в холодильнике) в течение нескольких дней.

Кислая фосфатаза при комнатной температуре быстро теряет свою активность. В связи с этим кровь рекомендуют центрифугировать тотчас после ее взятия. К тому же в ходе определения кислой фосфатазы в сыворотке крови нужно остерегаться гемолиза. Ее следует хранить в замороженном состоянии.

Методы исследования фосфатаз в сыворотке крови различаются по используемому субстрату и состоят в определении отщепившегося в результате ферментативного гидролиза неорганического фосфора или органического остатка (табл. 15).

Табл. 15 Методы определения активности фосфатаз крови в сыворотке

| Используемый субстрат | Авторы методов | Год опубликования методики |
|----------------------------------|----------------------------|----------------------------|
| Натриевый β -глицерофосфат | Боданский | 1933 |
| | Кей | 1930 |
| | Шиновара с сотр. | 1942 |
| Динатриевый фенолфосфат | Кинг и Армстронг | 1934 |
| | Кинд и Кинг | 1954 |
| Динатриевый р-нитрофенолфосфат | Бессей, Лоури, Брок | 1946 |
| | Г. К. Шлыгин, С. Я. Михлин | 1955 |
| | А. А. Покровский с сотр. | 1964 |
| β -нафтилфосфат | Селигмен с сотр. | 1951 |
| Фенолфталеиндифосфат | Хеггинс, Толалей | 1945 |
| Фенолфталеинмонофосфат | Бабсон с сотр. | 1966 |
| Тимолфталеинмонофосфат | Колеман и Стрже | 1966 |

Методы исследования щелочной и кислой фосфатаз рознятся только по рН применяемого буферного раствора.

Наибольшее распространение в клинических лабораториях для определения активности фосфатаз в сыворотке крови имеют методы: 1) Боданского, 2) Кинга и Армстронга. В последние годы за рубежом и в лабораториях России все чаще стал применяться паранитрофенолфосфатный метод исследования активности фосфатаз в сыворотке крови.

Метод Боданского основан на ферментативном гидролизе β -глицерофосфата с освобождением неорганического фосфора, устанавливаемого колориметрически.

Метод Кинга и Армстронга базируется на ферментативном гидролизе фенолфосфата. Выделенный в результате реакции фенол определяют колориметрически с реактивом Фолина.

Метод Бессея, Лоури, Брока основан на ферментативном гидролизе р-нитрофенолфосфата. Освобожденный р-нитрофенол в щелочной среде имеет желтое окрашивание. р-Нитрофенолфосфат, используемый в качестве субстрата в методе Бессея с сотр., обладает большей субстратной специфичностью к щелочной фосфатазе, чем другие субстраты. Щелочная фосфатаза расщепляет его в 1,15 раза быстрее, чем динатриевый фенолфосфат, в 3 раза быстрее, чем р-глицерофосфат, и в 30 раз быстрее, чем фенолфталеиндифосфат.

В ряде лабораторий сравнивались методы определения активности фосфатаз в сыворотке крови. Многие авторы отмечали высокую чувствительность и точность способа Бессея с сотр. По точности и чувствительности он не уступает методам Боданского и Кинга - Армстронга.

р-Нитрофенолфосфатному способу кроме преимуществ, касающихся специфичности применяемого субстрата, свойственны по сравнению с другими методами меньшая затрата времени и небольшое количество реактивов, по-

сколькx исследование активности фермента этим методом базируется не на специальной реакции, а на измерении интенсивности окраски р-нитрофенола, образующегося в результате ферментативного гидролиза.

Динатриевый р-нитрофенилфосфат производится отечественной промышленностью. Высокая чувствительность и относительная простота метода послужили основанием для утверждения его в качестве унифицированного при определении активности щелочной фосфатазы в сыворотке крови.

Вторым унифицированным методом исследования активности фосфатаз является способ Боданского.

Литература:

Колб В.Г., Камышников В.С. Справочник по клинической химии// Мн.: Беларусь, 1982. 367 с.

11.2.1 Определение активности щелочной фосфатазы в сыворотке крови по гидролизу р-нитрофенилфосфата (метод Бессея, Лоури, Брока)

Принцип. Субстрат р-нитрофенилфосфат натрия гидролизуется ферментом сыворотки крови с образованием р-нитрофенола, дающего в щелочной среде желтое окрашивание. Интенсивность окраски пропорциональна активности фермента.

Реактивы. 1. Раствор р-нитрофенилфосфата натрия (субстрата) в 0,001 н растворе соляной кислоты-0,4 г/100 мл, рН 6,5-8,0. Так как в продаже чаще имеется бариевая соль р-нитрофенилфосфата, то перевод ее в натриевую осуществляется следующим образом. К мере р-нитрофенилфосфата бария, соответствующей получению 0,9 г/100 мл раствора и помещенной в фарфоровую ступку, добавляют небольшими порциями 0,001 н раствор соляной кислоты при постоянном растирании соли в течение 10 мин. Доливанием насыщенного раствора сернокислого натрия (1 мл на 100 мл раствора) бариевую соль переводят в натриевую. Через 5 мин полученный раствор р-нитрофенилфосфата натрия фильтруют в делительную воронку, где его взбалтывают с равным объемом водонасыщенного бутанола (для удаления р-нитрофенола). После разделения слоев жидкости в указанной воронке (вверху бутанол, внизу постепенно обесцвечивающийся субстратный раствор) бутанол выливают, а субстратный раствор подвергают описанной процедуре еще 2-3 раза, пока он не станет совершенно бесцветным. Потом производят экстракцию смеси водонасыщенным эфиром.

Реактив не должен содержать свободный р-нитрофенол, отсутствие которого в субстратном растворе проверяют следующей пробой: к 1 мл субстратного раствора прибавляют 10 мл 0,02 н NaOH и колориметрируют на ФЭКе с фиолетовым светофильтром при длине волны 415 нм; экстинкция должна быть меньше 0,08. Если экстинкция больше этой величины, необходимо удалить из раствора свободный р-нитрофенол.

С этой целью реактив экстрагируют 2 или 3 раза равными объемами бутилового спирта и один раз - эфиром. Затем удаляют следы эфира выдерживанием смеси на воздухе. Бутиловый спирт и эфир должны иметь нейтральную реакцию. Если реактив не выдерживает указанного теста, то экстрагирование повторяют. Хранят раствор в холодильнике в замороженном состоянии несколько недель.

p-Нитрофенилфосфат «Эстман» содержит около 50 % инертного материала. Поэтому нужно использовать двойное количество этого препарата. Можно перекристаллизовать препарат, растворяя его в горячем 87° спирте.

Хранят раствор в холодильнике в течение 2-3 недель.

2. Буферный раствор. 0,05 моль/л глицинового буфера с добавлением катализатора $MgCl_2$ (95 мг/л). 375 мг глицина и 10 мг $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ смешивают с 42 мл 0,1 н раствора NaOH и доводят объем дистиллированной водой до 100 мл.

Вместо глицинового буфера можно использовать 0,05 моль/л вероналового буфера (рН 10,5), в который вносят хлористый магний (95 мг/л). Реактив хранят в холодильнике.

3. Субстратно-буферный раствор для исследования активности щелочной фосфатазы готовят смешиванием равных частей растворов 1 и 2 (рН данного реактива должен быть 10,5). При необходимости рН доводят раствором HCl или NaOH. Смешивание 2 мл субстратно-буферного с 10 мл 0,02 н раствора NaOH не должно давать экстинкцию более 0,1 при колориметрии на ФЭКе в кювете с толщиной слоя 10 мм и длинах волн 416 или 400-420 нм. В противном случае реактив не годен или подлежит реэкстрагированию бутанолом или эфиром. После экстракции следует снова установить рН 10,5. Хранят реактив в холодильнике в течение 2-3 дней (лучше в замороженном виде).

4. 0,02 н раствор едкого натра. Раствор готовят на дистиллированной воде, освобожденной от углекислого газа путем предварительного кипячения.

5. Стандартный раствор p-нитрофенола - $5 \cdot 10^{-5}$ моль/л. 69,6 мг химически чистого p-нитрофенола вносят в небольшое количество 0,02 н раствора NaOH и доводят этим же раствором объем до 100 мл. 1 мл основной смеси, содержащей 5 мкмоль p-нитрофенола, доливают 0,02 н раствором NaOH до 100 мл. В 1 мл полученного рабочего реактива входит 0,05 мкмоль p-нитрофенола.

Ход определения. В опытные и контрольные пробирки вносят по 1 мл субстратно-буферного раствора, прогревают их при температуре +37 °С в течение 5 мин, затем в опытные пробирки добавляют по 0,1 мл сыворотки. Содержимое пробирок перемешивают и инкубируют 30 мин при +37 °С.

После инкубации пробирки помещают в водяную баню со льдом, в контрольные пробы доливают по 0,1 мл сыворотки, затем во все пробирки интенсивной струей (для лучшего перемешивания реактивов) вносят по 10 мл 0,02 н раствора NaOH. Через 3-5 мин пробы колориметрируют на фотоэлектроколориметре с фиолетовым фильтром (400—420 нм) в кювете с толщиной слоя 10 мм. Полученные результаты сравнивают с соответствующими данными контрольных проб. Контрольные пробы проводят для каждой сыворотки.

Затем находят разность экстинкций опытной и контрольной проб и по калибровочной кривой оценивают активность фермента в мкмоль p-нитрофенола высвобожденного из натриевой соли p-нитрофенилфосфата под действием содержащейся в 0,1 мл сыворотки крови щелочной фосфатазы за 30 мин хода ферментной реакции. При пересчете данных на 1 мл сыворотки и на длительность реакции 1 ч количество мкмоль p-нитрофенола умножают на 10 и на 2. При этом получают ответ в мкмоль p-нитрофенола на 1 (ч*мл). Активность

фермента, образующего в указанных условиях 1 мкмоль р-нитрофенола, соответствует 1 ед. Бессея, Лоури, Брока. Таким образом, выраженная в ед. Бессея активность щелочной фосфатазы численно равна количеству мкмоль р-нитрофенола, которое выделилось бы в процессе часовой реакции при взаимодействии субстрата с 1 мл сыворотки.

В соответствии с требованиями новой системы единиц, активность ЩФ следует выражать количеством ммоль р-нитрофенола в пересчете на 1 л биологической жидкости за время инкубации 1 ч. Численные значения активности фермента при переводе результатов из старой системы единиц в новую не изменяются.

Для построения калибровочной кривой нужно выполнить следующее. 1, 2, 3, 5 и 7 мл рабочего стандартного раствора, содержащего соответственно 0,05, 0,10, 0,15, 0,25 и 0,35 мкмоль р-нитрофенола, с помощью 0,02 н раствора NaOH доводят до объема 11,1 мл (табл. 16) и измеряют оптическую плотность смеси. Результаты сравнивают с данными измерения оптической плотности 0,02 н раствора NaOH. Строят кривую, откладывая на оси ординат значения экстинкции, а на оси абсцисс - активность фермента в ммоль р-нитрофенола/(ч*л).

Табл. 16 Данные к построению калибровочного графика для определения активности щелочной фосфатазы

| № пробирок | Стандартный раствор р-нитрофенола (мл) | Содержание р-нитрофенола в пробе (мкмоль) | 0,02 н NaOH (мл) | Единицы Бессея. Лоури. Брока и численно соответствующие им единицы размерности (ммоль/(ч*л)) |
|------------|--|---|------------------|--|
| 1 | 1,0 | 0,05 | 10,1 | 1 |
| 2 | 2,0 | 0,10 | 9,1 | 2 |
| 3 | 3,0 | 0,15 | 8,1 | 3 |
| 4 | 5,0 | 0,25 | 6,1 | 5 |
| 5 | 7,0 | 0,35 | 4,1 | 7 |

В норме активность щелочной фосфатазы в сыворотке крови равна 0,5-1,3 ммоль/(ч*л) (или 0,5-1,3 ед. Бессея - Лоури - Брока).

Примечание. Сыворотка не должна быть гемолизирована. Кровь для определения активности щелочной фосфатазы нужно брать у обследуемого через несколько дней после прекращения приема сульфаниламидов и антибиотиков.

Исследование активности щелочной фосфомоноэстеразы в сыворотке крови диагностическим набором реактивов фирмы «Лахема» (Чехия) представляет собой унифицированный метод определения активности щелочной фосфатазы.

Литература:

Колб В.Г., Камышников В.С. Справочник по клинической химии// Мн.: Беларусь, 1982. 367 с.

11.2.2 Определение активности щелочной и кислой фосфатаз в сыворотке крови по гидролизу р-глицерофосфата (метод Боденского)

Принцип. Под действием фермента сыворотки крови р-глицерофосфат натрия подвергается гидролизу с освобождением неорганического фосфора, по которому и судят об активности данного энзима.

Реактивы. 1. Исходный раствор р-глицерофосфата. В мерную колбу на 100 мл вносят 1 г натриевой соли р-глицерофосфата и 0,85 г барбитуровоуксусного натрия (мединала), приливают около 30 мл дистиллированной воды и после полного растворения указанных реактивов объем полученного раствора доводят дистиллированной водой до метки, для консервации к нему добавляют около 3 мл толуола.

Раствор сохраняют в темном флаконе в холодильнике, его можно использовать в течение 10-15 дней.

2. Щелочной раствор р-глицерофосфата. В мерную колбу на 100 мл вносят 50 мл исходного раствора р-глицерофосфата, 2,8 мл 0,1 н раствора NaOH и после проверки pH (pH 8,6) объем смеси доводят дистиллированной водой до метки; затем наслаивают около 3 мл толуола. Раствор может храниться в холодильнике 10 дней.

3. Кислый раствор р-глицерофосфата. В мерную колбу на 100 мл вливают 50 мл исходного раствора р-глицерофосфата, 5 мл 1 н уксусной кислоты и после доведения объема смеси дистиллированной водой до метки добавляют около 3 мл толуола. pH раствора должен составлять $5,0 \pm 0,1$. Полученный реактив сохраняют в холодильнике.

4. Молибденовый раствор. 2,5 г молибденовоокислого аммония растворяют в 60 мл дистиллированной воды и фильтруют в мерную колбу на 100 мл. В другом сосуде готовят раствор серной кислоты путем добавления к 25 мл дистиллированной воды 7,5 мл концентрированной H_2SO_4 . Растворы соединяют и по охлаждению объем полученного реактива доводят дистиллированной водой до метки. Меняют раствор один раз в месяц; он не пригоден к работе, если на дне его образуется осадок.

5. 0,1 н раствор соляной кислоты (готовят из фиксаля).

6. Раствор аскорбиновой кислоты. Непосредственно перед применением 1 г аскорбиновой кислоты растворяют в 100 мл 0,1 н HCl.

7. 0,1 н раствор NaOH (готовят из фиксаля).

8. 1 н раствор уксусной кислоты.

9. Раствор трихлоруксусной кислоты - 10 г/100 мл.

10. Основной стандартный раствор фосфора. Отвешивают на аналитических весах 0,4394 г химически чистого однозамещенного фосфорнокислого калия (KH_2PO_4), предварительно высушенного до постоянного веса в эксикаторе над серной кислотой. Отвешенную меру полностью переносят в мерную колбу на 100 мл, растворяют в небольшом количестве воды и доводят объем дистиллированной водой до метки. Для консервации в приготовленный раствор добавляют несколько капель хлороформа.

Перед употреблением основной раствор разбавляют дистиллированной водой в 100 раз: 1 мл основного реактива вливают в мерную колбу на 100 мл и

доводят его объем до метки; 1 мл полученного рабочего стандартного раствора содержит 0,01 мг фосфора.

Ход определения щелочной и кислой фосфатаз. В 4 пробирки (2 опытных - для исследования активности щелочной и кислой фосфатаз и 2 контрольных - для установления содержания в сыворотке неорганического фосфора) приливают по 1 мл соответствующего (щелочного и кислого) раствора р-глицерофосфата (табл. 17). Первые 2 пробирки на несколько минут помещают в водяную баню или термостат (+37 °С) с целью прогревания раствора субстрата. Затем осторожно, избегая образования пузырьков воздуха, в пробирки вносят по 0,1 мл свежезятой сыворотки и полученную ферментсубстратную смесь инкубируют в течение 1 ч при температуре + 37 °С. Учитывая, что активность кислой фосфатазы в нормальной крови обычно весьма незначительна, иногда гидролиз соответствующей пробы проводят три часа; цифру, выражающую результат, делят на три.

Табл. 17 Определение активности щелочной и кислой фосфатаз в сыворотке крови

| Пробирки | Щелочная П ₁ | К ₁ | Кислая П ₂ | К ₂ |
|-----------------------------|-------------------------|----------------|-----------------------|----------------|
| Щелочной глицерофосфат (мл) | 1 | 1 | — | — |
| Кислый глицерофосфат (мл) | — | — | 1 | 1 |
| Термостат (+37° С, мин) | 5 | — | 5 | — |
| Сыворотка (мл) | 0,1 | — | 0,1 | — |
| Термостат (+37° С, ч) | 1 | (1) | 1 | (1) |
| ТХУ (мл) | 1,1 | 1,1 | 1,1 | 1,1 |
| Сыворотка (мл) | — | 0,1 | — | 0,1 |
| Центрифугирование (10 мин) | Через 5 мин. | Через 5 мин. | Через 5 мин. | Через 5 мин. |
| Центрифугат (мл) | 1,5 | 1,5 | 1,5 | 1,5 |
| Молибденовый раствор (мл) | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Аскорбиновая кислота (мл) | 1 | 1 | 1 | 1 |

Время термостатирования опытных проб может быть использовано для определения содержания неорганического фосфора в контрольных пробирках. Для этого к 1 мл щелочного (или кислого) раствора р-глицерофосфата приливают 1,1 мл раствора трихлоруксусной кислоты, после чего добавляют 0,1 мл той же сыворотки; пробы взбалтывают и через несколько минут фильтруют или центрифугируют.

К 1,5 мл отобранного фильтрата (центрифугата) доливают 1 мл молибденового раствора, 1 мл раствора аскорбиновой кислоты, пробы выдерживают в течение 10 мин при комнатной температуре, после чего колориметрируют на ФЭЖе с красным светофильтром в кювете с шириной слоя 5 мм. При учете оптической плотности проб в качестве раствора для сравнения используют дистиллированную воду (вместо нее лучше использовать пробу на реактивы, содержащую р-глицерофосфат).

Рассчитывают активность щелочной и кислой фосфатаз по калибровочной кривой. В 6 пробирок приливают 0,6; 1,2; 2,4; 3,6; 4,8 и 6 мл стандартного рабочего раствора неорганического фосфора (табл. 18), содержащего соответственно 0,006; 0,012; 0,024; 0,036; 0,048 и 0,06 мг фосфора.

Табл. 18 Данные к построению калибровочной кривой для определения активности фосфатаз

| Реактивы | Номера пробирок | | | | | |
|---|-----------------|-----|-----|-----|-----|-----|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
| Рабочий раствор Р (мл), содержащий фосфор (мг) | 0,6 | 1,2 | 2,4 | 3,6 | 4,8 | 6,0 |
| Раствор ТХУ (мл) | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 |
| Вода дистиллированная (мл) | 5,9 | 5,3 | 4,1 | 2,9 | 1,7 | 0,5 |
| Объем отобранной (после взбалтывания) смеси (мл) | 1,5 | 1,5 | 1,5 | 1,5 | 1,5 | 1,5 |
| К содержимому всех пробирок добавляют | | | | | | |
| молибденовый раствор (мл) | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 |
| аскорбиновую кислоту (мл). | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 |

Во все пробирки добавляют по 2,5 мл раствора трихлоруксусной кислоты, а затем такое количество дистиллированной воды, чтобы общий объем в каждой пробирке стал равен 9 мл (соответственно доливают 5,9; 5,3; 4,1; 2,9; 1,7; 0,5 мл дистиллированной воды).

Из каждой пробирки отбирают по 1,5 мл содержимого, добавляют по 1 мл молибденового реактива, по 1 мл раствора аскорбиновой кислоты.

Через 10 мин после приливания молибденового реактива пробы колориметрируют на ФЭЖе с красным светофильтром в кювете с толщиной слоя 5 мм. Результаты сравнивают с аналогичными данными при фотометрировании дистиллированной воды (наличие в пробах р-глицерофосфата низкого качества может служить причиной возникновения более или менее выраженной окраски контрольной пробы).

При построении калибровочной кривой на оси абсцисс откладывают цифры содержания фосфора в 1,5 мл раствора (для 1, 2, 3, 4, 5 и 6-й проб - 0,001; 0,002; 0,004; 0,006; 0,008; 0,010 мг), а на оси ординат - соответствующие им значения экстинкции.

В качестве единицы масштаба на оси абсцисс желательно брать не менее 20 мм: в этом случае график получается более крупный, а возможная ошибка, связанная с его построением, уменьшается.

Активность фосфатазы ранее выражалась количеством мг неорганического фосфора, образующегося в результате деятельности всей фосфатазы, заключенной в 100 мл сыворотки (единицы Богданского).

Для этого по калибровочной кривой рассчитывают число мг неорганического фосфора в опытных (Π_1 и Π_2) и контрольных (K_1 и K_2) пробах. Затем, вычтя из показателей содержания фосфора в опытных пробах количество неорганического фосфора, найденное в контрольных пробах, определяют то количество фосфора, которое освободилось при деятельности фосфатазы, заключен-

ной в 0,1 мл сыворотки. Очевидно, под влиянием ферментативной активности фосфатазы, содержащейся в 100 мл сыворотки, неорганического фосфора выделилось бы в 1000 раз больше.

Отсюда активность щелочной (1) и кислой (2) фосфатаз рассчитывают по следующим формулам:

$$(P_1 - K_1) * 1000 = a \text{ ед. Боданского (1),}$$

$$(P_2 - K_2) * 1000 = a \text{ ед. Боданского (2),}$$

где P_1, P_2 (K_1, K_2) - количество неорганического фосфора, содержащегося в опытных (и контрольных) пробах; 1000 - коэффициент пересчета; а - количество единиц Боданского (ВЕ).

Хочется подчеркнуть, что приведенный способ выражения активности фосфатаз (в ед. Боданского) является устаревшим.

Приказ об унификации лабораторных методов исследования и введение новой системы единиц требуют определять активность этих ферментов по количеству выделенного неорганического фосфора (в ммоль) при действии на субстрат 1 л сыворотки за время инкубации 1 ч при +37°C.

Пересчет активности фермента в ммоль неорганического фосфора, образовавшегося в результате инкубации 1 л сыворотки в течение 1 ч при +37°C, производится по следующей формуле:

$$(a * 1,47 * 10^4) / 31,$$

где а — количество мг неорганического фосфора, найденное по калибровочному графику; $1,47 * 10^4$ - коэффициент пересчета с 0,068 мл на 1 л сыворотки; 31 - масса 1 ммоль неорганического фосфора (мг).

Более удобно на оси абсцисс калибровочного графика отложить; готовые значения активности фермента, в которых уже предусмотрен пересчет результатов по приведенной формуле на ммоль/(ч*л).

Примечание.

Анализ должен быть произведен не позже 24 ч после взятия крови.

Не рекомендуется вести определение активности фермента в сыворотке с признаками гемолиза.

Литература:

Колб В.Г., Камышников В.С. Справочник по клинической химии// Мн.: Беларусь, 1982. 367 с.

12 СПОСОБЫ ИЗУЧЕНИЯ АНТИОКСИДАНТНОГО СТАТУСА ОРГАНИЗМА

12. 1 Оценка антиокислительной активности (АОА) плазмы крови с применением желточных липопротеидов

Многие патологические состояния - гипоксия, старение, стресс, злокачественные новообразования, воспалительные заболевания органов брюшной полости и легких, инфаркт миокарда - сопровождаются изменением уровня перекисного окисления липидов (ПОЛ).

Уровень ПОЛ, например липидов плазмы крови, определяется, с одной стороны, процессами радикало- и перекисеобразования, а с другой - состоянием эндогенных систем антиоксидантной защиты, поэтому оценка антиокислительной активности (АОА) этих систем имеет практическое значение.

АОА плазмы крови обусловлена наличием в ней антиокислителей; ферментных систем обезвреживания перекисей и свободных радикалов, SH-соединений, стероидных гормонов, α токоферола, церулоплазмина, трансферрина и др. Механизм действия присутствующих в плазме ингибиторов перекисидации липидов и их вклад в общий антиокислительный потенциал плазмы различны. Однако для клинической практики важно не столько учесть вклад того или иного эндогенного антиоксиданта, сколько оценить резервы антиоксидантной защиты крови в целом.

Общая АОА плазмы крови может быть определена по величине торможения перекисления липидов какой-либо модели. В качестве субстрата окисления в моделях используют: эмульсию линолевой кислоты, суспензию липосом, мембраны эритроцитов, гомогенат мозга. Применение таких моделей в клинике ограничено нестабильностью или труднодоступностью субстрата.

В данной методике для исследования АОА плазмы крови использовали модельную систему, представляющую собой суспензию липопротеидов желтка куриных яиц. Выбранная модель имеет преимущества: она доступна, выделение липопротеидов осуществляется легко, модель стабильна при хранении и вместе с тем обладает высокой окисляемостью.

Суспензию желточных липопротеидов (ЖЛП) получают путем гомогенизации желтка куриного яйца, содержащего два типа липидно-белковых комплексов, соответствующих по липидному и белковому составу очень низкой и низкой плотности плазмы крови, в равном объеме фосфатного буфера (40 мМ KH_2PO_4 , 105 мМ KCl , рН 7,45). Полученную суспензию перед использованием разводят в 25 раз тем же буфером. Суспензию можно хранить при 4°C в течение недели.

Анализ проводят следующим образом. К 1 мл суспензии ЖЛП добавляют 0,5-1 мл плазмы крови или другого исследуемого материала и 7 мл фосфатного буфера. ПОЛ во всех пробах инициируют добавлением 1 мл 23 мМ раствора $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, который готовят перед употреблением, конечный объем пробы составляет 10 мл. Контрольная проба плазмы крови не содержит. В нулевую пробу добавляют только фосфатный буфер и раствор Fe^{2+} . Пробы инкубируют при 37°C в течение 15 мин при интенсивном перемешивании. Скорость ПОЛ определяют по количеству полученных в образце продуктов, реагирующих с тио-

барбитуровой кислотой (ТБК). После инкубации отбирают по 2 мл из каждой пробы, приливают по 1 мл 20 % ТХУ и 0,1 мл 10^{-2} М раствора ионола в этаноле. Затем содержимое пробирок перемешивают и центрифугируют 15 мин при 900 g на центрифуге ОПН-3. К 2 мл полученного супернатанта добавляют 1,8 мл ТБК-реагента (0,5 % ТБК в 0,3 % растворе додецилсульфата натрия). Смесь инкубируют в кипящей водяной бане в течение 15 мин. Далее пробирки охлаждают, добавляют по 2 мл хлороформа и после интенсивного встряхивания вновь центрифугируют при тех же условиях.

В водной фазе измеряют оптическую плотность контрольной и опытных проб против контрольной пробы при длине волны 532 нм. АОА плазмы крови рассчитывают по формуле:

$$AOA = \frac{\Delta D_k - \Delta D_{пл}}{\Delta D_k} \cdot 100\%,$$

$$\text{где } \Delta D_k = D_k^t - D_k^0, \Delta D_{пл} = D_{пл}^t - D_{пл}^0$$

$D_k^0, D_{пл}^0$ — оптическая плотность, измеренная в суспензии ЖЛП и суспензии ЖЛП с плазмой крови до инкубации; $D_k^t, D_{пл}^t$ — оптическая плотность, измеренная в тех же образцах в момент времени t (через 15 мин инкубации). Измерение ΔD_k и $\Delta D_{пл}$ необходимо для того, чтобы учесть исходную степень окисленности суспензии ЖЛП и плазмы крови. Ошибка метода не превышает 5 %.

Литература:

Клебанов Г. И. Оценка антиокислительной активности плазмы крови с применением желточных липопропротеидов // Лаб. дело. - 1988. - № 5. - С. 59-62.

12.2 Метод определения перекисей липидов (малонового диальдегида) в тесте с тиобарбитуровой кислотой

Повышенную интенсивность процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) в настоящее время рассматривают как одно из нарушений метаболизма, нуждающихся в коррекции активация ПОЛ сопровождается ряд заболеваний либо возникает при воздействии внешних факторов. В связи с этим необходим надежный легко воспроизводимый тест для определения продуктов ПОЛ в сыворотке крови. Наиболее простым и адекватным способом оценки повышенного уровня ПОЛ является тест с тиобарбитуровой кислотой (ТБК). Данный метод имеет много модификаций, многие из которых не позволяют выявить все продукты реагирующие с ТБК, или приводят к большой ошибке при определении вследствие развития неспецифической окраски.

Известно, что ТБК может реагировать с липидами, аминокислотами, углеводами, однако основным продуктом реагирующим с ТБК, является МДА, образующийся при переокислении полиненасыщенных жирных кислот, имеющих 2-3 диеновые связи. Две молекулы ТБК реагируют с одной молекулой МДА. Исходно в биологическом материале содержание МДА крайне незначительно, и 98 % его образуется в процессе ТБК-теста при разрушении гидроперекисей липидов. В зависимости от условий реакции (способа обработки биологического материала, времени кипячения пробы, величины pH, наличия ионов металлов) оценка содержания продуктов ПОЛ, реагирующих с ТБК, может

значительно варьировать. Так, существенно влияет на ход реакции величина рН раствора. Оптимальным является рН смеси 2,0-3,0.

Для анализа берут 0,3 мл свежей сыворотки или плазмы крови без гемолиза. Нельзя брать плазму крови с ЭДТА, так как происходит связывание ионов железа, что занижает результат. Пробы можно замораживать и хранить при -20 °С, но при этом содержание МДА незначительно возрастает.

К сыворотке приливают 3 мл 1 % ортофосфорной кислоты (важно проверить рН раствора, плотность раствора соответствует 1,004 г/мл); 1 мл 0,6 % ТБК (хранить в темной банке, растворять при небольшом нагревании) и 0,1 мл раствора сернокислого железа (28 мг $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ в 10 мл дистиллированной воды), что соответствует 1 мкмоль в пробе. Пробирки ставят в кипящую водяную баню на 1 ч. Затем пробирки охлаждают в холодной воде, добавляют 4 мл бутанола, тщательно перемешивают и центрифугируют 10 мин при 3000 об/мин. Измеряют оптическую плотность верхней фазы при длине волны 535 нм ($E_{\text{оп}}$) против бутанола. Расчет содержания продуктов, реагирующих с ТБК, проводят с учетом коэффициента молярной экстинкции МДА, равного $1,56 \cdot 10^5$ моль \cdot см $^{-1}$:

$$A = \frac{E_{\text{оп}} \cdot 10^6 \cdot 4_{\text{мл}}}{1,56 \cdot 10^5 \cdot 0,3_{\text{мл}}} = E_{\text{оп}} \cdot 85,47,$$

где А - содержание МДА (в мкмоль/л или нмоль/мл), 4 мл - объем бутанольной фазы, 0,3 мл - объем сыворотки.

Вычитание из величины оптической плотности при длине волны 535 нм значения экстинкции при длине волны 580 нм, исходя из анализа спектров поглощения комплекса МДА—ТБК, в данном случае необязательно, так как оптические плотности окрашенного комплекса при длине волны 580 нм малы, постоянны для разных сывороток и составляют 0,010- 0,015 Е.

Литература:

Андреева Л. И., Кожемякин Л. А., Кишкун А. А. Модификация метода определения перекисей липидов в тесте с тиобарбитуровой кислотой // Лаб.дело.-1988.-№11.-С. 41-43.

12.3 Определение активности каталазы эритроцитов в гемолизате крови

В эритроцитах активность ключевого фермента антиоксидантной системы - супероксиддисмутазы (СОД) и каталазы значительно выше активности этих ферментов в других форменных элементах крови.

Для определения активности каталазы гемолизат крови или эритроцитов, разводят деионизированной водой в 200 раз и оставляют на холоду в течение 1 ч. Об активности фермента судят по убыли перекиси водорода в инкубационной среде, состоящей из трис-НС1-ЭДТА (рН 8,0) - 0,5 мл, раствора H_2O_2 (10 мМ/л) - 0,9 мл, деионизированной воды - 0,03 мл. Гемолизат вносят в инкубационную смесь в количестве 0,02 мл. Снижение оптической плотности измеряют против контрольной пробы без гемолизата каждые 30 с в течение 3 мин при комнатной температуре на спектрофотометре (230 нм).

$$(E_{\text{х. пр.}} - E_{\text{исслед. пр.}} / E_{\text{х. пр.}}) \cdot 100\%.$$

$E_{\text{х. пр.}}$, $E_{\text{исслед. пр.}}$ - экстинкция холостой и исследуемой проб.

Активность фермента выражают в международных единицах по количеству разрушенной перекиси водорода в наномолях и относят к 1 г гемоглобина на 1 мл крови.

Литература:

Дубинина Е. Е. Сравнительный анализ активности супероксиддисмутазы и каталазы эритроцитов и цельной крови у новорожденных детей при хронической гипоксии // Лаб. дело. - 1988. - № 8. - С. 16-19.

Чевари С., Андял Т., Штрэнгер Я. Определение антиоксидантных параметров крови и их диагностическое значение в пожилом возрасте // Лаб. дело. - 1991. - № 10. - с.9-13.

12.4 Определение активности супероксиддисмутазы крови

Определение СОД. Принцип определения основан на восстановлении нитротетразолия супероксидными радикалами, которые образуются при реакции между феназинметасульфатом и восстановленной формой никотинамиддинуклеотида (NAD*H). Образование нитроформаза, продукта восстановления нитротетразолия, блокируется наличием в пробе СОД. Так, на основании количества нитроформаза можно оценить активность СОД.

Реагенты. (1) 0,15 М фосфатный буфер (рН 7,8) (4,48 г Na₂HPO₄, 0,25 г KH₂PO₄ растворяют в 500 мл дистиллированной воды). (2) Инкубационная смесь 37 мг ЭДТА-Na₂, 330 мг нитротетразолия голубого, 55 мг феназинметасульфата смешивают с 300 мл фосфатного буфера, оставляют стоять на ночь. Утром фильтруют. (3) Раствор NAD*H. 152 мг NAD*H растворяют в 100 мл трис-ЭДТА-буфера. (4) Трис-ЭДТА-буфер, рН 8,0 (37 мг, ЭДТА-Na, 24 мг трис растворяют в 100 мл дистиллированной воды). (5) Стандартный раствор СОД (фирмы «Sigma», США), 10000 МЕ/мг. СОД определяют в 1 мл гемолизата крови (0,1 мл крови + 0,9 мл воды). Мешающее влияние гемоглобина устраняют добавлением 0,5 мл абсолютного спирта, 0,25 мл хлороформа, добавлением 300 мг KH₂PO₄ ускоряют разделение фаз. Интенсивно перемешивают на Вортексе и центрифугируют - 30 мин при 4000- 5000 об/мин. В супернатанте определяют - СОД (табл. 19). Оставляют стоять при комнатной температуре. Измеряют экстинкцию холостой и исследуемой проб при 540 нм на спектрофотометре. Экстинкция холостой пробы около 0,680.

Табл. 19 Схема определения СОД

| Добавляемые реагенты | Холостая проба | Исследуемая проба |
|---------------------------|----------------|-------------------|
| Инкубационная смесь, мл | 1,500 | 1,500 |
| Дистиллированная вода, мл | 0,100 | — |
| Супернатант, мл | — | 0,100 |
| Раствор NAD-H, мл | 0,050 | 0,050 |

Расчет проводят по формуле

$$\frac{Ex.pr - Иссл.pr}{Ex.pr} \cdot 100 = \text{процент блокирования образования нитроформаза}$$

Принято считать, что 50% ингибирования этой реакции соответствует одной условной единице активности СОД. По формуле $A = T\% / 100 - T\%$ рас-

считывают величину активности фермента, в условных единицах. Активность фермента выражают в условных единицах, рассчитанных на 1 мл крови.

Литература:

Чевари С., Андял Т., Штрэнгер Я. Определение антиоксидантных параметров крови и их диагностическое значение в пожилом возрасте // Лаб. дело.-1991.-№ 10.-с.9-13.

Дубинина Е. Е. Сравнительный анализ активности супероксиддисмутазы и каталазы эритроцитов и цельной крови у новорожденных детей при хронической гипоксии // Лаб. дело. - 1988. -№ 8. - С. 16-19.

12.5 Метод определения активности глутатионпероксидазы в эритроцитах

Фермент глутатионпероксидаза - ГП (КФ 1.11.1.9) содержится во многих тканях и является одним из главных компонентов системы защиты организма от эндогенно или экзогенно индуцированного образования перекисей, в том числе перекисей липидов. Перекисное окисление липидов - универсальный механизм повреждения клеточных мембран при разных патологических состояниях. В связи с этим исследования активности ГП, как и состояния других механизмов антиоксидантной защиты организма, имеют важное значение во многих областях теоретической и практической медицины и ветеринарии, в частности в биохимии и патохимии радиационных повреждений, онкологических, кардиологических, воспалительных заболеваний, в геронтологии.

Для определения активности ГП в эритроцитах используют преимущественно методы, основанные на измерении скорости окисления НАДФ*Н в сопряженной глутатионредуктазной реакции. Однако НАДФ*Н является ингибитором ГП, что занижает истинные значения активности фермента, а постоянное восстановление глутатиона в присутствии НАДФ*Н и ГП делает эти методы непригодными для кинетических исследований ГП. Кроме того, эти методы анализа требуют предварительного осаждения гемоглобина органическими растворителями либо превращения его в цианметгемоглобин для устранения псевдопероксидазной активности гемопротеидов, содержащихся в гемолизатах.

Прототипами данной методики являются два метода, объединенные общим принципом: активность ГП определяют непосредственно по количеству израсходованного в ферментативной реакции субстрата - восстановленного глутатиона или по количеству конечного продукта ферментативной реакции - окисленного глутатиона.

Мерой активности фермента ГП является скорость окисления глутатиона в присутствии гидроперекиси третичного бутила. Концентрацию восстановленного глутатиона до и после инкубации определяют колориметрически. В основе развития цветной реакции лежит взаимодействие SH-групп 5,5-дитиобис (нитробензойной) кислотой (ДТНБК) с образованием окрашенного продукта - тионитрофенильного аниона (ТНФА). Количество последнего прямо пропорционально количеству SH-групп, прореагировавших с ДТНБК.

Реактивы. (1) Трис-НС1-буфер 0,1 М, рН 8,5, содержащей 6 мМ ЭДТА и 12 мМ азида натрия. Непосредственно перед анализом на этом буфере готовят 4,8 мМ раствор восстановленного глутатиона. (2) Трис-НС1-буфер 0,1 М, рН 8,5. (3) Гидроперекись третичного бутила 20 мМ раствор (готовят перед анали-

зом разведением исходного реактива в 500 раз). (4) Трихлоруксусная кислота - ТХУ 200 г/л. (5) Реактив Элмана - 0,01 М раствор (3,96 г/л) ДТНБК на метаноле.

Ход исследования. В качестве антикоагулянта используется ЭДТА (1 мг на 1 мл крови). Эритроциты дважды промывают холодным изотоническим раствором хлорида натрия с рН 7,4, центрифугируют 30 мин при 4000 об/мин и 4 °С, гемолизируют равным объемом дистиллированной воды и повторным замораживанием и оттаиванием. Концентрацию гемоглобина (унифицированный цианметгемоглобиновый метод) доводят до 10 г/л разведением гемолизата.

100 мкл гемолизата преинкубируют с 830 мкл реактива 1 в течение 10 мин при 37 °С, добавляют 70 мкл реактива 3 и инкубируют точно 5 мин. Реакцию останавливают добавлением 200 мкл холодной ТХУ, осажденные белки удаляют центрифугированием. 100 мкл супернатанта вносят в 10 мл трис-НСI-буфера (реактив 2) и добавляют 100 мкл реактива Элмана. Через 5 мин пробы фотометрируют при 412 нм в кювете с длиной оптического пути 1 см. Контрольная проба отличается тем, что гемолизат вносят непосредственно перед осаждением белков.

С учетом разведения биологического материала в данном методе и коэффициента молярной экстинкции ТНФА при 412 нм-11400, рассчитывают активность ГП в микромолях, израсходованного в реакции субстрата по формуле:

$$(E_{\text{контроля}} - E_{\text{опыта}}) * 2147 = \text{мкМ/мин на 1 г гемоглобина.}$$

Специфичность и точность анализа ГП, доступные реактивы и оборудование, небольшие затраты времени позволяют использовать предлагаемый метод не только в научных исследованиях, но и в практике клинико-диагностических лабораторий для своевременной диагностики и коррекции снижения активности антиоксидантных реакций организма.

Литература:

Моин В. М. Простой и специфический метод определения активности глутатионпероксидазы в эритроцитах // Лаб. дело. -1986.-№12.-С. 724-727.

12.6 Определение активности церулоплазмينا

Церулоплазмин (КФ 1.10.3.2) – это медьсодержащий фермент, катализирующий окисление двухвалентного железа в трехвалентное и некоторых полиаминов, в том числе и п-фенилендиамина, на чем и основано его определение. В холодильнике активность фермента сохраняется около двух недель. Результаты при использовании плазмы и сыворотки получаются одинаковыми.

В три опытные и одну контрольную пробирки Вассермана вносят по 2 мл ацетатного буфера, 0,2 мл гепаринизированной плазмы крови (для птиц), перемешивают добавляют по 1 мл 0,25 %-го раствора п-фенилендиамина и снова перемешивают. Пробы инкубируют в водяной бане в течение 1 ч при 37° С, затем их быстро помешают в водяную воду. После этого в опытные пробы добавляют из бюретки по 1 мл натрия азиды (в контроль его вносят сразу после прибавления плазмы) и тщательно перемешивают, затем центрифугируют при 4000 об/мин в течение 10 мин. Интенсивность полученной окраски измеряют на спектрофотометре при 530 нм против воды. Окраска устойчива не более 5 ч. Из

оптической плотности опытной пробы вычитают оптическую плотность контроля. Активность церулоплазмина (Е) выражают в мкмольх п-фенилендиамина, окисленного в течение 1 ч на 1 мл плазмы крови при 37° С и высчитывают по формуле: $E=K * 1/A$, где К – количество п-фенилендиамина по калибровочной кривой, мкмоль; А и 1 – аликвота плазмы и пересчет на 1 мл. Для построения калибровочной кривой в опытные пробирки помещают по 2 мл ацетатного буфера, 0,2 мл раствора $K_2Cr_2O_7$ и по 1 мл стандартного раствора, содержащего 0,10; 0,20; 0,30; 0,40; 0,50; 0,60 и 0,70 мкмоль п-фенилендиамина. Пробы инкубируют 1 ч, затем добавляют по 1мл натрия азида и измеряют оптическую плотность. Контроль (0,2 мл ацетатного буфера вместо раствора $K_2Cr_2O_7$) ставится для учета самопроизвольного окисления п-фенилендиамина.

Литература:

Кузнецов С. Г. К методике определения активности церулоплазмина в плазме крови птиц // С.- х. биология. -1997. - т. X. - № 2. - С. 290-293.

Приложение

1 Коэффициенты пересчета при переводе в единицы СИ

| Показатель | Молекулярная масса, г/моль | Применяемые ранее единицы | Рекомендуемые единицы | Коэффициент пересчета |
|--------------------------|----------------------------|--------------------------------------|-----------------------|-----------------------|
| Гемоглобин | — | г% | г/л | 10 |
| Гематокрит | — | % | л/л | 0,01 |
| Эритроциты | — | млн/10 ⁶ /мм ³ | 10 ¹² /л | 1,0 |
| Лейкоциты | — | тыс/10 ³ /мм ³ | 10 ⁹ /л | 1,0 |
| Общий белок | — | г% | г/л | 10,0 |
| Азот небелковый | 14,007 | мг% | ммоль/л | 0,71 |
| Азот аминный | 14,007 | мг% | ммоль/л | 0,71 |
| Азот мочевины | 14,007 | мг% | ммоль/л | 0,71 |
| Мочевина | 60,05 | мг% | ммоль/л | 0,1665 |
| Глюкоза | 180,16 | мг% | ммоль/л | 0,0555 |
| Летучие жирные кислоты | 60,05 | мг% | ммоль/л | 0,1665 |
| Кетоновые тела | 50,08 | мг% | ммоль/л | 0,1722 |
| Свободные жирные кислоты | — | мг% | мг/л | 10,0 |
| Сиаловые кислоты | 809,3 | мг% | ммоль/л | 0,0323 |
| Общие липиды | 678,55 | мг% | ммоль/л | 0,0167 |
| Холестерин | 386,64 | мг% | ммоль/л | 0,0278 |
| Фосфолипиды | 774,0 | мг% | ммоль/л | 0,0129 |
| Кальций | 40,08 | мг% | ммоль/л | 0,250 |
| Фосфор | 30,9738 | мг% | ммоль/л | 0,3230 |
| Железо | 55,85 | мкг % | мкмоль/л | 0,179 |
| Медь | 63,55 | мкг % | мкмоль/л | 0,157 |
| Цинк | 65,38 | мкг % | мкмоль/л | 0,153 |
| Кислотная емкость крови | 40,0 | мг% | ммоль/л | 0,250 |
| Аспаратаминотрансфераза | — | мкмоль/ч*мл | ммоль/ч*л | 1,0 |
| | 88,0 | мкг /ч *мл | нмоль/с*л | 3,18 |
| Аланинаминотрансфераза | — | мкг /ч *мл | нмоль/с*л | 3,18 |
| Щелочная фосфатаза | — | мкмоль/ч*мл | ммоль/ч*л | 1,0 |
| Витамин А | 286,46 | мкг/мл | мкмоль/л | 3,49 |
| Каротин | 536,44 | мкг/мл | мкмоль/л | 1,87 |
| Витамин С | 176,13 | мг% | мкмоль/л | 56,78 |
| Эстрон | 270,37 | мкг/л | нмоль/л | 3,699 |
| Эстрадиол | 272,39 | мкг/л | нмоль/л | 3,671 |
| 11 оксикортикостероиды | — | мкг % | мкг/л | 10,0 |
| | 353,97 | мкг % | нмоль/л | 28,25 |

2 Биохимические показатели крови животных разных видов

| Показатель | Крупный рогатый скот | Свиньи | Овцы |
|---------------------------------------|----------------------------|-----------|-------------|
| Гемоглобин, г /л | 84,4-117,8 | 92-114 | 82-113 |
| Эритроциты, 10^{12} /л | 5,5-8,0 | 4,6-7,5 | 8,0-9,5 |
| Лейкоциты, 10^9 /л | 6,6-9,5 | 11,0-16,0 | 5,8-10,6 |
| Общий белок, г/л | 63,0-90,0 | 65,0-95,0 | 57,0- 76,0 |
| Азот небелковый, ммоль/л (остаточный) | 20,5-28,4 | 17,0-28,4 | 14,7-25,9 |
| Азот аминный, ммоль/л | 2,8-5,7 | 4,3-6,0 | 3,3-5,7 |
| Азот мочевины, ммоль/л | 6,0-8,7 | 6,4-10,7 | 6,6-10,6 |
| Глюкоза, ммоль/л | 3,0-4,4 | 2,5-4,2 | 2,2-3,9 |
| Летучие жирные кислоты (ЛЖК, моль/л) | 0,53-0,74 | 0,37-0,50 | 0,49-0,83 |
| Кетоновые тела, ммоль/л | 0,52-1,4 | 0,60-1,20 | 0,43-1,0 |
| Свободные жирные кислоты (НЭЖК, г/л) | 29,6-70,0 | 26,0-83,0 | 27,0-85,0 |
| Сиаловые кислоты, ммоль/л | 1,6-2,70 | — | 1,3-2,0 |
| Общие липиды, ммоль/л | 5,20-7,50 | 4,50-7,60 | 5,10-7,30 |
| Холестерин, ммоль/л | 2,40-3,30 | 1,70-2,50 | 2,30-2,80 |
| Фосфолипиды, ммоль/л | 1,75-3,00 | — | 1,70-2,10 |
| Кальций, ммоль/л | 2,20-3,30 | 2,20-3,50 | 2,40-3,30 |
| Фосфор, ммоль/л | 1,40-2,50 | 1,62-2,30 | 1,50-2,42 |
| Железо, мкмоль/л | 16,1-19,7 | 17,2-30,1 | 19,70-23,30 |
| Медь, мкмоль/л | 11,8-14,9 | 14,1-28,3 | 7,80-11,00 |
| Цинк, мкмоль/л | 8,30-10,60 | 5,40-7,30 | — |
| Аспаратаминотрансфераза, ммоль/ч*л | 0,85-1,50 | 0,45-1,18 | 0,67-1,24 |
| Аланинаминотрансфераза, ммоль/ч*л | 0,55-1,00 | 0,35-0,67 | 0,52-0,80 |
| Щелочная фосфатаза, ммоль/ч*л | 3,40-8,80 | 2,62-10,4 | 2,20-11,0 |
| Витамин А, мкмоль/л | 4,20-7,00 | 0,84-3,50 | 1,75-3,40 |
| Каротин, мкмоль/л | 7,50-11,0 | — | 3,70-9,00 |
| Витамин С, мкмоль/л | 5,70-22,70 | 5,70-14,4 | — |
| Эстрон, нмоль/л | — | — | 22,0-63,0 |
| Эстрадиол, нмоль/л | — | — | 4,3-12,5 |
| 11 оксикортикостероиды, мкг/л | 90-150 | — | — |