

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«ОРЕНБУРГСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ АГРАРНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»**

**МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ ДЛЯ ОБУЧАЮЩИХСЯ
ПО ОСВОЕНИЮ ДИСЦИПЛИНЫ**

Б1.В.ДВ.04.01 КЛИНИЧЕСКАЯ БИОХИМИЯ

Специальность 36.05.01 Ветеринария

Специализация Ветеринарное дело

Форма обучения очная

СОДЕРЖАНИЕ

1. Конспект лекций	3
1.1 Лекция № 1 Клиническая биохимия как наука: цели, задачи, объекты.....	3
1.2 Лекция № 2 Клинико-биохимические методы исследования.....	6
1.3 Лекция №3 Клиническая биохимия при нарушении обмена белков.....	8
1.4 Лекция №4 Клиническая биохимия при нарушении обмена углеводов.....	12
1.5 Лекция №5 Клиническая биохимия при нарушении обмена липидов	15
1.6 Лекция №6 Клиническая биохимия при нарушении минерального обмена.....	19
1.7 Лекция №7 Исследование печени.....	24
1.8 Лекция № 8 Нарушение функции печени.....	27
1.9 Лекция №9 Исследование мочи.....	31
1.10 Лекция №10 Клиническая биохимия при эндокринных заболеваниях.....	33
1.11 Лекция №11 Клиническая биохимия в диагностике болезней мелких домашних животных.....	36
2. Методические указания по выполнению лабораторных работ	41
2.1 Лабораторная работа № ЛР-1 Изменение крови при различных патологических состояниях.....	41
2.2 Лабораторная работа № ЛР-2 Клинико-диагностическое значение определения белков плазмы крови методом электрофореза.....	44
2.3 Лабораторная работа № ЛР-3 Качественные реакции на аминокислоты и белки (реакция Сакагучи, определение Биурета, реакция Фольга, нингидриновая реакция, рН белков, изТ).....	46
2.4 Лабораторная работа № ЛР-4 Качественный и количественный методы определения глюкозы.....	48
2.5 Лабораторная работа № ЛР-5 Определение холестерина, триглицеридов, липазы в сыворотке крови.....	50
2.6 Лабораторная работа № ЛР-6 Особенности обмена минеральных веществ и витаминов в организме животных.	53
2.7 Лабораторная работа № ЛР-7 Лабораторные методы исследования печени. Определение общего билирубина, щелочной фосфатазы, АЛАТ в сыворотке крови.....	59
2.8 Лабораторная работа № ЛР-8 Определение активности ферментов АЛТ, АСТ, ЛДГ, глутамилтрансферазы, альфа-амилазы (липазы), щелочной фосфотазы в сыворотке крови.....	62
2.9 Лабораторная работа № ЛР-9 Биохимия мочи: общий белок, сахар, кетоновые тела, нитриты, рН, билирубин, лейкоциты.....	67
2.10 Лабораторная работа № ЛР-10 Определение гормонов Т₃, Т₄, ТТГ для диагностики иодадефицита в организме животных.....	67

1. КОНСПЕКТ ЛЕКЦИЙ

1. 1 Лекция №1 (2 часа).

Тема : Клиническая биохимия как наука: цели, задачи, объекты.

1.1.1 Вопросы лекции:

1. Клиническая биохимия как наука: цели, задачи, объекты.
2. Этапы биохимических исследований.
3. Принципы забора материала для клинико-биохимических исследований.

1.1.2 Краткое содержание вопросов:

1. Клиническая биохимия как наука: цели, задачи, объекты.

Клиническая биохимия изучает биохимические изменения, происходящие в организме животных при различных заболеваниях и патологических состояниях, способы и методы обнаружения этих изменений. Изучение отклонений базируется на естественном течении процессов.

Клиническая биохимия - преимущественно клинико-диагностическая часть науки. Основываясь во многом на результатах, полученных патофизиологией, она ставит своей задачей разработку и использование стандартных методов диагностики патологических состояний, и контроля за течением заболевания, эффективности лечения и прогноза. Еще раз подчеркнем то положение, что для оптимального решения комплексных задач необходимо внутреннее единство развития патологической и клинической биохимии.

Место клинической биохимии в системе ветеринарных дисциплин

Клиническая диагностика

Клиническая физиология

Секционная цитология

Общая патология

Патофизиология

Патанатомия

Биохимия

Физиология

Анатомия

Клиническая биохимия традиционно разделяется на общую и частную.

Общая решает следующие задачи:

Разработка общих методических подходов биохимических исследований патологических процессов.

Установление границы нормы тех или иных параметров.

Выявление и устранение причин ошибок при проведении биохимических исследований.

Осуществление контроля качества биохимических исследований.

Частная клиническая биохимия использует методы и приемы общей клинической биохимии в определенных ветеринарных дисциплинах с учетом их особенности и специфики (терапия, хирургия, педиатрия, акушерство и гинекология и т.д.).

Благодаря выявлению биохимических нарушений в организме расширились возможности диагностики, оценки влияния различных лечебных мероприятий на течение патологического процесса и его прогноз.

Жизнедеятельность организма определяется единством и взаимозависимостью трех его компонентов: структуры, обмена веществ и функции органов и тканей.

Показатели, характеризующие состояние каждого из них в условиях патологии, изучаются соответствующими дисциплинами.

2. Этапы биохимических исследований.

Система контроля качества включает три больших этапа: *преаналитический*, *аналитический* и *постаналитический*. Наиболее сложным в организационном плане и наиболее ответственным в плане влияния на полученные показатели в системе контроля качества является *преаналитический* этап - взятие биологического материала на исследование.

На **преаналитическом** этапе множество факторов оказывает выраженное влияние на результаты последующего аналитического измерения: предшествующий прием пищи, физиологическое состояние, возрастные и породные особенности, соблюдение анаэробных условий взятия биологического материала, соблюдение стерильных условий, предшествующие физические нагрузки.

Во многих случаях для диагностики патологического процесса необходимо проведение функциональных проб с одновременным выполнением биохимических исследований: тесты с нагрузкой глюкозой, функциональные тесты оценки детоксикационной функции печени, многократное взятие крови на исследование, многократный сбор мочи при проведении функциональных тестов почек.

Аналитический этап контроля качества во всех лабораториях является наиболее совершенным. При наличии в лаборатории биохимических автоматизированных систем выполнение его происходит автоматически, включая и статистические параметры оценки внутрилабораторного контроля качества для каждого из исследуемых параметров. Использование при определении каждого из анализируемых образцов трех контрольных проб с низким, нормальным и высоким значением исследуемого параметра позволяет проконтролировать весь интервал (линейность) проводимых измерений. Умение оценивать результаты контроля качества во многом способствует высокому качеству диагностического процесса, поскольку широкие интервалы физиологических значений могут быть результатом суммы случайных ошибок, а динамика биохимических показателей при длительном наблюдении может быть результатом систематических ошибок.

Наиболее сложным этапом контроля качества является **постаналитический**. Суть этого этапа составляет диагностическая интерпретация выполненных исследований и порой многочисленных результатов (концентрация метаболитов, ионов, парциальное давление газов, каталитическая активность ферментов, концентрация водородных ионов). Интегральная оценка многочисленных конкретных результатов, формирование при ряде патологических процессов биохимического диагноза, выделение основного патологического процесса, его осложнений, сопутствующих заболеваний зависят от квалификации сотрудников лаборатории, степени их коллегиального взаимодействия с клиницистами.

Умение трактовать результаты лабораторных тестов, не назначая ненужные лабораторные исследования, умение вести диагностический процесс на основании лабораторных данных не вширь, а вглубь во многом характеризует профессиональный уровень специалиста клинической лабораторной диагностики. Организационные вопросы диагностического процесса при каждой нозологической форме заболевания, необходимый объем и частоту повторения лабораторных тестов регламентирует стандарт. Стандарт для каждой нозологической формы заболевания вырабатывают эксперты-клиницисты, специалисты клинической лабораторной диагностики. Документ регламентирует оснащение клиничко-диагностической лаборатории, объем лабораторного исследования, частоту повторения тестов в штатных ситуациях.

Оценка порой разрозненной диагностической лабораторной информации, ее обобщение и формирование диагноза являются основой диагностического процесса в

клинико-диагностической лаборатории. В настоящее время совершенствование диагностического процесса проходит путем внедрения в диагностический процесс большего числа количественных показателей при доминировании в технологии лабораторной диагностики спектрофотометрии, электрофореза и хроматографии, иммунохимии и ионоселективного анализа. Интегрирование же полученной информации проводит клинический патолог, руководствуясь при этом общими принципами патологии.

Клиническая лабораторная диагностика способствует решению теоретических проблем биологии животных. Это относится к выявлению таких регуляторных закономерностей, которые характерны только для животных: воздействие стрессирующих факторов на процессы метаболизма, метаболические нарушения при врожденных дефектах метаболизма.

Следует заметить, что не все устоявшиеся представления о течении и регуляции физиологических процессов являются незыблемыми: со временем некоторые из них будут конкретизированы, скорректированы или заменены новыми. При этом роль клинической лабораторной диагностики будет оставаться высокозначимой, поскольку именно она отработает новые функциональные тесты, новые интегральные биофизические методы исследования.

3. Принципы забора материала для клинико-биохимических исследований.

Химический состав биологического материала переменчив. Он может за короткий промежуток времени значительно изменяться. Поэтому для получения сопоставимых результатов необходимо соблюдать ряд правил при отборе и хранении биологического материала. **Это важно**, так как нормативные значения определены с учетом этих правил.

1. Отбор материала необходимо производить с учетом суточной динамики. Кровь принято отбирать утром, до кормления. При повторном исследовании отбирать материал необходимо в одно и то же время.

В течение четырех часов после кормления концентрация некоторых субстратов (общий белок, глюкоза, липиды и ряд других) повышена (к примеру, норма для содержания глюкозы в сыворотке крови у крупного рогатого скота колеблется в пределах 2,2 - 3,2 ммоль/л, однако в течение 1 - 2 часов после кормления ее концентрация может возрасти в 2-4 и более раз, при углеводном перекорме глюкоза может кратковременно появляться в моче). У некоторых видов животных: свиней и взрослых курей сразу после кормления ряд биохимических исследований в сыворотке крови невозможен вообще из-за высокого содержания в ней жира и ряда др. веществ, придающих ей мутность.

2. Процесс отбора биологического материала должен быть максимально безболезненным и быстрым (беспокойство, болевая реакция, длительный венозный застой в месте инъекции значительно изменяют состав крови).

3. Взятие материала всегда проводят до лечебных процедур, особенно внутривенных инъекций электролитов, раствора глюкозы. Так же необходимо учитывать лекарственные препараты, которые вводились животному (например, вакцинация живыми вакцинами приводит к снижению фагоцитарной активности нейтрофилов).

4. Полученный материал сразу же помещается в чистую и закрытую посуду. Контакт с внешней средой не допускается. В случае, если исследуемое вещество (например, билирубин, витамин B₂ и др.) разрушается на свету, биологический материал помещают в светонепроницаемый пакет или ящик.

5. Биологические процессы продолжают идти и *in vitro*, поэтому их необходимо минимизировать. Для этого, если не используются консерванты, наиболее подходит низкая температура. Клеточные структуры сохраняют при температуре 4 - 8 °C (не допуская замораживания). Сыворотку, плазму и другие безклеточные биологические материалы лучше сразу после получения замораживать и транспортировать в таком виде. Считается, что при температуре -25 °C активность ферментов минимальна. Для каждого

определяемого показателя при определенных условиях существуют максимальные сроки хранения (указываются обычно в методиках).

Кровь - основной объект клинической биохимии, наиболее часто подвергаемый биохимическому исследованию. Пробы крови берут у животных перед кормлением или через 5 - 6 часов после кормления.

1. 2 Лекция №2 (2 часа).

Тема : Клинико-биохимические методы исследования.

1.2.1 Вопросы лекции:

1. Основные группы биохимических показателей.
2. Клинико-биохимические методы исследования.

1.2.2 Краткое содержание вопросов:

1. Основные группы биохимических показателей.

Биохимический анализ крови - одно из самых распространенных в современной медицине исследований, с помощью которого можно оценить обмен веществ в организме и работу внутренних органов - почек, печени, поджелудочной железы и др. Как правило, во время этого анализа исследуется достаточно большое количество параметров (состояние клеток крови, биохимические, иммунологические, гормональные показатели).

Благодаря разносторонним диагностическим возможностям биохимический анализ крови используется во многих областях медицины: терапии, эндокринологии, урологии, гастроэнтерологии, кардиологии, гинекологии и многих других. Набор исследуемых параметров для уточняющей диагностики зависит от заболевания и определяется лечащим врачом. Кроме того, биохимический анализ крови необходим для ранней диагностики заболеваний, так как позволяет выявить нарушения в работе внутренних органов, когда еще нет никаких внешних симптомов болезни.

Существуют определенные нормы биохимического анализа крови. Это статистически установленные показатели для здоровых людей определенного пола и возраста. Отклонение от этих показателей - симптом разнообразных нарушений в деятельности организма, сбой в работе каких-либо органов или систем.

Амилаза

Изменение уровня амилазы говорит о патологии поджелудочной железы. Этот показатель, как правило, повышается при остром панкреатите, закупорке протока поджелудочной железы камнями, спайками или опухолью. Иногда уровень амилазы возрастает при почечной недостаточности. Снижение уровня амилазы в крови может свидетельствовать о гепатите, повышении уровня гормонов щитовидной железы.

Щелочная фосфатаза, АлаТ, АсаТ, γ-ГТ

Увеличение щелочной фосфатазы свидетельствует о заболеваниях печени и желчных протоков.

На нарушение функции печени указывает повышение таких показателей, как АлаТ, АсаТ, γ-ГТ.

Электролиты крови

Изменение концентрации фосфора и кальция в крови свидетельствует о нарушении минерального обмена, что бывает при заболеваниях почек, рахите, некоторых гормональных нарушениях. Содержание кальция в крови повышено при заболеваниях щитовидной железы, а также при некоторых формах рака.

Изменение концентрации калия, натрия и хлора неблагоприятно сказывается на работе внутренних органов, особенно сердца.

ФЕРМЕНТЫ.

Ферменты – основные *биологические катализаторы*, т.е. вещества природного происхождения, ускоряющие химические реакции. Также, ферменты принимают участие в регуляции многих метаболических процессов, обеспечивая тем самым соответствие

обмена веществ изменённым условиям. Почти все ферменты являются *белками*. В зависимости от реакционной и субстратной специфичности, различают шесть основных классов ферментов (оксиредуктазы, трансферазы, гидролазы, лиазы, изомеразы и лигазы). Всего, на настоящий момент, известно более 2000 ферментов.

Каталитическое действие фермента, т.е. его *активность*, определяют в стандартных условиях по увеличению скорости каталитической реакции по сравнению с некаталитической. Скорость реакции обычно указывают как *изменение концентрации субстрата или продукта за единицу времени* (ммоль/л в секунду). Другой единицей активности является Международная единица (Ед.) – количество фермента, превращающего 1 ммоль субстрата в 1 минуту.

Для клиники основное значение имеют следующие ферменты:

АСПАРТАТАМИНОТРАНСФЕРАЗА (АСТ, АсАТ)

Внутриклеточный фермент, участвующий в обмене аминокислот. В больших концентрациях содержится в печени, сердце, скелетной мускулатуре, мозге, эритроцитах. Высвобождается при повреждении ткани.

Референтные интервалы:

для собак – 11 – 42 Ед.;

для кошек – 9 – 29 Ед.

для лошадей – 130 – 300 Ед.

Повышено: Некроз клеток печени любой этиологии, острые и хронические гепатиты, некроз сердечной мышцы, некроз или травма скелетных мышц, жировая дистрофия печени, поражение тканей мозга, почек; применение антикоагулянтов, витамина С

Понижено: Диагностического значения не имеет (редко при недостатке пиридоксина (Витамина В₆)).

АЛАНИНАМИНОТРАНСФЕРАЗА (АЛТ, АлаТ)

Внутриклеточный фермент, участвующий в обмене аминокислот. В больших концентрациях содержится в печени, почках, В мышцах – в сердце и скелетной мускулатуре. Высвобождается при повреждении ткани, особенно при поражении печени.

Референтные интервалы:

для собак – 9 – 52 Ед.;

для кошек – 19 – 79 Ед.

для лошадей – 2,7 – 20,0 ЕД;

Повышено: Некроз клеток, острые и хронические гепатиты, холангит, жировая дистрофия печени, опухоли печени, применение антикоагулянтов

Понижено: Диагностического значения не имеет

2. Клинико-биохимические методы исследования.

Лабораторный тест (исследование) - совокупность процедур *in vitro* с биологическим материалом (пробой), взятым у пациента, результатом которых становится количественная или качественная информация о составе биологического материала (пробы), свойствах всего биологического материала или отдельных компонентов, содержащихся в биологическом материале и проявляемых в конкретных условиях *in vitro*, а также значения или изменения вышеупомянутых показателей в динамике патологического процесса либо в результате специальных воздействий на организм пациента.

Вся современная лабораторная диагностика базируется на фундаментальном предположении - результаты лабораторных исследований (в свете приведенного выше определения) с определенной степенью достоверности отражают состав и свойства

биологических субстанций организма пациента *in vivo* и благодаря этому в определенной степени отражают патофизиологическое состояние организма пациента.

Собственно лабораторное исследование начинается в момент взятия у пациента образца какой-либо субстанции (крови, мочи, желудочного содержимого, биоптата и т.д.), которую мы называем биологической пробой. В этот момент биологическая субстанция переходит из состояния *in vivo* в состояние *in vitro*. Дальнейшие действия с биологической пробой направлены на то, чтобы в результате лабораторного исследования получить информацию о составе и свойстве этой биологической пробы.

Физико-химические методы основаны на учете физических изменений в системе (цвет, электропроводность и др.) происходящих в результате определенных химических реакций. Иммунохимические методы основаны на реакции взаимодействия антигена и антигена.

1. Весовой (гравиметрический) анализ, основанный на выделении вещества в результате определенных реакций, высушивания и точного взвешивания его на аналитических либо торсионных весах. Примером этого анализа может служить определение содержания фибриногена по методу Рутберг.

2. Объемный (титрометрический) анализ, основанный на точном измерении объемов реагирующих между собой веществ в эквивалентных (равных) количествах. Примером может служить определение кислотности желудочного сока, хлоридов в биологических жидкостях титрометрическим способом и др.

3. Электрообъемные (электроаналитические) методы, основанные на электрохимических свойствах растворов. Примером этих методов является определение концентрации ионов водорода, хлора, натрия, калия, кальция в биологических жидкостях с помощью ионоселективных электродов.

4. Оптические методы анализа нашли наибольшее распространение в клинических лабораториях. Они, в свою очередь, подразделяются на: фотометрию (абсорбционную и эмиссионную), рефрактометрию и поляризиметрию.

Все оптические методы основаны на изменении свойств проходящего через исследуемый объект света или на измерении свечения выделяемого искомым веществом.

Абсорбционная фотометрия. В основе метода лежит способность исследуемого вещества поглощать часть проходящего через него света определенной длины волны. Степень поглощения при всех прочих равных условиях (основное из которых длина оптического пути - расстояние, которое проходит световой пучок в исследуемом веществе) прямо пропорционально концентрации вещества.

1. 3 Лекция №3 (2 часа).

Тема : Клиническая биохимия при нарушении обмена белков.

1.3.1 Вопросы лекции:

1. Клиническая биохимия при нарушениях обмена белков.
2. Определение общего белка, фракционный состав белков.
3. Клинические показатели при нарушении обмена белков.

1.3.2 Краткое содержание вопросов: (тезисно изложить основное содержание рассматриваемых вопросов)

1. Клиническая биохимия при нарушениях обмена белков.

Белок - важнейший пластический компонент диеты, незаменимый источник биогенного азота, необходимый для роста и регенерации. В пересчете на сухой вес белки составляют 44% массы тела. На долю протеинов приходится более половины его органических соединений. (О. Эдхольм, А. Бахаранч). В соматическом отсеке тела (скелет, скелетные мышцы, кожа) находится около 63% белка тела, остальные 37% - в висцеральном отсеке. Важность белка как пластического компонента доказывается тем, что при хронической белковой недостаточности в питании населения ряда тропических

регионов рост и развитие целых народов может замедляться. Известно, что представители многих низкорослых этносов тропической Африки, Азии, Латинской Америки, переселяясь в раннем детстве в развитые страны и следуя диете с достаточной в качественном и количественном отношении поставкой белка, приобретают антропометрические показатели, сходные с таковыми у коренного населения развитых стран (Ж. де Кастро, 1950; Р. Котран и соавт., 1997). Роль белка:

- структурная;
- транспортная (антитоксическая);
- регуляторная (гормональная, ферментативная);
- защитная.

Белки - носители чужеродной антигенной информации и должны расщепляться при переваривании, утрачивая антигенность, что и происходит в ЖКТ, под действием протеиназ до аминокислот. Через облегченную диффузию и активный транспорт (система пермеаз) аминокислоты попадают в кровяное русло.

Часть из них уходит на:

- синтез белков и функциональных белков клетки;
- синтез гормонов и др. регуляторных молекул;
- синтез функциональных белков плазмы крови;
- в реакции переаминирования, для синтеза заменимых аминокислот;
- для синтеза энергии и в др. виды обмена (избыток).

В организме различают матричный синтез белка (преимущественно) и нематричный - в отдельных случаях (синтез небольших пептидов, например трипептида глутатиона) - он экономически не выгоден.

Конечным продуктом для простых белков является аммиак, который в печени переводится в менее токсичную мочевины и экскретируется через почки.

При утилизации сложных белков вначале отщепляется небелковая часть, которая утилизируется в зависимости от вида (углеводная поступает в окислительный распад, при распаде гемоглобина отщепляется гем, разрывается пирольное кольцо по следующей схеме, с образованием билирубина; нуклеопротеиды разрушаются с образованием мочевины и мочевой кислоты).

2. Определение общего белка, фракционный состав белков.

Методы определения общего белка в сыворотке крови

Белки сыворотки крови представляют собой гетерогенную группу белков, включающую транспортные белки, ферменты, иммуноглобулины, гормоны, белки-ингибиторы и многие другие. Несмотря на различия в составе, структуре, физических и химических свойствах и выполняемой функции, белкам сыворотки присущ ряд общих характеристик:

1. содержат атомы углерода, водорода, кислорода, азота;
2. состоят из аминокислот, соединенных пептидными связями;
3. обладают поглощением в ультрафиолетовой области спектра;
4. сходно ведут себя в ряде химических реакций.

Исходя из этих общих свойств и были разработаны методы определения белка в биологических жидкостях.

Методы определения общего белка

Среди методов определения концентрации общего белка можно выделить несколько основных групп, основанных на различных принципах:

- азотометрические;
- гравиметрические (весовые);
- «преципитационные»;
- спектрофотометрические;
- рефрактометрические;

- колориметрические.

Кроме перечисленных выше разработаны также другие методы, например, флюориметрические, поляриметрические, а также методы атомно-абсорбционной спектрофотометрии и аминокислотного анализа белка.

Азотометрические методы

Азотометрические методы определения общего белка сыворотки основаны на определении количества белкового азота, образующегося при разрушении аминокислот, входящих в состав белков. Впервые метод был предложен Кьельдалем в 1883 году. В методе Кьельдаля, в настоящее время представляющем в целом исторический интерес, азот, содержащийся в составе белков, окисляют до иона аммония и его количество определяют титрованием точным раствором соляной кислоты. Кроме того, ион аммония может быть определен реактивом Несслера, манометрическим методом после превращения иона аммония в молекулярный азот под действием гипобромита или с помощью оптического теста Варбурга при участии фермента глутаматдегидрогеназы. Исходя из того, что белки из биологических объектов содержат в среднем 16 % азота, полученное в результате анализа количество азота умножают на коэффициент 6,25. Исторически используют фактор 6,25, хотя его величина зависит от белкового состава исследуемого образца. Для отдельных фракций белка в сыворотке или плазме величина фактора колеблется в диапазоне от 5,69 до 6,52.

Недостатком азотометрических методов является длительность и сложность процедуры, даже при том, что аммиак, образующийся в реакции, можно определять ферментативным методом. Автоматизация позволяет использовать этот метод в ряде случаев в качестве метода сравнения из-за его достаточной точности и воспроизводимости.

Гравиметрические методы

Гравиметрические (весовые) методы определения общего белка сыворотки основаны на высушивании белков до постоянной массы и взвешивании на аналитических весах. Методы трудоемки и в настоящее время практически не используются для определения общего белка сыворотки. Гравиметрический метод продолжает использоваться в некоторых лабораториях для определения фибриногена в плазме крови.

«Преципитационные» методы

«Преципитационные» методы определения общего белка основаны на снижении растворимости белков и образовании суспензии взвешенных частиц под воздействием различных агентов. О содержании белка в исследуемой пробе судят либо по интенсивности светорассеяния (нефелометрический метод анализа), определяемого числом светорассеивающих частиц, либо по ослаблению светового потока образовавшейся суспензией (турбидиметрический метод анализа).

Результаты данной группы методов зависят от множества факторов: скорости смешивания реактивов, температуры реакционной смеси, значения pH среды, присутствия посторонних соединений, способов фотометрии. Тщательное соблюдение условий реакции способствует образованию стабильной суспензии с постоянным размером взвешенных частиц и получению воспроизводимых результатов. «Преципитационные» методы для определения белка в сыворотке крови не получили признания и нашли применение при определении белка в моче, спинномозговой жидкости и многих индивидуальных белков с использованием специфических антител.

Спектрофотометрические методы

Спектрофотометрические методы определения общего белка сыворотки крови основаны на измерении светопоглощения в ультрафиолетовой области.

3. Клинические показатели при нарушении обмена белков.

Интегральным показателем общего белкового метаболизма служит азотистый баланс. Это разница между суточным количеством поступающего с пищей азота и количеством азота, выделенного за тот же период в составе азотсодержащих компонентов мочи и кала (мочевина, мочевая кислота, аминокислоты, креатинин, соли аммония). Косвенно его можно оценить по соотношению небелкового остаточного азота в сыворотке крови и общим белком. У здорового взрослого животного, азотистый баланс нулевой или стремится к нулю.

Положительный азотистый баланс - указывает на то, что аминокислоты задерживаются в организме в реакциях аминирования и переаминирования, т.е. идет на синтез белка. Может быть не только в норме (при росте, интенсивной регенерации, лактации и беременности), но и при патологии - опухолевом росте и при гиперсекреции гормона роста.

Отрицательный азотистый баланс указывает на то, что аминокислоты в организме интенсивно дезаминируются, сопровождает состояния с активированным глюконеогенезом (голодание, белково-энергетическая недостаточность, инсулинзависимый сахарный диабет, гиперкортицизм, стресс).

Композиция белков плазмы - т.е. количество общего белка определяемое в плазме крови и количество отдельных видов белков. Характеризует скорость синтеза и распада белка в организме.

Небелковые азотсодержащие компоненты плазмы крови или остаточный азот крови - под которым понимают азотсодержащие соединения остающееся после осаждения в плазме (сыворотке) белков. К ним относятся мочевина - на долю которой приходится около 50 % от всех азотсодержащих веществ, мочевая кислота и азот аминокислот по 20 %, креатин и креатинин, полипептидный азот.

Коллоидно-осадочные пробы. Сущность этих проб в том, что белки, находящиеся в виде коллоидных растворов осаждаются какими-то химическими соединениями. Степень осаждения зависит от заряда и размеров белка. Альбумины наиболее сложно осаждаются, а иммуноглобулины легче всего. Поэтому данные пробы позволяют косвенно судить о соотношении между отдельными фракциями общего белка. Наиболее часто используют тимоловую пробу и пробу Вельтмана.

Виды нарушений белкового обмена

Собственно нарушения обмена белков включают:

- нарушения количественного поступления белка в организм (белковый перекорм и белковая недостаточность);
- нарушения качественного состава белков (недостаток незаменимых аминокислот, дефицит и избыток отдельных аминокислот, причём последний может приводить как к их антагонизму, так и прямой токсичности);
- нарушения переваривания белков в ЖКТ (что ведет к белковой недостаточности и кишечной аутоинтоксикации, продуктами гнилостного распада белка);
- нарушения трансмембранного транспорта аминокислот (расстройства кишечного всасывания при заболеваниях ЖКТ);
- нарушения промежуточного обмена аминокислот (расстройства дезаминирования; переаминирования; декарбокси-лирования при заболеваниях печени, прежде всего, а также недостаточности ферментных систем).
- нарушения композиции белков плазмы (при заболеваниях органов синтезирующих плазменные белки).
- нарушения конечных этапов обмена белка (аномалии и недостаточность цикла мочевины, и прежде при функциональной недостаточности печени, а также при нарушениях почек - нарушении экскреции конечных продуктов).

Как впервые показано русским учёным **Б.А. Словцовым** (1898), белки не депонируются в организме. Избыток или недостаток белка немедленно приводит к метаболическим сдвигам.

Белковая недостаточность самая распространенная форма патологии белкового обмена. При дефиците белка в рационе организм вынужден извлекать аминокислоты из структурных белков для синтеза регуляторных и функциональных, а также для включения их энергетический метаболизм при общем голодании. Белковая недостаточность значительно сказывается на рост и развитие организма, состояние иммунной защиты (снижается синтез белковых защитных факторов). Наиболее часто бывает алиментарного происхождения (недостаток белка в рационах, его неполноценность) и вторичного происхождения (при заболеваниях ЖКТ, с нарушением переваривания и всасывания).

При избытке белка дополнительные аминокислоты подвергаются энергетической утилизации с образованием большого конечного продукта (аммиака и мочевины), создавая нагрузку на органы утилизации (печень) и экскреции (почки). Избыток белка не ведет к ожирению. Есть данные о развитии гипертрофии эпителия нефронов. При избытке некоторых аминокислот возможно прямое токсическое воздействие, например, избыток метионина может привести к избытку гомоцистеина, который может обусловить возникновение гепатонекрозов, гемолитической анемии и миокар-диодистрофии или избыток триптофана вызывает избыток серотонина, который не безразличен для ЦНС. Структурно схожие аминокислоты могут подавлять утилизацию друг друга (например, лейцин - изолейцина).

1. 4 Лекция №4 (2 часа).

Тема : Клиническая биохимия при нарушении обмена углеводов.

1.4.1 Вопросы лекции:

1. Клиническая биохимия при нарушениях обмена углеводов.
2. Определение глюкозы крови.
3. Сахарный диабет: определение, виды, клинико-биохимическая характеристика.

1.4.2 Краткое содержание вопросов: *(тезисно изложить основное содержание рассматриваемых вопросов)*

1. Клиническая биохимия при нарушениях обмена углеводов.

БИОЛОГИЧЕСКАЯ РОЛЬ УГЛЕВОДОВ - в организме животных обнаружены все виды углеводов (моно, олиго и полисахариды). Они выполняют ряд важных биологических функций.

1.Энергетическая. Углеводы являются основным поставщиком энергии в организме, в том числе почти единственным источником энергии для деятельности головного мозга. Эту функцию выполняют моносахариды (глюкоза, фруктоза и др.).

2.Пластическая. Углеводы участвуют в синтезе сложных ферментов, белков, входят в состав клеточных мембран, участвуют в построении клеток опорно-двигательного аппарата (это гетерополисахариды, глюкозамин, гексо-уроновые кислоты, хондроэтинсерная кислота), синтезе нуклеиновых кислот (рибозы).

3.Защитная. Углеводы входят в состав слизи, различных веществ, секретируемых железами, способствуют обезвреживанию и выведению токсических веществ из организма (глюкоуроновая кислота).

4.Депонирующая. Углеводы являются запасными питательными веществами, откладываясь в печени в виде гликогена, который при голодании распадается до глюкозы.

5.Специфическая (сигнальная). Некоторые углеводы, связанные с белками, определяют групповую специфичность крови.

В растительных кормах углеводы более всего представлены крахмалом, клетчаткой, сахарозой, лактозой. А в животных - гликогеном, другими животными полисахаридами.

Из моносахаров углеводы рационов представлены - глюкозой, маннозой (в целлюлозах), галактозой (в лактозе) и фруктозой (в сахарозе). У травоядных количество углеводов в рационах полностью покрывает энергетические затраты организма, а плотоядных животных часть энергетических затрат покрывается за счет жиров и аминокислот.

Деполимеризация частично углеводов происходит в полости рта, где они подвергаются главным образом действию α -амилазы слюны и более полно в тонком кишечнике. Образовавшиеся моносахариды всасываются через стенку тонкого кишечника в кровь. Всасывание моносахаридов происходит с неодинаковой скоростью, и этот процесс является физиологически активным и энергозависимым. Скорость всасывания галактозы выше, чем глюкозы и фруктозы. Пентозы всасываются еще медленнее. Следует заметить, что в крови находится главным образом глюкоза и небольшое количество других моносахаридов. Около 65% всосавшейся глюкозы поступает к органам и тканям, в первую очередь к клеткам ЦНС, кишечника, мышц, почек. Поступая по воротной вене в печень, глюкоза превращается в гликоген. Способность печени поглощать глюкозу и синтезировать из нее гликоген, а затем расщеплять его до глюкозы носит название гликогенной функции печени.

Глюкоза, поступающая из крови в органы и ткани, подвергается в них различным превращениям, приводящим к ее распаду с освобождением потенциальной энергии. Химическое превращение глюкозы, начиная с процесса ее фосфорилирования и кончая образованием конечных продуктов распада: углекислого газа и воды, носит название тканевого (внутриклеточного), или промежуточного обмена углеводов.

Расщепление глюкозы в тканях может протекать двумя путями: анаэробным (без участия кислорода) и аэробным (в присутствии кислорода, при условии достаточного насыщения им тканей). **Промежуточный обмен углеводов.**

Анаэробный путь расщепления глюкозы носит название гликолиза. Если же начальным продуктом анаэробного распада углеводов является гликоген, то говорят о процессе гликогенолиза. Это короткий ферментативный путь расщепления глюкозы до пировиноградной и молочной кислот. Энергетически он малоэффективен, имеет большое значение в органах, функционирующих в условиях гипоксии.

Аэробный путь распада углеводов является наиболее важным в энергетическом отношении. Установлены 2 основных механизма аэробного расщепления глюкозы: непрямой и прямой.

Непрямой путь расщепления глюкозы преобладает. Это так называемый цикл трикарбоновых кислот, или цикл Кребса (рис. 33). В цикле Кребса происходит полное расщепление молекулы глюкозы до углекислого газа и воды и выделяется 38 молекул АТФ. Это есть основной путь пополнения энергии в организме.

И аэробное, и анаэробное расщепление углеводов протекает на определенных этапах при участии одних и тех же ферментов: киназ, фосфатаз, дегидрогеназ и т. д. Отличительная особенность обмена углеводов при их аэробном распаде заключается в том, что в присутствии кислорода конечный продукт анаэробного распада — молочная кислота подвергается дальнейшим превращениям. С помощью фермента лактатдегидрогеназы молочная кислота окисляется до пировиноградной кислоты. Пировиноградная кислота занимает одно из центральных мест в обмене углеводов. Она участвует в многочисленных реакциях, важных для процессов тканевого обмена веществ. Пировиноградная кислота подвергается аэробному декарбоксилированию с образованием двууглеродного остатка (ацетил), который при участии ко-энзима А (КоА) в виде ацетил-КоА передается щавелево-уксусной кислоте - первому продукту цикла Кребса.

Нарушение всасывания углеводов. Для усвоения поли- и дисахаридов необходимо их расщепление в кишечнике до моносахаридов. Нарушение образования или выделения сока поджелудочной железы, содержащего фермент α -амилазу, влечет за собой расстройство всасывания углеводов. Это может наблюдаться при поражениях ткани

поджелудочной железы (панкреатиты) и при закупорке ее выводного протока (камни, опухоли). Наличие в кале не переваренных зерен крахмала является одним из показателей нарушения усвоения полисахаридов. Нарушение всасывания моносахаридов, в частности глюкозы, может быть обусловлено патологическим процессом в самой стенке тонкого кишечника. Нормальный процесс всасывания моносахаридов (глюкозы, галактозы, фруктозы) связан с их фосфолированием и дефосфолированием в эпителии кишечника. При воспалении слизистой оболочки кишечника, злокачественном перерождении ее, отравлении ферментативными ядами, блокирующими процесс фосфолирования моносахаридов, нарушается всасывание углеводов. Патология всасывания углеводов особенно легко развивается новорожденных животных.

2. Определение глюкозы крови.

Содержание глюкозы более 200 мг/дл у собак и более 250 мг/дл у кошек, увеличение активности АЛТ и АСТ, гиперхолестеринемия и гиперлипидемия, гипернатриемия, гипокалиемия, гипофосфатемия; при тяжелой дегидратации и/или кетоацидозе снижено общее содержание двуокси углерода и гидрокарбоната. При кетоацидозе высокая анионная разница. Концентрация инсулина в плазме крови нормальная или повышена при диабете II типа, при сахарном диабете I типа она снижена или инсулин вообще отсутствует. Однако длительная гипергликемия блокирует секрецию собственного инсулина даже при сохранных бета-клетках. Нарушение компенсации проявляется глюко-зурией (обязательно), кетонурией (может не быть), снижением плотности мочи. Наиболее значимую информацию для выявления панкреатита дает УЗИ живота. Оно обязательно у пациентов с желтухой для выявления жирового гепатоза, холангиогепатита. При желтухе иногда показана чрескожная биопсия печени.

3. Сахарный диабет: определение, виды, клинико-биохимическая характеристика.

Стойкая и выраженная гипергликемия чаще всего сопровождается **сахарный диабет**. Принято выделять инсулинзависимый сахарный диабет и инсулиннезависимый сахарный диабет.

На уровень глюкозы в крови влияет и состояние клубочковой фильтрации.

Гипергликемия вызывает гликозилирование различных белков — гемоглобина, альбумина, белков базальной мембраны, что приводит к изменению их свойств, повышению иммуногенности и развитию сосудистых поражений.

Избыток глюкозы «вступает» на сорбитоловый путь обмена, что приводит к отложению сорбита в мембранах клубочков почек (это обуславливает повышение почечного порога для глюкозы, исчезновение ее из мочи), в хрусталике глаза (вследствие чего развивается катаракта), в стенках сосудов (формируется артериолосклероз).

Уровень глюкозы в крови повышается также при некоторых заболеваниях печени, гемохроматозе (пигментном циррозе печени).

Выделяют гипергликемии центрального происхождения - вследствие механического, токсического, гипоксического-го раздражения клеток головного мозга. Неврогенные ГГК наблюдаются при травме головного мозга, внутричерепном кровоизлиянии, энцефалите, шоке, тяжелой интоксикации, лихорадке, энцефалопатиях и некоторых других состояниях.

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

Гипогликемия (ГПГ) - снижение содержания глюкозы в крови - чаще всего связана с абсолютным или относительным повышением уровня инсулина в крови.

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

Первичная гиперинсулинемия наблюдается при заболеваниях поджелудочной железы, сопровождающихся гиперсекрецией инсулина (гиперплазия бета-клеток островков Лангерганса, дегенерация альфа-клеток и др.). Выявляется прежде всего при инсулинпродуцирующих опухолях островков поджелудочной железы.

Вторичная гиперинсулинемия развивается у больных с поражением печени, желудочно-кишечного тракта, центральной нервной системы, а также при недостаточной выработке контринсулярных гормонов.

Внепанкреатическая гипогликемия отмечается в результате нарушения баланса между выраженностью процессов гликогенолиза и глюконеогенеза в печени при острых и хронических гепатитах, циррозах, острой и подострой дистрофии печени, отравлениях мышьяком, фосфором, при длительной механической желтухе, застойной печени, первичном или метастатическом раке печени.

Снижение концентрации глюкозы в крови часто наблюдается у больных животных при неукротимой рвоте, анорексии, уремии, обильной лактации и глюкозурии у беременных. Гипогликемия может возникать при поражении желудка и кишечника, при хирургическом удалении части тонкого кишечника; при нарушении всасывания глюкозы в кишечнике (энтериты, энтероколиты, синдром мальабсорбции, целиакия, муковисцидоз, дисбактериозы, длительные поносы), лихорадке, интенсивной физической нагрузке, голодании, переохлаждении.

Гипогликемия сопровождает многие эндокринные заболевания, в том числе гипопитуитарную и надпочечниковую недостаточность, гипопункцию щитовидной железы (микседема). Она встречается и при сахарном диабете: быстрое снижение концентрации глюкозы в крови больных животных приводит к развитию гипогликемической комы, тогда как при медленном уменьшении ее коматозное состояние не возникает.

Гипогликемия может быть центральным при энцефалите, опухоли мозга.

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

Гипогликемия, сопровождающаяся кетозом, обнаруживается у новорожденных животных (поросят) вследствие дефицита аминокислоты аланина, отравлениях хлороформом и его солями недостатке в организме микроэлементов, ацидозе, гипокенезии, остеодистрофии..

Для дифференциальной диагностики гипогликемических состояний используют различные нагрузочные пробы - тесты толерантности к глюкозе, пробы с адреналином, преднизолоном и др.

Глюкозурия. В моче здоровых животных глюкоза практически не обнаруживается. Профильтровавшись через мембраны клубочков, глюкоза вновь реабсорбируется в проксимальных канальцах нефронов. В этом процессе принимают участие ферменты гексокиназа (глюкокиназа), фосфорилирующая глюкозу, и щелочная фосфатаза. Под влиянием последней происходит отщепление остатка фосфорной кислоты и глюкоза поступает в кровоток.

В том случае, когда гипергликемия достигает величины почечного порога, может присоединиться глюкозурия. Однако появление глюкозы в моче зависит не только от концентрации ее в крови. Это определяется также соотношением между количеством профильтровавшейся и реабсорбируемой в канальцах клубочков глюкозы за 1 мин.

1. 5 Лекция №5 (2 часа).

Тема : Клиническая биохимия при нарушении обмена липидов.

1.5.1 Вопросы лекции:

1. Клиническая биохимия при нарушениях обмена липидов.
2. Определение уровня холестерина, общих липидов, фосфолипидов в сыворотке крови.
3. Экстракция и разделение липидов сыворотки крови.

1.5.2 Краткое содержание вопросов: *(тезисно изложить основное содержание рассматриваемых вопросов)*

1. Клиническая биохимия при нарушениях обмена липидов.

Липиды — разнообразные по химическому строению вещества. Они характеризуются способностью растворяться в эфире, хлороформе, других жировых растворителях и только незначительно (и не всегда) — в воде, а также формировать вместе с белками и углеводами основной структурный компонент живых клеток.

Роль липидов в организме:

- форма депонирования энергии (триацилглицериды, свободные жирные кислоты);
- структурные компоненты клеточных мембран (свободный холестерол и фосфолипиды);
- липиды участвуют в процессах терморегуляции, предохранении жизненно важных органов (например, почек) от механических воздействий (травм), потери белка, в создании эластичности кожных покровов, защите их от избыточного удаления влаги;
- некоторые из липидов являются биологически активными веществами, обладающими свойствами модуляторов гормонального влияния (простагландины) и витаминов (полиненасыщенные жирные кислоты). Более того, липиды способствуют всасыванию жирорастворимых витаминов А, D, Е, К, выступают в роли антиоксидантов (витамины А, Е и др.), во многом регулирующих процесс свободнорадикального окисления физиологически важных соединений, обуславливают проницаемость клеточных мембран по отношению к ионам и органическим соединениям, служат предшественниками ряда стероидов с выраженным биологическим действием: желчных кислот, витаминов группы D, половых гормонов, гормонов коры надпочечников.

Особенности метаболизма липидов:

1. наличие ресинтеза липидов в энтероцитах;
2. транспортировка по организму в виде липопротеинов - комплексов липидов с особыми аполипептидами, синтезируемыми в печени, и частично в кишечнике (рис);
3. создание больших резервных запасов.

Нарушения поступления, всасывания и переваривания липидов отмечают при.

1) алиментарном дефиците или заболеваниях поджелудочной железы, печени и стенки кишечника - в данном случае наблюдается недостаток липидов в организме и блокируются энергетическая и структурные функции липидного обмена прежде всего, происходит истощение жировых депо.

2) алиментарном избытке - наблюдается накопление жиров в депо и органах;

3) алиментарном дисбалансе:

- ограниченное потребление углеводов или инсулинзависимый сахарный диабет - когда жирные кислоты вовлекаются в распад для покрытия энергетического дефицита, а следовательно увеличивается продукция кетокислот;

- при избытке углеводов липиды интенсивно откладываются в депо, за счет увеличения липолиза из метаболитов углеводов;

4) нарушении промежуточного обмена липидов:

- наиболее значимые нарушения отмечаются при заболеваниях печени снижается синтез липопротеинов, желчных кислот и др.;

5) местные нарушения обмена липидов (жировая инфильтрация, декомпозиция и трансформация - как следствие избытка липидов).

Клинико-биохимическая диагностика нарушений липидного обмена.

Биохимическая диагностика нарушений обмена липидов строится на определении содержания транспортных метаболитов липидного обмена в плазме крови.

Липемия - содержание общих липидов в плазме крови.

Группу «общих липидов» плазмы составляют нейтральные жиры (триацилглицерины), фосфорилированные производные их основных предшественников (фосфолипиды); свободный и эфирсвязанный холестерол; гликолипиды, незэстерифицированные (свободные) жирные кислоты. Подавляющее большинство перечисленных соединений (среди них прежде всего фосфолипиды, холестерол, триацилглицерины) в виде липопротеинов. Большая же часть свободных, или незэстерифицированных, жирных кислот дает комплексы с альбумином плазмы.

Гиперлипидемия (гиперлипемия) - увеличение концентрации общих липидов плазмы как физиологическое явление может наблюдаться через 1 - 4 ч после кормления. Алиментарная гиперлипемия выражена тем сильнее, чем ниже уровень липидов в крови больного животных натошак.

2. Определение уровня холестерина, общих липидов, фосфолипидов в сыворотке крови.

Диагностическое значение исследования активности эритроцитарных ферментов значительно уже, чем плазматических. В клинко-диагностических целях ферменты эритроцитов исследуют для выявления тех ферментопатии, с которыми связаны заболевания красной крови. Обычно это гемолитические анемии. Известны гемолитические анемии, вызванные дефектами многих ферментов гликолиза и пентозофосфатного пути. Наиболее хорошо изучены ферментопатии связанные с дефектами ферментов пируваткиназы, гексокиназы, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, 6-фосфоглюконатдегидрогеназы.

В некоторых случаях эритроцитарные ферменты используются для диагностики ферментопатии не связанных с патологией красной крови. В этом случае ферменты эритроцитов, служат лишь удобными генетическими маркерами. Например, дефект такого фермента эритроцитов как АТФаза, позволяет диагностировать мышечную дистрофию, фермента галактозо-1-фосфатуридин-трансферазы - галактоземию.

В ряде случаев клинко-биохимических исследований проводится определение изоферментов. Изоферменты - молекулярные формы одного и того же фермента. Они катализируют одну и ту же реакцию, но различаются по физикохимическим свойствам, сродством к субстрату, антигенными и другими свойствами. Множественность форм ферментов обусловлена двумя причинами. К первой следует отнести то, что в организме имеются множественные гены (генетические причины), каждый из которых кодирует свою субъединицу фермента, ко второй - возможность посттрансляционных изменений уже синтезированных субъединиц (ферментов).

Если в клетке синтезируется две и более субъединицы и они способны соединяться друг с другом в любых комбинациях, то образуется несколько изоферментов. Изоферменты состоящие из различных субъединиц называются гибридными. Они обладают промежуточными физическими, химическими и другими свойствами. Это хорошо наблюдается при электрофоретическом разделении изоферментов лактатдегидрогеназы, которые состоят из субъединиц двух типов Н_иМ.

Из них образуются пять тетрамеров - Н₄, Н₃М, Н₂М₂, НМ₃, М₄. Наиболее высокой электрофоретической подвижностью обладает тетрамер Н₄ (ЛДГ-1) наименьшей - ЛДГ-5 (М₄), остальные обладают промежуточной подвижностью. Изоферментный профиль клеток зависит от соотношения синтезируемых в ней субъединиц. Преобладать будут те изоферменты, в которые входят субъединицы содержащиеся в клетке в наибольшем количестве.

Определение изоферментов в сыворотке крови имеет важное диагностическое значение, так как распределение в тканях отдельных изоферментов более специфично, чем общей ферментативной активности. Например, в клинической диагностике довольно

широко используется определение активности такого фермента, как щелочная фосфатаза. В сыворотку крови щелочная фосфатаза поступает в основном из костной ткани, печени, кишок. Поэтому при патологии этих органов активность щелочной фосфатазы будет возрастать и дифференциальную диагностику на основании определения общей активности провести нельзя. Однако «костный» и «печеночный» изоферменты различаются по своей электрофоретической подвижности и температурной устойчивостью, что позволяет проводить их раздельное определение. Увеличение активности, «костного» изофермента свидетельствует о поражении костной ткани, в то время как увеличение «печеночного» - говорит о патологии печени.

3. Экстракция и разделение липидов сыворотки крови.

Гиполипемия - встречается реже и указывает на алиментарное голодание.

Патофизиологические механизмы, обуславливающие сдвиги в содержании всей фракции общих липидов, в большей или меньшей степени определяют выраженное изменение концентрации составляющих ее подфракций: холе-стерола, общих фосфолипидов и триацилглицеринов.

Холестеролия (холестерол) представляет собой вторичный одноатомный ароматический спирт (3-окси-5-холестенен), в молекуле которого имеется общее всем стершм полициклическое ядро циклопентанпергидрофенантре-на.

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

В организме животных выделяется два основных фонда холестерина: структурный, представленный свободным холестерином плазматических мембран, и метаболически активный, гетерогенный по фракционному составу эфросвязанного холестерина. Он обнаруживается в основном в липопротеинах плазмы крови, коре надпочечников, сурфактанте легких.

В плазме крови холестерол находится главным образом в составе ЛПНП и ЛПОНП, причем 60—70% его представлено в форме сложных эфиров, а 30-40% - свободного, неэстерифицированного холестерина. Свободный и эстерифицированный холестерол составляет фракцию общего холестерина. Гиперхолестеролия первичная - алиментарные причины; и вторичная. Она наблюдается при застое желчи, поражениях почек (гломерулонефрите, нефротическом синдроме с отеками, хронической почечной недостаточности), злокачественных опухолях поджелудочной железы и подагре, эндокринных расстройствах (изолированном дефиците соматотропина, гипотиреозе, сахарном диабете, ожирении (в 50—80% случаев), авитаминозе В. Увеличение содержание холестерина в крови коров отмечается в первые 3 месяца лактации.

Гипохолестеролия. Снижение уровня ХС плазмы наблюдается у больных животных при голодании, у страдающих синдромом мальабсорбции, при поражении центральной нервной системы, хронической недостаточности сердечно-сосудистой системы, кахексии, гипертиреозе, острых инфекционных, остром панкреатите, острых гнойно-воспалительных процессах в мягких тканях, лихорадочных состояниях, легочном туберкулезе, пневмонии неспецифической, саркоидозе органов дыхания, бронхите, анемии, гемолитической желтухе, остром гепатите, злокачественных опухолях печени, других онкологических заболеваниях (раке кишечника), ревматизме.

Определение липоидного фосфора или фосфолипидов - на их долю приходится 1/3 от общих липидов. Биологическая роль (структура биомолекул, процессы свертывания крови). Повышенное содержание - встречается при сахарном диабете, циррозе печени, нарушении свертывания крови, а так же может указывать на процессы протекающие с разрушением клеточных мембран. Снижение при вирусных гепатитах, гипотиреозах.

Липопротеинемия. Липопротеины транспортная форма липидов в организме. Табл. ХМ - синтезируются в энтероцитах и гепатоцитах, представлены преимущественно ТГ. ЛПОНП - синтезируются в гепатоцитах и энтероцитах. ЛПНП - синтезируются в печени и плазме. ЛПВП - в плазме.

Клинически важно установление соотношения между фракциями липопротеинов, для диагностики болезней печени и атеросклероза. У некоторых животных существует риск развития атеросклероза (нпр. морские свинки, свиньи). Исследования липидного обмена показало, что у первых основная часть холестерина плазмы приходится на липопротеины низкой плотности (Р-липопротеины), которые обладают высокой атерогенностью.

У вторых (устойчивых) основная часть холестерина плазмы содержится в липопротеинах высокой плотности (а-липопротеинах). Обычно рассчитывают коэффициент атерогенности представляющий отношение:

$$\frac{\text{ЛПНП} + \text{ЛПОНП}}{\text{ЛПВП}}$$

Кетонемия - содержание в крови кетоновых тел. Нарушение липидного обмена может приводить к накоплению в организме кетоновых или ацетоновых тел (кетоз). К кетоновым телам относят ацетоуксусную кислоту (ацетоацетат) $-\text{CH}_3\text{COCH}_2\text{COOH}$, Р-гидроксимасляную кислоту (β-гидроксибутират) $-\text{CH}_3\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{COOH}$ и ацетон $-\text{CH}_3\text{COCCH}_3$.

Кетоновые тела являются естественными продуктами обмена веществ, образующимися своими метаболическими путями и имеющими важное энергетическое значение. Кетоновые тела синтезируются из ацетил-КоА, образующегося в результате Р-окисления свободных жирных кислот, из глюкозы или в результате ацилирования уксусной кислоты, образующейся в значительном количестве в рубце жвачных животных, а также в процессе метаболизма аминокислот.

При ненарушенном обмене веществ и достаточном количестве углеводов ацетил-КоА окисляется в цикле Кребса и образующиеся сравнительно небольшие количества кетоновых тел будут утилизироваться в тканях.

1. 6 Лекция №6 (2 часа).

Тема : Клиническая биохимия при нарушении минерального обмена.

1.6.1 Вопросы лекции:

1. Клиническая биохимия при нарушении минерального обмена.
2. Роль минеральных веществ в организме животных.
3. Изменение минерального состава крови при различных состояниях животных.

1.6.2 Краткое содержание вопросов: *(тезисно изложить основное содержание рассматриваемых вопросов)*

1. Клиническая биохимия при нарушении минерального обмена.

Подход к диагностике обеспеченности организма минеральными веществами строится в зависимости от возможных причин нарушений.

Среди данных причин выделяют:

1. Алиментарные, в том числе и эндемические предпосылки (в большей степени свойственно для микроэлементов);
2. Нарушение процессов всасывания в кишечнике (при гастрите нарушено всасывание Co);
3. Нарушение промежуточного обмена элемента -
 - прежде всего это недостаток регулирующих факторов (гормонов, витамина D_3);
 - при некоторых заболеваниях и патологических состояниях внутренних органов обмен некоторых элементов нарушается значительно (резко меняются концентрации

жизненноважных элементов-ионов, участвующих в обеспечении гомеостаза организма - Na, K и др).

Оценить обеспеченность организма минеральными веществами следуя принципу балансового опыта. Т.е. необходимо произвести учет суточного потребления с кормом того или иного элемента. Исключить возможное влияние вторичных факторов. Дополнительно используют определение концентраций минеральных элементов в крови и органах депо. Интенсивно изучается концентрация токсических микроэлементов в волосяном покрове для диагностики токсикозов.

Теория о геобиохимических провинциях дополнительно может указывать на возможный диагноз. Ранее были изданы справочники по кормопроизводству и геологии где территории разбивались на геобиохимические провинции. Территория РБ недостаточна по Se, Co, I, Zn и ряду других элементов, с избытком железа. В настоящее время значительное влияние на содержание неорганических элементов в верхних слоях литосферы оказывает техногенный фактор. Значительно повысилась концентрация таких токсических элементов, как Pb, Ni, Mn, Hg, Cd. Свинец, ртуть и кадмий относятся к тройке наиболее значимых загрязнителей. Определение концентраций их в кормах, почвах и воде используют в качестве мониторинговых. В зоне крупных промышленных предприятий и городов их концентрации знатиельные. В РБ определенное влияние на развитие геобиохимической провинции оказала авария на ЧАЭС.

Содержание **натрия и калия** в биологических жидкостях, тканях, кормах и воде определяют методами пламенной фотометрии. Так у здоровых коров в плазме крови содержится 3,2-3,4 г/л (139,2-147,9 ммоль/л) натрия и 0,16-0,20 г/л (4,1-5,1 ммоль/л) калия. Гипо- и гиперкалиемия - соответственно недостаток или избыток калия. Калий - основной внутриклеточный катион, 98,5% его находится внутри клеток и только 1,5% вне их. Он участвует в поддержании осмотического давления, кислотно-щелочного равновесия, в нервно-мышечной возбудимости, метаболизме клетки. Причиной гипокалиемии может быть недостаток калия в кормах, при его потерях с пищеварительными соками и мочой, в результате гиперсекреции альдостерона. К биогенным макроминеральным элементам относят кальций, фосфор, магний, калий, натрий, хлор и серу.

Кальций. В организм животного кальций поступает с кормами и минеральными добавками. В растительных кормах он связан с белками и анионами органических кислот, в добавках - с анионами карбоната или фосфата. Независимо от формы кальциевых соединений большая часть введенного кальция (кроме оксалата) под влиянием желудочного сока превращается в кальция хлорид, почти полностью диссоциирующий на ионы. В ионной форме он абсорбируется в кишечнике и частично в желудке. Кислая среда в кишечнике способствует лучшему всасыванию кальция, а щелочная - наоборот.

О снижении усвояемости кальция из растительных кормов при наличии в них щавелевой кислоты свидетельствуют и опыты на коровах, где установлено, что при скармливании сена из люцерны доступность кальция составляла 50-70%. Некоторые авторы отмечают, что около 33 % кальция люцерны находится в форме оксалата. При этом с помощью электронной микроскопии показано, что кристаллы оксалата кальция, обнаруженные в рубцовом содержимом, не изменяются при прохождении по пищеварительному тракту.

При чрезмерно высоком отношении фосфора к кальцию последний хуже всасывается в кишечнике, что объясняется образованием нерастворимых третичных фосфорных соединений.

При длительном скармливании рационов с пониженным содержанием кальция животные компенсируют его дефицит путем увеличения скорости всасывания кальция и снижения его эндогенных потерь с калом. В этом случае в слизистой кишечника идет более интенсивный синтез кальций связывающего белка и тем самым увеличивается способность кишечника всасывать кальций. При переводе животных на рацион с высоким уровнем кальция образование кальций связывающего белка снижается.

В организме животных наряду с участием в минеральном, белковом, витаминном обменах кальция обуславливает свертывание крови; ионы кальция регулируют мышечную и нервную деятельность. В перивитальной ткани кальция препятствует проникновению калия из клеток в тканевую жидкость, в результате процессы возбуждения ослабляются.

Содержание фосфора, связанного с фитиновой кислотой, в растительных кормах колеблется от 30 до 85 %. Практически такой фосфор недоступен для организма моногастрических животных, особенно для молодняка свиней и птицы. У жвачных всасывание фитатного фосфора может быть таким же, как и усвоение неорганического фосфора, и зависит от соотношения Са:Р; если оно выше 2:1, то всасывание фосфора в пищеварительном тракте животных снижается.

Недостаток или избыток фосфора в рационе подавляет функцию половых органов и оплодотворяемость у коров и нетелей. При дефиците кальция и фосфора, а также при избытке кальция и недостатке фосфора у телят могут развиваться клинические признаки рахита, сопровождающиеся потерей аппетита и истощением.

Подобно кальцию фосфор необходим для роста, дифференциации, минерализации скелета, для образования и секреции молока. При уровне молочной продуктивности 30 кг в сутки выделение фосфора из организма с молоком может достигать 28-30 г (в 1 кг молока содержится 0,9-1,0 г фосфора). Следовательно, для коровы с живой массой 600 кг при продуктивности 30 кг молока для поддержания жизни требуется 30 г фосфора в сутки и 1,7-1,9 г фосфора на 1 кг молока, т. е. общая суточная потребность в фосфоре составит 81-87 г.

2. Роль минеральных веществ в организме животных.

Особенности метаболизма и патофизиология обмена минеральных веществ в организме

Из 92 элементов, что встречаются в природе в организме обнаружено 81. 47 из них присутствуют в организме постоянно. На долю минеральных (неорганических) веществ по массе приходится около 70 %. По количеству элемента в организме они подразделяются на:

- макроэлементы** (O_2 , С, Н, Са, Cl, Р, Mg, К, Na, N и др.) - количество элемента исчисляется процентами или десятками долями от массы тела;
- микроэлементы** (Си, В, I, F, Fe, Zn и др.) на их долю приходится 10^{-3} - 10^{-5} ;
- ультрамикроэлементы** (Se, Co, V, Cr, As, Ni, Li и др.) на их долю приходится 10^{-3} - 10^{-5}).

Для биохимиков и клиницистов наибольший интерес представляет классификация, которая основывается на биологической роли минеральных веществ в организме. Согласно которой они подразделяются на:

-**биогенные** (биотические, эссенциальные) - всегда присутствуют в организме и выполняют определенные роли;

-**условно необходимые элементы** - присутствуют в организме, однако потребность в них строго не доказана. **Биогенный элемент должен отвечать 3 условиям:**

1. постоянно присутствовать в организме в определенных количествах;
 2. рацион, не содержащий элемента, должен вызывать специфические признаки недостаточности и определенные биохимические нарушения;
 3. признаки недостаточности должны устраняться при введении элемента в рацион.
- Биологические **роли** минеральных веществ разнообразны:

1. структурная;
2. регуляторная;
3. гомеостатическая (КОР, обмен воды);

Особенности обмена макро и микро элементов в организме.

1. Алиментарное поступление элемента (отсутствие синтеза) и избирательное распределение в организме (4874 % содержится в костях).
2. Две формы присутствия элементов в организме - связанная и свободная (ионная).
3. Наличие градиента концентрации для основных ионов между внутриклеточной и внеклеточной средой;
4. Соблюдение правила электронейтральности - сумма катионов и анионов должна равняться 0;
5. Наличие антагонистических отношений между определенными элементами (Mg и Ca).
6. Гормональный контроль регуляции некоторых минеральных веществ (натрий, кальций, хлорид и др.).
7. Всасывание большинства веществ возможно лишь при наличии переносчика (фактор Кастля), в ионизированной форме (определенной валентности). Некоторые элементы всасываются по градиенту концентрации.
8. Избыток элемента в организме так же вызывает определенные биохимические нарушения.

3. Изменение минерального состава крови при различных состояниях животных. Основным источником витаминов и минеральных веществ, для животных являются корма. В то же время минерально-витаминный состав каждого вида корма подвержен значительным колебаниям и зависит от типа почв, климатических условий, вида растений, фазы вегетации, проводимых хозяйствами агрохимических мероприятий, технологии уборки, хранения и подготовки заготовленных кормов к скармливанию и других факторов. Исходя из чего, в хозяйствах часто наблюдается в заготовленных кормах недостаток одних элементов и избыток других, что приводит к возникновению заболеваний, снижению продуктивности, нарушениям в воспроизводстве, ухудшению качества получаемого от коров молока и низкой эффективности использования кормов.

В современных условиях ведения животноводства контроль со стороны специалистов за обеспеченностью животных минеральными веществами и витаминами чрезвычайно важен, так как заболевания связанные с их недостаточностью, дисбалансом и токсичностью, получили сейчас широкое распространение. Дополнительно у животных появляются новые формы витаминно-минеральной недостаточности: остеохондрозы, токсикозы, остеодистрофии, артрозы, слабость конечностей, мышечные дистрофии у молодняка, послеродовые заболевания у высокопродуктивных коров (гипокальцемия, гипофосфатемия, анемия), нарушения в воспроизводительной функции, стрессоустойчивости и неспецифической резистентности организма, отравление экотоксинами, изменение поведения, образование камней в моче- и желчевыводящих путях, нарушение функции щитовидной железы, кислотно-щелочной дисбаланс и т.п.

На практике специалисты обычно наблюдают стертые и осложненные формы, что создает определенные сложности при постановке диагноза. Чаще всего нарушение витаминно-минерального обмена у животных протекает без каких-либо клинических признаков. К примеру, недостаточное или избыточное обеспечение животных минеральными веществами и витаминами ведет к снижению использования питательных веществ корма, продуктивности, качества продукции, воспроизводительной способности и устойчивости к болезням. Подобного рода субклиническую патологию специалисты имеют возможность определить только при проведении биохимического исследования у таких животных. При выявлении недостаточности или токсичности того или иного минерального элемента и витаминов необходимо учитывать все полученные данные: биохимические показатели крови, молока, органов, тканей, экскретов и волосяного покрова; содержание минеральных веществ в почве, воде и кормах; клинические признаки; уровень продуктивности; ответную реакцию организма на витаминно-минеральные добавки (премиксы).

У животных получающих несбалансированный по минеральным веществам рацион кормления отмечаем: ухудшение аппетита, использование питательных веществ корма, снижается воспроизводительная функция и продуктивность, шерстный покров становится тусклым и взъерошенным. Проявлением недостаточности или токсикоза минеральных веществ, служат такие болезни животных, как паракератоз, рахит, сухотка, зоб, тетания, флюороз, анемия и другие. Когда минеральный элемент тесно связан с одним органом или одной функцией организма (например, йод со щитовидной железой), мы будем иметь дело с однообразной и довольно специфической клинической картиной. В то же время специалисты при наличии у животного заболевания зобом должны учитывать, что зоб могут вызвать и гойтрогенные вещества, содержащиеся в рапсе, капусте, сурепке, льняном шроте, белом клевере, соевых бобах, горохе и др., а также некоторые лекарства. Недостаточность таких элементов, как медь и цинк, проявляется весьма своеобразно, в связи с участием их в биосинтезе многих ферментов. Дефицит минеральных веществ у животных может быть вторичным или комплексным, а также возможно одновременное проявление недостатка одного элемента и избытка другого: Си и Zn, Си и Mo, Cd и Zn, Mn и Fe, Cu и Pb.

Доказано, что определенные метаболические процессы могут нарушаться как при недостатке, так и избытке многих элементов. К примеру, аналогичные или очень близкие поражения костного скелета бывают при недостатке Ca, P, Mn, Cu, Mn, Zn, Si, витаминов A и D, а также при избытке Mo, F, Sr, витамина D. Анемию также может вызвать недостаток Fe, Cu, Co, некоторых витаминов или избыток в рационе Mn, Mo, Zn, Cu, Pb, Se. Снижение и извращение аппетита у животных бывает при дефиците Ca, P, Na, Co, Cu, Zn и при избытке многих элементов. Учитывая вышеизложенное специалисты хозяйств при оценке статуса минеральных веществ и витаминов основное свое внимание должны уделять своевременному выявлению у высокопродуктивных животных субклинических стадий их недостаточности, токсикоза и организации необходимых профилактических мероприятий.

Уровень **кальция** в крови здоровых животных зависит от содержания в рационе Ca, P, Mg, витамина D в рационе, от состояния гормональной системы, желудочно-кишечного тракта, почек и других органов.

Содержание кальция в крови понижается при **длительном** дефиците его в рационе, плохом усвоении вследствие недостатка витамина D и паратгормона.

Гипокальцемия сопровождается остеодистрофией, рахит, послеродовой парез, гипофункцию околощитовидных желез. Гипокальцемия у животных может быть при нефрозе и нефрите. При субклинической форме недостаточности кальция в плазме (сыворотке) крови животных снижается концентрация кальция (ниже 8,0 мг %), повышается активность щелочной фосфатазы, содержание неорганического фосфора и магния; в моче увеличивается концентрация фосфора, магния, оксипролина; в костной ткани повышается (в 2–3 раза) активность щелочной фосфатазы, снижается содержание золы, Ca, P, Mg; уменьшается плотность и прочность костей.

При избытке кальция в корме (2% на сухое вещество) концентрация этого элемента в плазме крови возрастает в 1,4 раза, содержание неорганического фосфора снижается в 3 раза, активность щелочной фосфатазы не изменяется. Повышение кальция в крови у животных может быть при передозировке витамина D, гиперфункции паращитовидных желез.

Все виды обмена веществ в организме животных неразрывно связаны с превращением фосфорной кислоты. Уровень **фосфора** в крови зависит от тех же факторов, что и содержание кальция. Недостаток фосфора в кормах рациона сопровождается снижением в плазме крови концентрации неорганического фосфора (менее 4 мг%), повышением активности щелочной фосфатазы, содержания Mg и Ca; в моче снижается концентрация фосфора и увеличивается количество Mg и Ca (в 5–10 раз), оксипролина; в костной ткани уменьшается содержание фосфора, кальция, магния, золы; снижается плотность и прочность костей. Снижение фосфора в крови отмечают при

длительном недостатке его в кормах рациона, плохом усвоении или расстройствах желудочно-кишечного тракта, при недостатке витамина D и паратгормона, при остеодистрофии, рахите, урвской болезни, пеллагре и других заболеваниях животных.

Избыток фосфора в кормах приводит к увеличению в плазме крови количества фосфора, снижению концентрации магния и не изменяет содержание в ней кальция и активности щелочной фосфатазы. Аналогичную картину можно наблюдать в моче животных. Гиперфосфатемия наблюдается при уменьшении секреции паратгормона, при сердечной недостаточности, кетозе, передозировке витамина D, нефритах, нефрозах, токсикозах, мышечном перенапряжении.

Гиповитаминоз D сопровождается в плазме крови возрастанием активности щелочной фосфатазы и снижением концентрации кальция, фосфора и магния. Избыток витамина D приводит к значительному увеличению содержания кальция и фосфора в плазме крови.

При недостатке магния в рационе происходит уменьшение концентрации магния в плазме крови (менее 1,7 мг %), моче и костной ткани, на фоне умеренного снижения содержания P и Mg в костях, без существенного изменения концентрации Ca и P и активности щелочной фосфатазы. Недостаточность магния в крови у животных, при избытке калия и азота в рационе клинически проявляется симптомами пастбищной тетании, послеродового пареза, остеодистрофии, транспортной болезнью.

Недостаточность натрия, калия, хлора, серы на обычных товарных фермах с содержанием животных имеющих небольшую продуктивность встречается редко, так как животноводы в рацион кормления животных регулярно добавляют поваренную соль и серосодержащие аминокислоты. Однако у высокопродуктивных животных (5000кг и более) обычно наблюдается недостаточность Na и S, Cl. Дефицит хлора, даже когда в рацион не вводится поваренная соль встречается у животных крайне редко, а недостаточность калия может быть у жвачных при высококонцентратном типе кормления, ввиду того, что зерновые корма составляющие основу рациона при высококонцентратном типе кормления бедны калием. При дефиците калия, серы и хлора в организме у животных снижается их концентрация в плазме крови и моче. Избыток натрия, хлора, калия и серы из организма животных выделяется в основном с мочой.

1. 7 Лекция №7 (2 часа).

Тема : Исследование печени.

1.7.1 Вопросы лекции:

1. Клинико-биохимическое исследования печени.
2. Значение печени в обмене веществ.
3. Функции печени и ее роль в метаболизме.
4. Биохимические показатели функции печени и их клиническое значение.

1.7.2 Краткое содержание вопросов: *(тезисно изложить основное содержание рассматриваемых вопросов)*

1. Клинико-биохимическое исследования печени.

В настоящее время ветеринарная гепатология рассматривает три нозологические единицы болезней печени: гепатит, гепатоз и цирроз, а также три единицы болезней желчевыводящих путей: холецистит, холангит и желчекаменную болезнь. Выделенная в начале прошлого века из гепатоза токсическая дистрофия печени со временем была оформлена в нозологическую единицу. Впервые эта болезнь была описана Е.М. Земмером в 1882 г. под названием «энзоотический гепатит», а по предложению Корса названа «токсическая дистрофия печени». Абсцесс печени (гнойно-некротический гепатит), дистрофии (жировая, амилоидная и др.), являются патоморфологическими формами

болезней печени. К ним можно отнести и все воспаления желчевыводящих путей, поскольку клинически у животных они не диагностируются.

Известно, что с развитием промышленного ведения животноводства, свиноводства, овцеводства, птицеводства и др. большее распространение имеют и болезни незаразной этиологии. По результатам ветеринарно-санитарной экспертизы и патологоанатомических исследований, проводимых в последние два десятилетия, только 2-7 % от числа заболевших свиней приходится на болезни инфекционной этиологии. Среди незаразной природы ведущими являются болезни органов пищеварения - 40 % и более от всей патологии неинфекционного происхождения.

Известно, что патология печени среди заболеваний органов пищеварения занимает одно из ведущих мест. Это связано, видимо, и с тем, что в производственных условиях часто наблюдаются сочетанные поражения печени, желудка и кишечника ($r=0,8$). Высокая смертность при этих болезнях, затраты на проведение лечебно-профилактических мероприятий и снижение продуктивности животных наносят сельскому хозяйству большой экономический ущерб.

В последние годы, отмечается тенденция к увеличению токсических поражений печени. Это может быть связано с ухудшением экологии и нарушением технологии выращивания. Так, за последние годы при диспансерном обследовании, ветеринарно-санитарной экспертизе и патологоанатомическом вскрытии животных патология печени выявлена в 90 - 100 % случаев. Из них у 70-80% отмечаются поражения печени диффузного характера в том числе и токсические.

Болезни печени у животных имеют широкое распространение. Могут носить массовый характер. Наиболее часто регистрируются гепатит, гепатодистрофия и т.д. (рис). Например, у крупного рогатого скота при концентратном типе откорма - порядка у 85 % поголовья, у высокопродуктивных коров - до 60 - 70 %, у основных свиноматок до тех же 70 %.

2. Значение печени в обмене веществ. У животных она лежит в полости общего центра тяжести, непосредственно позади диафрагмы, и поэтому затруднена для исследований общими клиническими методами.

Масса ее колеблется в пределах от 1,0 до 1,5 % от массы тела и до 2,5 % у свиней. Так, у взрослого крупного рогатого скота может достигать 9 кг, а у лошадей 5.

По химическому составу печень здоровых животных состоит примерно на 70 - 75 % из воды, на 12 - 25 % - из белков, на 2 - 6 % из липидов и 2 - 8 % приходится на гликоген (биологический полимер глюкозы).

В печени протекают **самые интенсивные обменные процессы в организме**. Иначе говоря, печень это «биохимическая лаборатория» организма.

Объясняется это анатомическим ее расположением и особенностью кровоснабжения. Так печень находится в центре брюшной полости, и через нее проходит вся кровь, оттекающая от желудка, кишечника и селезенки. Из всего кровоснабжения на долю этой венозной крови поступающей по воротной вене приходится 70 %, остальная кровь артериальная (которая питает печень кислородом) поступает по печеночной артерии.

Печень принимает и распределяет почти все вещества, проникающие в организм из пищеварительного тракта. Вся кровь, в которую всосались продукты переваривания пищи и другие вещества из кишечника, поступают в печень по широкой воротной вене. Эта вена разветвляется на узкие канальцы, по которым кровь медленно течет, омывая печеночные клетки. Поступающие с кровью вещества переходят в ткань, подвергаются превращениям, некоторые накапливаются и затем в неизменном виде или в виде метаболитов поступают в общий кровоток.

Многообразие функций печени связано с особенностями кровообращения (наличия капиллярной сети воротной вены, через которую протекает кровь от кишечника, и

капиллярной сети печеночной артерии, доставляющей в орган с кровью кислород и питательные вещества), а также особенностями структуры печеночной дольки.

Функциональной единице печеночной ткани является - печеночная долька. Гепатоциты находятся в пластинках, образуемых двумя слоями клеток (на их долю приходится до 80% всех клеток). Между слоями гепатоцитов заключены желчные канальцы. Наружные поверхности пластинок покрыты эндотелиальными клетками, образующие стенки синусоидов на долю эндотелиальных клеток приходится около 15% от всех клеток печени, более трети из них представлена клетками Купфера).

Таким образом, гепатоциты контактируют с синусоидами и желчными канальцами. Синусоиды - это видоизмененные капилляры, по которым циркулирует смешанная кровь: венозная из воротной вены, артериальная из печеночной артерии. Из синусоидов кровь поступает в ветви печеночной вены и далее в нижнюю полую.

Веточки воротной вены, печеночной артерии и желчного протока, а также лимфатические сосуды пронизывают ткань печени, отделяя дольки друг от друга.

Венозная кровь со всосавшимися в кишечнике веществами и артериальная, насыщенная кислородом из печеночной артерии, поступает в узкие синусоиды и омывает клетки печени. Клетки извлекают часть веществ, подвергают их метаболическим превращениям и выделяют продукты превращений в синусоиды или желчные канальцы. Желчные канальца собираются в мелкие желчные протоки и затем в главный желчный проток. Кровь синусоидов собирается в центральную вену дольки, далее в сублобулярную и, наконец, в печеночные вены.

3. Функции печени и ее роль в метаболизме .

Функции печени в организме:

1. Метаболическая функция. В каждой клетке возможно протекание более тысячи различных химических реакций. Поэтому печень по отношению к этой функции уникальный орган. Она осуществляет регуляцию метаболических процессов и поддержанию постоянства в крови метаболитов углеводного, липидного, белкового, минерального и витаминного обменов. Т.е. она участвует во всех видах обмена.

1.1. В белковом обмене:

- в печени наиболее активно идут реакции аминирования и переаминирования аминокислот, посредством чего она регулирует аминокислотный состав сыворотки;
- происходит синтез мочевины из аммиака.

1.2. В углеводном обмене:

- обеспечивает синтез и распад гликогена, т.е. регулирует постоянство концентрации глюкозы в организме;
- интенсивно протекает глюконеогенез (синтез глюкозы из метаболитов других обменов).

1.3. В обмене липидов:

- синтезируются жирные кислоты, холестерин, желчные кислоты, аполипопротеины и формируют липопротеиды (ЛП) очень низкой и высокой плотности, в гепатоцитах осуществляются процессы кетогенеза.

1.4. В обмене витаминов:

- депонирование жирорастворимых витаминов, гидроксилирование витамина D и фосфорилирование водорастворимых.

2. Синтетическая функция. Печень интенсивно синтезирует ряд химических соединений на "экспорт": так здесь синтезируется более 90 % всех белков крови.

3. Антитоксическая и обезвреживающая функции. Заключаются в том, что печень обладает способностью к извлечению из крови химических веществ (**поглотительная функция**), благодаря чему токсические метаболиты, "отслужившие" регуляторные соединения (гормоны) и ксенобиотики (эндогенно поступившие вещества, не имеющие метаболического значения) инактивируются здесь и подготавливаются для экскреции.

4.Экскреторная функция. Заключается в выделении во внешнюю среду вместе с желчью некоторые вещества (например, билирубин и других некоторых продуктов метаболизма).

5.Депонирующая функция. В печени депонируются ионы железа, меди, гликоген, витамины А, В₁₂, и др.

6.Пищеварительная функция. Обеспечивается образованием посредством и выделения желчи в ЖКТ.

4. Биохимические показатели функции печени и их клиническое значение.

. Изменения в составе крови при заболеваниях многочисленны и разнообразны, обусловлены многообразием выполняемых печенью функций. Классифицировать тесты, оценивающие эти изменения целесообразно по выполняемым печенью функциям.

> пробы, направленные на изучение обмена пигментов, белков, углеводов, липидов, витаминов и минералов;

> пробы, изучающие детоксикационную функцию;

> пробы анализа поглотительно-экскреторной функции.

Биохимические изменения в печени при патологии зависят от характера процесса, вида и интенсивности действия повреждающего фактора.

Основную роль в развитии гепатита и гепатодистрофии по продолжению играют возбудители инфекций и токсические факторы (эндогенные и экзогенные). Воспалительные процессы протекают по классическому типу в три стадии: альтерация, экссудация и пролиферация. На первом этапе на действие повреждающего агента реагируют гепатоциты. Процессы начинаются с изменения метаболизма клетки (нарушения в гепатоците процессов окислительного фосфорилирования, снижения концентрации АТФ и НАД, снижением активности ферментов цикла лимонной кислоты, окислительного дезаминирования и переаминирования и др.). Далее активируются процессы ПОЛ, меняется проницаемость клеточных мембран и процесс может протекать по типу аутолиза клетки за счет собственных лизосомальных ферментов, приводящий к выходу в межклеточное пространство содержимого клетки и медиаторов воспаления. Последние обуславливают вовлечение в процесс новых клеток и сосудистую реакцию с инфильтрацией печеночной ткани. В таких условиях резко меняется питание ткани, и создаются предпосылки дистрофических процессов (белковых и жировых).

1. 8 Лекция №8 (2 часа).

Тема : Нарушение функции печени.

1.8.1 Вопросы лекции:

1. Нарушение углеводной функции печени.
2. Нарушение белковой функции печени.
3. Нарушение ферментативной функции печени.
4. Нарушение обмена желчных пигментов.

1.8.2 Краткое содержание вопросов: *(тезисно изложить основное содержание рассматриваемых вопросов)*

1. Нарушение углеводной функции печени.

При заболеваниях печени (цирроз, гепатит, рак печени) нарушение функции печени может быть обусловлено не только недостаточным кровоснабжением (гипоксией) и структурной деформацией органа, но и блокадой купферовских клеток образующимися в самой печени продуктами распада клеток и метаболитами. При этом уменьшается способность печеночных макрофагов элиминировать путем фагоцитоза из крови жировые капли, эритроциты, микроорганизмы, их токсины, особенно поступающие с портальным кровотоком из кишечника, что приводит к возникновению токсемии с разнообразными проявлениями (лейкоцитоз, лихорадка, гемолиз эритроцитов, почечная недостаточность,

эрозии кишечника и др.). Наличие портокавальных анастомозов усугубляет течение токсемического синдрома, который иногда протекает как токсический шок в связи с поступлением токсических веществ из кишечника в системный кровоток на фоне выключенной фагоцитарной функции печени. Кроме того, при ослаблении фагоцитоза как неспецифической защитной реакции снижается устойчивость организма к инфекционным факторам. В то же время повышается частота развития аллергических (аутоаллергических) процессов как в самой печени, так и в других органах и системах, что обусловлено нарушением захвата из крови и разрушения макрофагами печени антигенов и иммунных комплексов (в норме в звездчатых ретикулоэндотелиоцитах расщепляется 95% веществ с антигенными свойствами). Понижение антитоксической функции печени связано с нарушением ее метаболической функции - синтеза мочевины (обезвреживание токсического аммиака), окисления (ароматических углеводов), восстановления (нитробензола в парааминофенол), ацетилирования (сульфаниламидных препаратов), гидролиза (алкалоидов, сердечных гликозидов), конъюгации (образования парных соединений с глюкуроновой кислотой, гликоколом, цистеином, таурином - для связывания непрямого билирубина, скатола, фенола, индола и др.). Кроме того, при нарушении функции печени нарушается еще один путь детоксикации - превращение водонерастворимых (аполярных) веществ в растворимые (полярные) соединения, которые могут быть выведены из организма с желчью и мочой. К ослаблению антитоксической функции печени приводит повреждение гепатоцитов как локусов обезвреживания, уменьшение активности ферментов, катализирующих реакции детоксикации, и дефицит энергии. Нарушение антитоксической функции печени при ее поражении может обусловить повышение чувствительности организма к различным лекарственным средствам - хинину, морфину, барбитуратам, наперстянке и др. Это связано с тем, что при уменьшении их расщепления в печени токсичность этих веществ для организма увеличивается, вызывая отравление. Кроме того, в процессе метаболических превращений токсических соединений в гепатоцитах могут образоваться еще более токсические вещества (синтез гепатотоксических веществ - метаболитов ряда медикаментов, например изониазида; образование канцерогенных веществ). Нарушение экскреторной функции печени при затруднении выделения желчи также может привести к накоплению токсических веществ в организме.

2. Нарушение белковой функции печени.

Нарушение белкового обмена при нарушениях функции печени проявляется в изменении:

- 1) Синтеза белков (в том числе белков плазмы крови);
- 2) Расщепления белков до аминокислот, пуриновых и пиримидиновых оснований;
- 3) Дезаминирования, трансаминирования и декарбоксилирования аминокислот;
- 4) Образования мочевины, мочевой кислоты, аммиака, глутамина (транспортной формы аммиака в крови), креатина -- продуктов конечных этапов белкового обмена.

Выделяют следующие механизмы нарушения белкового обмена в печени:

- повреждение при патологических процессах (гепатит, цирроз, опухоль, ишемия, гепатоз) печеночных клеток как структурного субстрата анаболизма и катаболизма белка;
- нарушение генетической регуляции синтеза белка при повреждении структурных генов, рибосом цитоплазмы и гранулярного эндоплазматического ретикулума гепатоцитов, дефиците РНК, в результате чего изменяется количество продуцируемых белков, образуются аномальные по своей структуре белки (например, при амилоидозе печени, наследственной афибриногенемии);
- дефицит аминокислот (при белковом голодании, нарушении переваривания и всасывания белков в кишечнике);
- дефицит энергии (при гипо- и авитаминозах, особенно пиридоксина, рибофлавина и др., гипоксии);

· нарушение нейрогуморальной регуляции белкового обмена (например, при инсулиновой недостаточности, изменении секреции соматотропина аденогипофизом).

Следствием нарушения белкового обмена в печени являются:

1. гипопроотеинемия -- уменьшение образования сывороточных альбуминов, α - и β -глобулинов (в норме в гепатоцитах синтезируется весь альбумин, 75 - 90 % β -глобулинов и 50 % α -глобулинов), что обуславливает снижение онкотического давления крови (гипоонкия) и развитие отека («печеночный» отек);

2. геморрагический синдром при уменьшении в печени синтеза протромбина, фибриногена, проконвертина, проакцелерина и нарушении свертывания крови;

3. гипер- γ -глобулинемия - повышенный синтез γ -глобулина в купферовских клетках печени (в норме в звездчатых эндотелиоцитах, относящихся к макрофагальной системе, образуется очень мало γ -глобулинов) и плазматических клетках (при плазматической инфильтрации печени), что наблюдается при аллергическом процессе в печени;

4. диспротеинемия - при синтезе в печени качественно измененных γ -глобулинов (парапротеинов - макроглобулинов, криоглобулинов);

5. повышение уровня свободных аминокислот в крови и моче (аминоацидемия, аминоацидурия), изменение качественного аминокислотного состава сыворотки крови при диффузных и особенно некротических поражениях печени, когда нарушается окислительное дезаминирование и трансаминирование аминокислот в печени;

6. увеличение остаточного азота в крови (азота мочевины, аминокислот) и аммиака при нарушении синтеза мочевины (показатель тяжелой печеночной недостаточности (как правило, при поражении 80 % и больше паренхимы печени);

7. повышение содержания в крови некоторых ферментов (γ -глутамил-транспептидазы, аминотрансфераз и других), что связано с разрушением гепатоцитов при гепатите, циррозе, опухолях.

3. Нарушение ферментативной функции печени.

При поступлении питательных веществ в фазе резорбции глюкоза через промежуточное образование ацетил-КоА (ацетил-СоА) конвертируется в жирные кислоты. Печень может также извлекать жирные кислоты из липопротеинов, поступающих из желудочно-кишечного тракта (в виде хиломикронов) и других тканей. Жирные кислоты используются для биосинтеза триглицеридов и фосфолипидов. При связывании жиров с аполипопротеинами образуются липопротеиновые комплексы очень низкой плотности [ЛОНП]. Они попадают в кровь и переносятся в другие ткани, прежде всего в жировую и мышечную ткань.

В фазе пострезорбции, особенно в период поста или голодания, обмен липидов идет в обратном направлении, организм обращается к собственным запасам. В этих условиях жиры поступают из жировой ткани в кровь, переносятся в печень, распадаются в результате β -окисления до ацетил-КоА и, наконец, превращаются в кетоновые тела.

Холестерин поступает в организм из двух источников - с пищей и за счет эндогенного синтеза, причем большая часть холестерина синтезируется в печени. Биосинтез холестерина начинается с ацетил-КоА. Полученный холестерин используется в синтезе желчных кислот, встраивается в клеточные мембраны, депонируется в жировых каплях в составе эфиров жирных кислот. Остальная часть поступает в кровь в составе липопротеиновых комплексов [ЛОНП] и переносится в другие ткани.

Печень способствует обмену холестерина благодаря тому, что служит местом, куда поступают с кровью и где подвергаются расщеплению липопротеиновые комплексы [ЛВП, ЛПП, ЛНН], содержащие холестерин и его эфиры с жирными кислотами.

Нарушение обмена липидов при нарушениях функции печени проявляется:

1. изменением расщепления и всасывания липидов пищи в кишечнике (в связи с дефицитом желчных кислот при патологии желчеобразования и желчевыделения);

2. нарушением синтеза и окисления триглицеридов, фосфолипидов, липопротеидов, холестерина;
3. увеличением образования кетоновых тел.

Расстройство обмена липидов в печени приводит к развитию липидового гепатоза (т.н. липидовой дистрофии, липидовой инфильтрации печени), при котором в гепатоцитах накапливается жир и происходит диффузное или очаговое ожирение печени.

Причинами возникновения липидового гепатоза являются алиментарные факторы (голодание, особенно белковое, недостаток в пище липотропных веществ - холина, метионина, избыток углеводов и липидов), токсические вещества (алкоголь, гепатотропные яды -- инсектициды, тетрациклин в больших дозах), эндокринные и метаболические нарушения (сахарный диабет, ожирение), гипоксия (сердечная, дыхательная недостаточность). В патогенезе липидовой дистрофии печени можно выделить следующие основные механизмы возникновения:

1. увеличение поступления жира в печень;
2. уменьшение синтеза фосфолипидов и повышение образования триглицеридов из жирных кислот;
3. снижение окисления жирных кислот и липолиза;
4. нарушение выхода жира из печени как следствие пониженного образования липопротеидов очень низкой плотности (ЛПОНП) (основной транспортной формы удаления триглицеридов из этого органа) или дефицита липокаина в поджелудочной железе.

Патологические процессы в печени (гепатит, цирроз) нередко сопровождаются уменьшением образования эстерифицированного холестерина или снижением общего его количества в крови, нарушением синтеза и окисления холестерина, его превращения в желчные кислоты и выведения с желчью.

4. Нарушение обмена желчных пигментов.

Печеночные клетки секретируют желчь, в состав которой входят желчные кислоты, желчные пигменты, холестерин, фосфолипиды, жирные кислоты, муцин, вода и другие вещества.

Печень участвует в образовании, метаболизме и экскреции желчных пигментов. В звездчатых эндотелиоцитах печени, в макрофагах костного мозга, селезенки из гемоглобина разрушенных эритроцитов образуется вердоглобин, из него после отщепления атома железа и глобина - биливердин, который превращается, восстанавливаясь, в билирубин. В крови билирубин соединяется преимущественно с альбумином, и этот комплекс называется свободным, неконъюгированным, непрямой билирубином (непрямой, так как окраску с диазореактивом Эрлиха дает только после осаждения белка). Он нерастворим в воде, в норме составляет 75 % от общего билирубина крови (6,8 - 20,5 мкмоль/л по методу Ендрашика и соавт.), нетоксичен, не проникает в мозг и, следовательно, не может вызвать билирубиновую энцефалопатию. Свободный билирубин, не включенный в билирубин-альбуминовый комплекс, легко проходит через гематоэнцефалический барьер и, взаимодействуя с фосфолипидами мембран нейронов, поступает в клетки центральной нервной системы и может их повредить. Однако в норме концентрация свободного билирубина в крови настолько мала, а способность альбумина его связывать столь высока, что он не оказывает токсического действия.

У своего васкулярного полюса гепатоциты осуществляют захват из крови неконъюгированного билирубина, от которого в цитоплазматической мембране отделяется альбумин. В переносе билирубина через мембрану клетки, а затем из цитоплазмы в мембрану эндоплазматического ретикулума участвуют белки Y (лигандин) и Z (глутатионтрансферазы). В мембране эндоплазматического ретикулума гепатоцита билирубин конъюгируется с уридиндифосфоглюкуроновой кислотой (УДФГК) под влиянием фермента УДФ-глюкуронилтрансферазы и образуется моноглюкуронид

билирубина (МГБ), который у билиарного полюса гепатоцита переходит через гепатоканаликулярную мембрану в желчь по градиенту концентрации, создаваемому желчными кислотами (энергозависимый процесс). В желчных канальцах из двух молекул МГБ образуется диглюкуронид билирубина (ДГБ) при участии билирубин-глюкуронидтрансферазы. Таким образом, в желчи содержится конъюгированный билирубин (в основном ДГБ), растворимый в воде, так называемый связанный, или прямой, билирубин (дает прямую реакцию с диазореактивом).

Во внепеченочных ходах, желчном пузыре и тонком кишечнике (главным образом) от ДГБ под действием ферментов кишечной микрофлоры отщепляется глюкуроновая кислота (деконъюгация), свободный билирубин проникает в кровь, а оставшийся ДГБ восстанавливается до уробилиногена (мезобилиногена), часть которого всасывается через кишечную стенку в кровь и из воротной вены поступает в печень (печеночно-кишечный кругооборот), где разрушается до пиррольных соединений. В связи с тем что уробилиноген в норме в общий кровоток не попадает, он отсутствует и в моче. Большая часть уробилиногена в толстом кишечнике восстанавливается до стеркобилиногена, выделяемого с калом в виде окисленной формы - стеркобилина. Незначительное количество стеркобилиногена, всосавшись в кровь в нижнем отделе толстого кишечника, через нижние геморроидальные вены поступает в систему нижней поллой вены и выводится с мочой, в которой в норме содержатся следы стеркобилиногена. Однако в клинической практике его принято называть уробилиногеном или же уробилиновыми телами (общий термин для выделяемых с мочой продуктов обмена билирубина).

Нарушение желчеобразования проявляется в увеличении или уменьшении секреции желчи, как правило, с одновременным изменением ее состава.

Причинами увеличения или уменьшения желчеобразования могут быть следующие:

1) изменение нейрогуморальной регуляции (например, увеличение секреции желчи при усилении тонуса блуждающего нерва или повышении инкреции секретина и гастрина);

2) алиментарные факторы, некоторые лекарственные растения и препараты (жиры, яичный желток, настой кукурузных рылец, сорбит, дефицит белка);

3) экзогенные и эндогенные факторы, нарушающие энергетический обмен в организме, в том числе и в печени, не пораженной патологическим процессом (гипоксия, перегревание, гипотермия, отравление цианидами);

4) поражение печени и желчевыводящих путей (гепатит, гепатоз, холецистит), приводящее к нарушению секреторной функции гепатоцитов вследствие их дистрофии и деструкции и изменению реабсорбции компонентов желчи;

5) снижение активности кишечной микрофлоры, уменьшающее печеночно-кишечный кругооборот компонентов желчи и, следовательно, их концентрацию в желчи (при патологических процессах в тонкой кишке, под влиянием антибиотиков);

6) нарушение образования и обмена билирубина и желчных кислот и изменение их содержания в желчи.

Часто нарушение функции печени возникает при травматических повреждениях ее, инфекционных заболеваниях (альвеококкоз, эхинококкоз), абсцессах печени, непаразитарных кистах печени.

1. 9 Лекция №9 (2 часа).

Тема : Исследование мочи.

1.9.1 Вопросы лекции:

1. Клиническая биохимия исследования мочи.
2. Интерпретация результатов исследований мочи у различных видов животных при различных заболеваниях.

1.9.2 Краткое содержание вопросов: (тезисно изложить основное содержание рассматриваемых вопросов)

1. Клиническая биохимия исследования мочи.

. Моча представляет собой экскрет, продуцируемый почками. Вполне естественно, что различного рода патологические процессы в почках могут отражаться на свойствах мочи. При прохождении мочи через мочевыводящие пути к ней могут примешиваться различные патологические элементы, образующиеся при их заболеваниях. Ввиду этого исследование мочи является одним из важнейших методов, применяемых для диагностики заболеваний почек и мочевыводящих органов. Однако диагностическое значение исследования мочи не ограничивается применением его при этих заболеваниях. При различных заболеваниях других органов и систем организма в кровь могут поступать патологические продукты обмена, которые, выделяясь из крови почками, попадают в мочу; поэтому, естественно, химическое исследование мочи может иметь важное значение и при диагностике этих заболеваний. Почки также выделяют из крови с мочой различные ядовитые вещества, попавшие в организм извне, и многие лекарственные вещества. В связи с этим исследование мочи играет также большую роль при распознавании интоксикаций. Токсины, циркулирующие в крови при различных инфекционных заболеваниях, повреждая почки, могут вызвать изменения свойств мочи. Расстройства кровообращения в почках, связанные с заболеваниями сердечно-сосудистой системы, также отражаются на количестве продуцируемой мочи и на ее составе. Наконец, нарушение функции некоторых желез внутренней секреции, а также нервных аппаратов, регулирующих мочеотделение, способны вызвать количественные и качественные изменения мочи.

Правила взятия мочи у животного исследование мочи животного

Существует три обычных метода сбора мочи, а именно, прокол мочевого пузыря, катетеризация и сбор мочи, выделяющейся из организма естественным путем. Выбор метода оказывает влияние на результаты анализа. Последние два из вышеперечисленных методов в большей степени подвержены риску бактериального заражения по сравнению с перфорацией мочевого пузыря. Выделяющаяся из организма естественным путем моча также отражает изменения, произошедшие как в почках, так и в нижних отделах мочеполовых путей.

Методика подготовки животного зависит от метода отбора проб мочи. Уретральная катетеризация связана с наибольшим риском бактериального заражения. Для проведения катетеризации требуется асептическая методика, включая использование стерильного катетера. Для снижения возможности бактериального заражения некоторые практикующие врачи после сбора мочи проводят инфузию антибиотических средств в мочевой пузырь. Отсутствие необходимой квалификации для проведения катетеризации маленьких собак может быть причиной, по которой многие практикующие врачи не проводят исследование мочи.

2. Интерпретация результатов исследований мочи у различных видов животных при различных заболеваниях.

Исследование мочи. При анализе мочи определяют ее физические и химические свойства, а также проводят микроскопическое исследование осадков. У здоровых животных таблица.

Количество и свойства мочи у здоровых животных

Животные	Суточное количество мочи, л	Свойства мочи		
		удельная плотность	цвет	реакция
Крупный	6-12 (25)	1,025-1,050	От светло-желтого	Щелочная

рогатый скот			до светло-коричневого	
Овцы и козы	0,5-1 (2)	1,015-1,065	Светло-желтый	Щелочная
Верблюды	8-15	1,030-1,060	От светло-желтого до светло-бурого	Щелочная
Северные олени	2-4	1,020-1,045	Светло-желтый	Щелочная
Лошади	3-6 (10)	1,025-1,055	От светло-желтого до светло-бурого	Щелочная
Свиньи	2-4 (6)	1,018-1,022	Светло-желтый	Нейтральная или кислая
Собаки	Крупные 0,5-2 Средние 0,4-1 Мелкие 0,02-0,2	1,020-1,050	От светло-желтого до янтарно-желтого	Кислая
Кошки	0,1-0,2	1,020-1,040	Светло-желтый	Нейтральная или кислая
Кролики	0,18-0,44	1,010-1,040	Светло-желтый	Нейтральная или кислая

Примечание. В скобках приведены максимальные количества мочи.

1. 10 Лекция №10 (2 часа).

Тема : Клиническая биохимия при эндокринных заболеваниях.

1.10.1 Вопросы лекции:

1. Клинические методы исследования при эндокринных заболеваниях.
2. Диагностика эндокринных болезней.

1.10.2 Краткое содержание вопросов: *(тезисно изложить основное содержание рассматриваемых вопросов)*

1. Клинические методы исследования при эндокринных заболеваниях.

Гормоны — производные тирозина катехоламины: норадреналин, адреналин тиреоидные гормоны: тироксин, трийодтиронин. Стероидные гормоны: тестостерон, эстрогены, прогестерон, кортикостероиды, витамин D3.

Пептидные и белковые гормоны. Пептиды: гормоны гипоталамуса, ангиотензин, гастрин, секретин, глюкагон, кальцитонин, инсулин, паратгормон. Белковые гормоны: соматотропный гормон, лютеинизирующий гормон, фолликулостимулирующий гормон, тиреотропный гормон

1.2.2 Функциональная классификация гормонов

1. Эффекторныe гормоны — гормоны, которые оказывают влияние непосредственно на орган-мишень.

Тропные гормоны — гормоны, основной функцией которых является регуляция синтеза и выделения эффекторных гормонов. Выделяются аденогипофизом.

Рилизинг-гормоны — гормоны, регулирующие синтез и выделение гормонов аденогипофиза, преимущественно тропных. Выделяются нервными клетками гипоталамуса.

Несмотря на то, что гормоны имеют разное химическое строение, для них характерны некоторые общие биологические свойства.

1.2.3 Общие свойства гормонов

Высокая биологическая активность: гормоны оказывают свое физиологическое действие в чрезвычайно малых дозах.

Дистантный характер действия: клетки-мишени располагаются обычно далеко от места образования гормона.

Небольшой размер молекулы, что обуславливает легкость прохождения гормона через мембрану клеток-мишеней.

Отсутствие видовой специфичности большинства гормонов.

Строгая специфичность (тропность) физиологического действия.

Многие гормоны не имеют видовой специфичности.

Генерализованность действия.

Пролонгированность (длительность физиологического действия)

(А.П. Елисеев, Н.А. Сафонов, В.И. Бойко, 1991)

1.2.4 Типы физиологического действия гормонов на организм

Кинетическое, или пусковое, вызывающее определенную деятельность исполнительных органов;

метаболическое (изменения обмена веществ);

морфогенетическое (дифференциация тканей и органов, действие на рост, стимуляция формообразовательного процесса);

корректирующее (изменение интенсивности функций органов и тканей).

1.2.5 Формы циркуляции гормонов в крови:

1) в свободном состоянии;

2) в комплексе со специфическими белками плазмы крови;

3) в форме неспецифического комплекса с плазменными белками;

4) в адсорбированном состоянии на форменных элементах крови.

Связанные формы гормонов являются физиологическим резервом, из которого гормоны переходят в активную свободную форму по мере необходимости.

80% связанных форм гормонов приходится на комплекс со специфическими белками. Но биологическая активность определяется содержанием свободных форм гормонов.

Обязательное условие для проявления физиологических эффектов гормона – его взаимодействие с рецепторами, располагающимися на мембранах клеток-мишеней, либо внутри этих клеток. Гормональные рецепторы представляют собой особые белки клетки, для которых характерны: высокое сродство к гормону, высокая избирательность, ограниченная связывающая емкость, специфичность локализации рецепторов в тканях.

1.2.6 Механизмы действия гормонов на уровне клетки

Реализация эффекта с наружной поверхности клеточной мембран;

Реализация эффекта после проникновения гормона внутрь клетки.

По I механизму действуют пептидные, белковые гормоны, производные тирозина — катехоламины. Для этих гормонов характерна относительная быстрота возникновения ответной реакции, что обусловлено активацией предшествующих уже синтезированных ферментов и других белков.

По II механизму действуют стероидные гормоны и производные тирозина — гормоны щитовидной железы. Для их действия характерна глубокая и длительная перестройка клеточного метаболизма (Эккерт Р., Рэнделл Д., Огастин Дж., 1988).

1.2.7 Виды взаимодействия гормонов

Синергизм — однонаправленное действие двух или нескольких гормонов. Например, адреналин и глюкагон активируют распад гликогена печени до глюкозы и вызывают увеличение уровня сахара в крови.

Антагонизм — взаимоподавляющее действие гормонов (например, инсулин и адреналин оказывают противоположные действия на уровень глюкозы в крови).

Пермиссивное действие гормонов заключается в том, что гормон, сам не вызывая физиологического эффекта, создает условия для ответной реакции клетки или органа на действие другого гормона (Агаджанян Н. А., 2001)

Эндокринные заболевания характеризуются болезнями организма человека, причиной которых являются дисфункции эндокринных желез. Эти дисфункции выражаются в гиперактивности этих желез или, наоборот, в недостаточной интенсивности их работы (гипофункциональности).

Можно по-другому охарактеризовать эндокринные заболевания. Это такие болезни, которые возникают в результате нарушения гормонального фона человека. За функциональность организма отвечают биологически активные вещества - гормоны. Именно они "отвечают" за состояние организма, его рост, развитие, за обмен веществ организма, и т.д. И когда происходит нарушение работы эндокринной системы, происходит нарушение гормонального фона, что, конечно же, сказывается на нормальной функциональности нашего организма и это проявляется в виде различных эндокринных заболеваний.

Эндокринные заболевания: классификация

На данный момент насчитывается более 50-ти различных заболеваний эндокринной системы, и все их тут перечислять мы не будем (они описаны на других страницах этого сайта), но классификацию этих патологий мы рассмотрим.

1. Заболевания гипоталамо-гипофизарной системы. Самыми "яркими представителями" данной группы патологий являются: акромегалия, болезнь Иценко-Кушинга, несахарный диабет...

2. Заболевания щитовидной железы. Это самая распространенная группа заболеваний эндокринной системы. Это, в первую очередь, гипотериоз, гипертериоз, аутоиммунный тиреоидит, рак щитовидной железы, диффузный токсический зоб...

3. Заболевания островкового аппарата поджелудочной железы. Одно из самых известных и распространенных заболеваний в мире - сахарный диабет, из этой категории патологий.

4. Заболевания надпочечников. Это и опухоли надпочечников, и их недостаточность, а так же первичный гиперальдостеронизм

5. Болезни женских половых желез. Тоже достаточно распространенный вид эндокринных заболеваний, это, в первую очередь: предменструальный синдром (ПМС), синдром Штейна-Левинтала, разного рода нарушения менструальной функции.

Заболевания эндокринной системы: причины

Любое заболевание эндокринной системы проявляется в результате следующих причин:

1. Дефицит в организме какого-либо гормона.
2. Избыток в организме того или иного гормона.
3. Невосприимчивость органа или системы к воздействию какого-либо гормона.
4. Синтез "дефектных" гормонов.
5. Нарушения эндокринных коммуникационных "линий" и метаболизма.
6. Одновременная дисфункция нескольких гормональных систем. Теперь рассмотрим все эти причины заболеваний эндокринной системы подробнее.

Причины недостатка того или иного гормона могут быть следующими:

- врожденный фактор, который характеризуется недоразвитием этих желез (гипотериоз врожденный);
- инфекционные заболевания желез;
- различные воспалительные процессы (панкреатит, сахарный диабет);
- дефицит различных биоактивных соединений и полезных веществ, которые необходимы для синтеза тех или иных гормонов (к примеру, гипотериоз возникает вследствие нехватки йода);
- аутоиммунные процессы, происходящие в организме (аутоиммунный тиреоидит);
- токсикоз желез внутренней секреции и их облучение.

Причинами избыточной концентрации гормонов в организме бывают:

- чрезмерная стимуляция функциональности эндокринных желез;
- производство гормонов из его предшественников - "полуфабрикатов", которые присутствуют в крови, периферическими тканями (к примеру, при заболеваниях печени, избыток андростендиона, поступая в жировую ткань, синтезируется в эстроген).

Невосприимчивость органов к гормонам, как правило, имеет наследственные причины, с которыми наши ученые еще до конца не разобрались. Так же *заболевания эндокринной системы* по этой причине могут возникнуть вследствие каких-либо нарушений гормональных рецепторов из-за чего тот или иной гормон не может попасть в нужные клетки или ткани и выполнить там свои функции.

Синтез "дефектных" гормонов встречается довольно редко и причиной этого бывает мутация какого-нибудь одного гена.

Наличие различных патологий печени чаще всего вызывают эндокринные заболевания человека, вызванные нарушением метаболизма и "транспортировки" гормонов, но в то же время такой причиной может стать и беременность.

При аутоиммунных процессах, иммунная система воспринимает ткани желез внутренней секреции за чужеродные и начинает их атаковать, что нарушает их нормальную функциональность и вызывает эндокринные заболевания.

В последнее время ученые все чаще приходят к одному выводу: практически все эндокринные заболевания человека начинаются из-за сбоев в функциональности его иммунной системы, которая контролирует все клетки и органы человека.

Эндокринные заболевания: симптомы

Невозможно сказать какие органы не могут пострадать вследствие заболеваний эндокринной системы и поэтому симптомы этих патологий могут просто поражать воображение своим разнообразием:

- ожирение или, наоборот, сильное похудение;
- аритмия сердца;
- лихорадка и ощущение сильного жара;
- повышенное артериальное давление и сильные головные боли на этом фоне;
- повышенная потливость;
- поносы;
- возбудимость сверх нормы;
- сильная слабость и сонливость;
- ухудшение работы головного мозга, что выражается в ухудшении памяти и потере концентрации внимания;
- сильная жажда (сахарный диабет);
- повышенное мочеиспускание (несахарный диабет)...

Конечно же, симптомы эндокринных заболеваний зависят от их вида и природы и это необходимо хорошо знать, чтобы поставить своевременный и правильный диагноз.

2. Диагностика эндокринных болезней.

. Очень важно врачу, при диагностике, выявить все перенесенные патологии, которые могут быть причиной эндокринного заболевания. К примеру, туберкулез вполне может вызывать хроническую надпочечную недостаточность, а пневмония или синусит могут вызвать воспаление щитовидки.

Так же врачу следует учитывать наследственность многих заболеваний щитовидной железы, таких, как: аутоиммунный тиреоидит, сахарный и несахарный диабет, ожирение, диффузный токсический зоб...

Обычная пальпация является достаточно эффективным способом диагностики некоторых эндокринных заболеваний. К примеру, щитовидная железа, которая находится в норме, обычно не пальпируется, при простукивании (перкуссии) хорошо выявляется загрудинный зоб, а при прослушивании (аускультации) - диффузный токсический зоб.

Кроме всего прочего, для диагностики эндокринных заболеваний широко используются различные инструментальные и лабораторные методы:

- радиоиммунологический метод (с помощью радиоактивного материала определяют количество того или иного гормона);
- рентгенологические исследования;
- компьютерная и магнитно-резонансная томография;
- ультразвуковые исследования;
- анализ крови на сахар...

1. 11 Лекция №11 (2 часа).

Тема : Клиническая биохимия в диагностике болезней мелких домашних животных.

1.11.1 Вопросы лекции:

1. Изучение белкового обмена.
2. Изучение активности ферментов у домашних животных.
3. Азотистый обмен у различных видов домашних животных.

1.11.2 Краткое содержание вопросов: *(тезисно изложить основное содержание рассматриваемых вопросов)*

1. Изучение белкового обмена.

Физиологическая роль белков плазмы крови многогранна. Можно выделить следующие основные функции белков:

1. Поддержание онкотического давления и тем самым сохранение объема циркулирующей крови
2. Белки принимают участие в свертывании крови. Ряд белков, в том числе фибриноген, являются компонентами свертывающей системы крови.
3. Поддержание постоянства pH крови, так как белки плазмы составляют мощную буферную систему, обладая амфотерными свойствами.
4. Транспортная функция. Белки плазмы крови соединяются с целым рядом нерастворимых в воде веществ (липиды, билирубин, жирные кислоты, стероидные гормоны, жирорастворимые витамины) и переносят их в ткани и органы.
5. Белки плазмы крови играют важную роль в иммунных реакциях организма. Сывороточные иммуноглобулины входят в состав фракции глобулинов сыворотки крови.
6. Поддержание уровней катионов в крови путем образования с ними недиализируемых соединений. Например, 40-50% кальция, значительная часть железа, магния, меди и других элементов связана с белками сыворотки.
7. Сывороточные белки образуют своеобразный «белковый резерв» организма. При голодании они могут распадаться до аминокислот, которые используются для синтеза белков головного мозга, миокарда и других органов.

ОБЩИЙ БЕЛОК 55-78 г/л

Повышение:

Дегидратация
Гипергаммаглобулинемия
Макроглобулинемия

Понижение:

нефротический синдром
хронические заболевания печени
снижение биосинтеза при тяжелой белковой недостаточности
потери белка при гастроэнтеропатиях

Протеинограмма собак

Альбумины - 45-55%
глобулины - 20-12 %
глобулины - 8 - 10%

глобулины - 15 -17%

Типы протеинограмм:

1.Тип острых воспалительных процессов:

Выраженное уменьшение содержания альбуминов и повышение содержания -глобулинов, возрастание -глобулинов.

Тип 1 характерен для:

1. начальной стадии острого полиартрита
2. плеврита
3. острых инфекционных заболеваний

2.Тип подострого и хронического воспаления:

Уменьшение содержания альбуминов, повышение - и -глобулинов.

Тип 2 характерен для:

1. поздней стадии пневмонии
2. хронического эндокардита
3. цистита
4. пиелита

3.Тип нефротического симптомокомплекса:

Значительное снижение альбуминов, повышение – и- глобулинов, умеренное понижение -глобулинов.

Тип 3 характерен для:

1. липоидного и амилоидного нефроза
2. нефрита
3. нефросклероза
4. кахексии

4.Тип злокачественных новообразований:

Резкое снижение альбуминов при значительном увеличении всех глобулиновых фракций, особенно -глобулинов.

Тип 4 характерен для:

1. метастатических новообразований
2. первичных опухолей различной локализации

5.Тип гепатитов.

Умеренное уменьшение альбуминов, увеличение - глобулинов и резко выраженное увеличение -глобулинов.

Тип 5 характерен для:

1. гепатитов
2. последствий токсического повреждения печени
3. гемолитических процессов
3. некоторых форм полиартритов
4. дерматозов
5. злокачественных новообразований кроветворного и лимфатического аппарата

6.Тип циррозов.

Значительное снижение альбуминов при сильном увеличении глобулинов.

Тип 6 характерен для:

1. цирроза печени
2. некоторых форм хронического полиартрита
3. коллагенозов

7.Тип механической (подпеченочной) желтухи:

Уменьшение альбуминов и умеренное увеличение глобулинов.

Тип 7 характерен для:

1. обтурационной желтухи
2. желтухах, вызванных раком желчевыводящих путей и головки поджелудочной железы.

2. Изучение активности ферментов у домашних животных.

Значение активности ферментов зависит от оборудования, применяемых методов исследования, квалификации персонала. Поэтому, следует помнить, что нормы нарабатываются конкретно на данную лабораторию. Следует выбрать ту лабораторию, которая отвечает Вашим требованиям и работать с ней.

Большинство ферментов представлено в клетках в значительно более высоких концентрациях, чем в сыворотке крови. Нормальный уровень ферментов в сыворотке крови отражает соотношение между биосинтезом и высвобождением ферментов (при обычном обновлении клеток), а также их клиренс из кровотока. Повреждение клетки или индуцирование синтеза ферментов обычно приводит к повышению активности ферментов в сыворотке крови. Следовательно, ферменты можно использовать в качестве маркеров, чтобы обнаружить и локализовать повреждение или пролиферацию клеток.

При изучении активности ферментов следует учитывать, что ряд артефактов может повлиять на полученные данные. Образцы гемолизированной или долго хранившейся крови обычно не пригодны для исследований ферментов. Даже если эритроциты не содержат изучаемый фермент, другие высвобождаемые в процессе гемолиза ферменты могут мешать проведению анализов.

Особо следует подчеркнуть влияние ряда антикоагулянтов на активность ферментов. Так, лактатдегидрогеназа теряет активность при использовании оксалатов, фториды не используют при определении активности альдолазы, а амилазная активность снижается при применении цитрата и оксалата.

АМИЛАЗА.

Этот фермент синтезируется слюнными железами, но основная масса синтезируется поджелудочной железой. Особенностью собак и кошек является отсутствие амилазы в слюне, что объясняет более высокий по сравнению с другими видами животных уровень активности панкреатической амилазы и является особенностью плотоядных животных. По активности амилазы мы судим о состоянии поджелудочной железы.

Норма:

Собаки: 35-65 г/час л ; кошки – 20-65 г/час л

Повышение:

- острый панкреатит
- жировая дистрофия печени
- кишечная непроходимость
- почечная недостаточность

А также после приема:

Холинергических препаратов, кортикостероидов, наркотических средств, диуретиков, антибиотиков и сульфаниламидов.

Снижение:

- хронический панкреатит с развитием ферментативной недостаточности поджелудочной железы
- панкреонекроз

АМИНОТРАНСФЕРАЗЫ.

Аланинаминотрансфераза (АЛТ)

Аспартатаминотрансфераза (АСТ)

Аланинаминотрансфераза большей частью содержится в гепатоцитах и в небольшом количестве присутствует в мышечной ткани. Аспартатаминотрансфераза содержится

главным образом в мышечной ткани и незначительно в гепатоцитах. Активность этих ферментов в крови указывает на разрушение клеток тканей, содержащих их и повышенный выход ферментов в кровь. Эти ферменты относятся к маркерам цитолиза. Их повышение в крови может происходить еще задолго до клинического проявления патологического процесса.

АЛТ- 1,6- 7,6 МЕ/л

АСТ- 1,6-6,7 МЕ/л

Аланинаминотрансфераза (АЛТ).

Повышение:

- некроз клеток печени любой этиологии
- острый и хронический гепатит
- жировая дистрофия печени
- холангит
- токсическое повреждение печени
- опухоли печени
- цирроз

3. Азотистый обмен у различных видов домашних животных.

Повышение в крови остаточного азота может возникнуть в результате нарушения азотовыделительной функции почек, то есть быть следствием почечной недостаточности (ретенционным).

Остаточный азот

20 – 32 мг%

Содержание в крови остаточного азота может увеличиться также при отсутствии нарушений функции почек в результате повышенного образования азотистых шлаков в организме. Такого рода повышение остаточного азота принято называть продукционным.

Повышенное образование азотистых шлаков может наблюдаться при:

- лихорадочных состояниях
- распаде опухолей
- кахексии
- лейкозе
- обширных повреждениях тканей
- кишечной непроходимости

При тяжелых явлениях почечной недостаточности уровень остаточного азота крови может увеличиваться в несколько раз.

Мочевина

10-40 мг% Для перевода в систему СИ:

мг% $\times 0,1665$ = ммоль/л

Содержание мочевины в крови так же, как и содержание остаточного азота, может повышаться вследствие ряда экстраренальных факторов

- при потреблении очень большого количества белкового корма
- различных воспалительных процессах с выраженным катаболизмом белков
- обезвоживании в результате поноса

Продолжительное обнаружение повышенного содержания мочевины в крови должно расцениваться как проявление почечной недостаточности .

Нарастание содержания мочевины в крови до 100-200 мг% , что соответствует 16,65 –33,3 ммоль/л является признаком нарушения функции почек средней тяжести, свыше 200 мг% (33,3 ммоль/л) –тяжелым и свыше 300 мг% (50 ммоль/л) –очень тяжелым нарушением с неблагоприятным прогнозом

Креатинин

собаки- 70-160 мкмоль/л

кошки – 60-160 мкмоль/л

КРЕАТИНИН КРОВИ

Содержание креатинина в крови здоровых животных – величина довольно постоянная и мало зависящая от питания и других экстраренальных факторов

Креатинин принято относить к беспороговым веществам, то есть он полностью выделяется только клубочками и не всасывается канальцами, и не секретируется канальцевым эпителием.

Устойчивое повышение креатинина в крови указывает на нарушение работы почечного фильтра. Удвоение содержания креатинина в крови соответствует снижению скорости клубочковой фильтрации на 50%.

При тяжелом нарушении функции почек содержание креатинина в крови может достигать очень высоких значений – 800-900 мкмоль/л и даже выше, при норме 60-180 мкмоль/л.

6. Изучение минерального обмена.

Кальций

собаки – 2,3-3 ммоль/л

кошки – 2,0-3,5 ммоль/л

мг% $\times 0,249 =$ ммоль/л 2,49-3,48 ммоль/л

Повышение:

- Первичный и вторичный гиперпаратиреоз
- Заживление костных переломов
- Метастазы злокачественных опухолей в кости

2. МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ ПО ВЫПОЛНЕНИЮ ЛАБОРАТОРНЫХ РАБОТ

2.1 Лабораторная работа №1 (2 часа).

Тема: Изменение крови при различных патологических состояниях.

2.1.1 Цель работы: определение основных гематологических показателей у здоровых и больных животных.

2.1.2 Задачи работы:

1. Изучить прибор гематологический
2. Сравнить нормы показателей здоровых животных и больных.

2.1.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

1. Аналитический анализатор PCE90Vet.
2. Стабилизированная кровь животных.

2.1.4 Описание (ход) работы:

Гематологические анализаторы – это лабораторное оборудование, предназначенное для анализа крови. Данное оборудование отличается надежностью, удобством, длительностью срока службы. Для анализа достаточно всего капли крови.

Анализатор значительно экономит время оператора, а также снижает процент ошибки.

Данный аппарат является полностью автоматической системой, отличающийся компактностью.

- 18 анализируемых параметров + 3 гистограммы, дифференциация лейкоцитов на 3 субпопуляции

- Производительность: 60 тестов в час
- Возможность хранения до 20 000 результатов тестов, включая гистограммы
- Автоматическое разведение образца, внесение реагентов, смешивание, прочистка засорений
- Автоматическая очистка пробоотборника
- Автоматический контроль остаточного объема реагентов
- Встроенный термопринтер, возможность подключения внешнего принтера
- Цветной ЖК дисплей высокого разрешения
- Интерфейс на русском языке

Анализируемые параметры: эритроциты, гемоглобин, гематокрит, тромбоциты, средний объем эритроцитов, среднее содержание гемоглобина в эритроците, средняя концентрация гемоглобина в эритроците, анизоцитоз эритроцитов, анизоцитоз тромбоцитов, средний объем тромбоцитов, тромбоциты, гистограммы распределения лейкоцитов, эритроцитов и тромбоцитов.

Рекомендации по работе на гематологическом анализаторе PCE-90vet.

1. Подготовка пробы

- a. Рекомендуется использовать для анализа венозную кровь с антикоагулянтом К₃ЭДТА или К₂ЭДТА. В случае самостоятельного приготовления пробирок помните, что концентрация приготовленного антикоагулянта должна составлять 1.5 - 2.2 мг/мл цельной крови. Оптимально, если кровь будет сразу браться с помощью вакуумных систем взятия.
- b. При использовании капиллярной крови
 - i. надо брать кровь самотеком, исключить надавливание и забор тканевой жидкости
 - ii. очень удобно использовать специальные пробирки с капиллярами (типа Миниколлект) содержащие К₃ЭДТА или К₂ЭДТА. Кровь забирать до меток указанных на пробирках. Только в этом случае будет исключена преаналитическая ошибка измерения.
- c. После взятия крови в пробирку содержимое необходимо перемешать для равномерного растворения ЭДТА и исключения образования осадка. Оптимально для этого использовать механические шейкеры-ротаторы с вертикальным регулируемым вращением (типа Ротатора RS-24 или Ротамикс RM1). Идеальна ситуация, когда кровь до анализа непрерывно плавно перемешивается. Если это невозможно, то перемешивание необходимо перед анализом. Если нет ротатора, то перемешивание вручную должно проводиться при плотно закрытой крышке плавным покачиванием примерно на 180° в вертикальной плоскости. **Недопустимо резкое встряхивание, щелчки по пробирке, так как это может приводить к повреждению клеток.**

2. Выбор режима анализа (образца)

- a. Режим "Цельная кровь". В этом режиме игла прибора забирает из пробирки 13 мкл крови на анализ. Но! в пробирку надо брать не менее 200 мкл крови для того, чтобы исключить ошибки связанные с перемешиванием пробы и иметь возможность сделать повторный анализ, если возникают сомнения в первом результате. Измерение в режиме "Цельная кровь" должно быть выполнено не позднее 8 часов с момента взятия крови. Не рекомендуется использовать консервированную кровь, которая хранилась сутки, так как показатели MCV, PLT и % распределение лейкоцитов могут подвергаться существенным изменениям.
- b. Режим "Капиллярная кровь" (режим предилуции). Рекомендуется использовать, когда нет возможности забрать 200 мкл крови. При выборе этого режима Вы должны взять чистый стаканчик (входят в комплект поставки анализатора), подставить его под пробозаборник, нажать клавишу Дилуент в экране Анализ. В стаканчик будет внесено 1,6 мл изотонического разбавителя, после чего точно вносится 20 мкл крови. Закрыть крышкой и аккуратно перемешать. В дальнейшем анализатор учтет

это разведение и выдаст корректные результаты. Измерение в режиме "Капиллярная кровь" должно быть выполнено не позднее 40 минут с момента взятия крови для анализа 3-диф. по лейкоцитам и не позднее 2 часов по всем другим параметрам исследования.

3. **Измерение фона.** Измерение фона от реагентов начинается автоматически после включения прибора. После цикла на дисплее прибора будут отражены фоновые показатели. **Не переливайте остатки реагента в емкость с новым реагентом! При этом вы загрязняете новый реагент и прибор!** Держите реагенты плотно закрытыми. Одна из причин повышенного фона по тромбоцитам — это либо загрязнения, попавшие в емкость с изотоническим разбавителем в процессе замены реагента, либо использование очищающего раствора другой концентрации. **Категорически запрещается использовать нереконмендованные очищающие растворы, так как это может привести к повреждению прибора.**

4. **Калибровка.**

Проводится с помощью контрольной крови нормального уровня. Цель калибровки — расчет фактора линейности. Если после трех измерений значения удовлетворяют критерию линейности, то анализатор предложит завершить калибровку. Если не удовлетворяет, то она проводится до 5 раз. Для режима "Капиллярная кровь" — проводится отдельная калибровка (фон экрана черный). Когда проводится калибровка:

- a. При использовании нового лота реагентов
- b. После устранения поломки прибора
- c. При использовании нового лота контрольной крови
- d. Если не принимаются результаты контроля качества

5. **Контроль качества** Ежедневное проведение контроля качества - гарантия достоверности результатов исследований. В анализаторе PCE-90vet предусмотрены два режима контроля качества: автотоматический и ручной. При использовании контрольной крови, значения показателей крови указаны в паспорте на контрольную кровь. Требования к контрольной крови:

- a. непросроченная, хранившаяся при температуре 4-8°C, без признаков подтекания;
- b. перед анализом кровь прогреть при комнатной температуры не менее 15 минут и хорошо перемешать не встяхивая;

6. **Распечатка результатов**

- a. Рекомендуется подключать внешний принтер (типа Epson 300+), в этом случае будет выводиться полный отчет исследования, который включает границы норм и полную информацию по пациенту.
- b. Не убирайте из распечаток гистограммы - они очень информативны и позволяют поставить предварительный диагноз или указать на неправильность проведения анализа.

Интерпретация результатов.

Основные показатели красных клеток крови

Показатель	Единицы измерения	Метод определения
HGB (Hemoglobin) — концентрация гемоглобина	г/л	Фотометрический
RBC (Red Blood Cells) — эритроциты	$10^{12}/л$	Кондуктометрический
MCV (Mean Cell Volume) — средний объем эритроцитов	фл	Кондуктометрический

HCT (Hematocrit) — гематокрит	%	$HCT = RBC \times MCV / 10$
MCH (Mean Cell Hemoglobin) — среднее содержание гемоглобина в эритроците	пг	$MCH = HGB / RBC$
MCHC (Mean Cell Hemoglobin Concentration) — средняя концентрация гемоглобина в эритроците	г/дл	$MCHC = HGB \times 10 / HCT[\%]$
RDW (Red cell Distribution Width) — ширина распределения эритроцитов по объемам. Характеризует степень анизоцитоза эритроцитов.	%	Кондуктометрический: $RDW = SDRBC \times 100 / MCV$

MCH можно пересчитать в значения цветового показателя:

$$ЦП = MCH / 33,4$$

Эритроцитарные индексы связаны между собой соотношением:

$$MCH = MCHC \times MCV / 100$$

А так как MCHC очень стабильный показатель и его среднее значение в правильно откалиброванном анализаторе примерно равняется 34 %, то приближенно:

$$MCH = 34 \times MCV / 100, \text{ а } ЦП = MCV / 100$$

Основные показатели белых клеток крови и тромбоцитов

Показатель	Единицы измерения	Метод определения
WBC (White Blood Cells) — лейкоциты	$10^9/\text{л}$	Кондуктометрический
В анализаторах с частичной дифференцировкой лейкоцитов определяются следующие показатели (относительные и абсолютные количества):		Кондуктометрический
LYM (LY) — лимфоциты	%, $10^9/\text{л}$	
MID (MON) — средние клетки (в них входят моноциты и частично эозинофилы и базофилы)	%, $10^9/\text{л}$	
GRA (GRAN) — гранулоциты	%, $10^9/\text{л}$	
PLT (Platelets) — тромбоциты	$10^9/\text{л}$	Кондуктометрический
MPV (Mean Platelet Volume) — средний объем тромбоцитов	фл	Кондуктометрический
P-LCR (Large Platelet Ratio) — относительное количество крупных тромбоцитов (> 12 фл)	%	Кондуктометрический/ расчетный
PDW (Platelet Distribution Width) — ширина распределения тромбоцитов по объемам. *)	%	Кондуктометрический
PCT (Platelet Grit) — тромбокрит *)	%	Расчетный

*) диагностическая значимость данных тромбоцитарных индексов в н.в. не определена

Оформление работы: Записать основные показатели которые сделали на гематологическом анализаторе, сравнить каждый показатель с нормой и сделать вывод о возможных отклонениях.

2.2 Лабораторная работа №2 (2 часа).

Тема: Клинико-диагностическое значение определения белков плазмы крови методом электрофореза.

2.2.1 Цель работы: ознакомиться с методом электрофореза, провести исследование сыворотки крови животных при различных патологиях, сравнить с нормой.

2.2.2 Задачи работы:

1. Изучить прибор Астра, для разделения фракций крови.
2. Рассмотреть как идет разделение белков и липидов плазмы крови.

2.2.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

1. Устройство электрофореза белков сыворотки крови на плёнках из ацетата целлюлозы с регулируемыми параметрами напряжения, силы тока и режимов УЭФ-01 «Астра».

2.2.4 Описание (ход) работы:

1. Сухие пластины (мембраны) ацетата целлюлозы помечают карандашом, затем осторожно кладут на поверхность электродного буфера таким образом, чтобы они всасывали жидкость снизу с помощью капиллярных сил. т.к. при быстром погружении в их порах может остаться воздух. После извлечения из буферного раствора пластинку аккуратно промокают между листами плотной фильтровальной бумаги, не допуская высыхания пластинки. О высыхании свидетельствует появление на пластинке белых пятен, в этом случае пропитывание необходимо повторить.

2. Смоченную в буфере пластинку закладывают в рамку и помещают в электрофоретическую камеру. Нанесение образцов осуществляется с помощью аппликатора. На поверхность пластинки наносят 0,2 мкл сыворотки крови на катодный край.

3. Сразу после нанесения образцов, подключают электрический ток. Для кратковременного ЭФ на АЦ лучшие результаты получают при стабилизации напряжения. Как правило, при использовании пластинок АЦ, толщина которых около 120 мкм, сила тока не должна превышать 0,5 мА на 1 см ширины пластины. Если же применяют более толстые пластины 250-300 мкм сила тока может достигать 1,0 мА на 1 см ширины. Применяв высокий градиент напряжения 30-40 В/см, можно получить четкое разделение за короткий промежуток времени (10-20 мин.).

4. После отключения тока пластинку осторожно переносят в красящий раствор на 3-5 минут. Затем отмывают до отбеливания фона в 5-7 % растворе уксусной кислоты дважды по 3 минуты. Подсушивают между листами фильтровальной бумаги.

5. Проводят просветление пластинки. Для этого помещают пластинку в 96 спирт на 30 секунд. Погружают пленку в осветляющий раствор на 30 секунд, наклеивают на стекло и помещают в сушижаровой шкаф на 5 минут температура 90-100 С.

6. Высушенную пластину сканируют на денситометре при длине волны 540 нм.

Данные о содержании белковых фракций в сыворотке крови могут быть представлены как в форме процентного распределения, так и в форме содержания белка в отдельных фракциях в г/л (в пересчете на общий белок).

Нормальный диапазон величин белковых фракций (%)

белковые фракции	краситель пунцовый С, ПК- 144	краситель бромфеноловый синий	краситель амидо-черный
альбумин	62 56,5 - 66,8	58 53,9- 62,1	63,7 57,7 - 69,8
глобулины			
альфа 1	4,7 2,5 -6,0	3,9 2,7 -5,1	3,4 1,4 -5,4
альфа 2	8,7 6,9 - 10,5	8,8 7,4 - 10,2	8,29 4,4 - 12,2
бета	10,0 7,3 - 13,0	13,0 11,7- 15,3	10,4 7,2 - 13,8
гамма	15,9 12,8 - 19,0	18,5 15,6 -21,4	15,2 18,8-21,6

Расшифровка результата

Повышение альфа-1-глобулинов: острые, подострые, обостренные хронические воспалительные процессы; поражения печени; все процессы тканевого распада или клеточной пролиферации.

Снижение альфа-1-глобулинов: дефицит антитрипсина, гипо-альфа-1-липопротеидемии.

Повышение альфа-2-глобулинов: острые воспалительные процессы (пневмония, эмпиема плевры, злокачественные опухоли, нефротический синдром).

Снижение альфа-2-глобулинов: сахарный диабет, гепатиты.

Повышение бета-глобулинов: первичные и вторичные гиперлипопротеидемии, заболевания печени, нефротический синдром, язва желудка, гипотериоз.

Снижение бета-глобулинов: гипо-бета-липопротеинемия.

Повышение гамма-глобулинов: инфекция, воспаления, коллагенозы, деструкция тканей, гепатиты, цирроз печени, хронический лимфолейкоз.

Снижение гамма-глобулинов: истощение иммунной системы; врожденная, физиологическая, идиопатическая гипогаммаглобулинемия.

Оформление работы: Записать принцип работы прибора и полученные результаты, сравнить отклонения при заболевании у животных по сравнению с здоровыми.

2.3 Лабораторная работа №3 (2 часа).

Тема: **Клинико-диагностическое значение определения белков плазмы крови. Разделение белков и липидов плазмы крови методом электрофореза.**

2.3.1 Цель работы: провести качественные реакции на аминокислоты и белки, сделать качественное определение общего белка при нормальном состоянии животного и при патологическом процессе.

2.3.2 Задачи работы:

1. Изучить нормы содержания общего белка в сыворотке крови.
2. Качественные реакции при определении аминокислот.

2.3.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

1. Пробирки.
2. Штатив.

3. Спиртовка.
4. Сыворотка крови.

2.3.4 Описание (ход) работы:

Цветные реакции применяются для установления белковой природы вещества, идентификации белков и определения их аминокислотного состава в различных биологических жидкостях. В клинической лабораторной практике эти методы используются для определения количества белка в плазме крови, аминокислот в моче и крови, для выявления наследственных или приобретенных нарушений обмена веществ.

Реакция №1 «Биуретовая реакция на пептидную связь»

Принцип: в основе биуретовой реакции лежит способность пептидных связей (-CO-NH-) образовывать с сульфатом меди в щелочной среде окрашенные комплексные соединения, интенсивность окраски которых зависит от длины полипептидной цепи. Раствор белка дает сине-фиолетовое окрашивание.

Реактивы: 1) яичный белок, 1% раствор (белок куриного яйца фильтруют через марлю и разводят дистиллированной водой 1:10); 2) гидроокись натрия, 10% раствор; 3) сульфат меди, 1% раствор.

Ход определения: в пробирку вносят 5 капель раствора яичного белка, 3 капли гидроокиси натрия и 1 каплю сульфата меди, перемешивают. Содержимое пробирки приобретает сине-фиолетовое окрашивание.

Реакция №2 «Нингидриновая реакция»

Принцип: сущность реакции состоит в образовании соединения, окрашенного в сине-фиолетовый цвет, состоящего из нингидрина и продуктов гидролиза аминокислот. Эта реакция характерна для аминогрупп в α -положении, которые присутствуют в природных аминокислотах и белках.

Реактивы: 1) яичный белок, 1% раствор; 2) нингидрин, 0,5% водный раствор.

Ход определения: в пробирку вносят 5 капель раствора яичного белка, добавляют 5 капель раствора нингидрина и нагревают до кипения. Развивается розово-фиолетовое окрашивание, переходящее с течением времени в сине-фиолетовое.

Реакция №3 «Ксантопротеиновая реакция»

Принцип: при добавлении к раствору белка концентрированной азотной кислоты и нагревании появляется желтое окрашивание, которое в присутствии щелочи переходит в оранжевое. Сущность реакции заключается в нитровании бензольного кольца циклических аминокислот азотной кислотой с образованием нитросоединений, выпадающих в осадок. Реакция выявляет наличие в белке циклических аминокислот (фенилаланин, тирозин, триптофан).

Реактивы: 1) яичный белок, 1% раствор; 2) концентрированная азотная кислота; 3) гидроокись натрия, 10% раствор.

Ход определения: к 5 каплям раствора яичного белка добавляют 3 капли азотной кислоты и (*осторожно!*) нагревают. Появляется осадок желтого цвета. После охлаждения добавляют (желательно на осадок) 10 капель раствора гидроокиси натрия, появляется оранжевое окрашивание.

Реакция №4 «Реакция Адамкевича»

Принцип: аминокислота триптофан в кислой среде, взаимодействуя с альдегидами кислот, образует продукты конденсации красно-фиолетового цвета.

Реактивы: 1) неразбавленный яичный белок; 2) концентрированная (ледяная) уксусная кислота; 3) концентрированная серная кислота.

Ход определения: к одной капле белка прибавляют 10 капель уксусной кислоты. Наклонив пробирку, осторожно по стенке добавляют каплями около 0,5 мл серной кислоты так, чтобы жидкости не смешивались. При стоянии пробирки на границе жидкостей появляется красно-фиолетовое кольцо.

Реакция №5 «Реакция Фоля»

Принцип: аминокислоты, содержащие сульфгидрильные группы – SH, подвергаются щелочному гидролизу с образованием сульфида натрия Na₂S. Последний, взаимодействуя с плюмбитом натрия (образуется в ходе реакции между ацетатом свинца и гидроокисью натрия), образует осадок сульфида свинца PbS черного или бурого цвета.

Реактивы: 1) яичный белок, 1% раствор; 2) реактив Фоля (к 5% раствору ацетата свинца прибавляют равный объем 30% раствора гидроокиси натрия до растворения образовавшегося осадка).

Реакция 6. Осаждение белка солями тяжелых металлов

Описание опыта. В две пробирки наливают по 1–2 мл раствора белка и медленно, при встряхивании, добавляют по каплям в одну пробирку насыщенный раствор сульфата меди, а в другую – 20%-й раствор ацетата свинца. Образуются осадки труднорастворимых солеобразных соединений белка. Опыт иллюстрирует применение белка как противоядия при отравлении солями тяжелых металлов.

Определение общего белка в сыворотке крови на приборе «Стат Факс»

Набор реагентов для определения содержания общего белка в сыворотке или плазме крови биуретовым методом.

Принцип метода. Белок образует окрашенный комплекс с ионами меди в щелочной среде. Интенсивность окраски пропорциональна концентрации белка в пробе.

Ход работы. Для исследования приготовьте рабочий реагент: разведите необходимое количество биуретового реактива бидистиллированной водой в соотношении 1:4.

Процедура анализа:

Подготовьте пробы следующего состава:	Опытная проба	Калибровочная проба	Контрольная проба
Рабочий реагент, мл	1,0	1,0	1,0
Сыворотка, мкл	20	-	-
Калибратор, мкл	-	20	-
Вода бидист., мкл	-	-	20

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

Показатель	Обозначение, Единицы измерения	Норма общего белка здоровых животных						
		Овцы, козы	Свиньи	Лошади	КРС	Кошка	Собака	Куры
Концентрация общего белка	г/л	65-75	70-85	70-78	72-86	60-80	54-77	43-59

Оформление работы: Записать основные качественные реакции и результат по содержанию общего белка в сыворотки крови. Полученные результаты, сравнить с нормой общего белка для здоровых животных.

2.4 Лабораторная работа №4 (2 часа).

Тема: **Качественный и количественный методы определения глюкозы.**

2.4.1 Цель работы: провести качественные реакции на глюкозу, и освоить метод определения глюкозы в сыворотке крови на приборе Стат Факс.

2.4.2 Задачи работы:

1. Изучить нормы содержания глюкозы в сыворотке крови.
2. Количественное определение глюкозы.

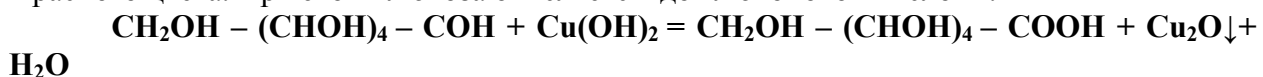
2.4.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

1. Пробирки.
2. Штатив.
3. Спиртовка.
4. Сыворотка крови.

2.4.4 Описание (ход) работы:

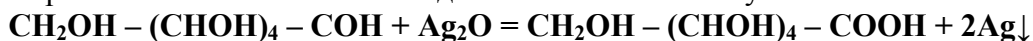
Качественная реакция глюкозы с гидроксидом меди (II). Поскольку глюкоза является многоатомным спиртом, она реагирует с гидроксидом меди (II), проявляя при этом восстановительные свойства.

Если добавить к раствору глюкозы несколько капель раствор щелочи и раствора сульфата меди (II), то осадок гидроксида меди будет отсутствовать. Раствор окрасится в ярко-синий цвет. В этом случае глюкоза ведет себя как многоатомный спирт, растворяя гидроксид меди (II). Будем подогревать полученный раствор. Его цвет начнет изменяться. Первоначально образуется желтый осадок гидроксида меди одновалентной, который с течением времени превращается в более крупные кристаллы оксида меди одновалентной красного цвета. При этом глюкоза окисляется до глюконовой кислоты.



Качественная реакция на глюкозу с аммиачным раствором оксида серебра (I).

Наличие альдегидной группы в глюкозе можно доказать используя аммиачный раствор оксида серебра. Раствор глюкозы добавим к аммиачному раствору оксида серебра, а затем подогреем полученную смесь на водяной бане. Через небольшой промежуток времени на стенках колбы будет осаждаться металлическое серебро. Реакция эта называется реакцией серебряного зеркала и используется как качественная для выявления альдегидов. Альдегидная группа глюкозы окисляется до карбоксильной группы. При этом глюкоза окисляется до глюконовой кислоты.



Реакция серебряного зеркала - это реакция восстановления серебра из аммиачного раствора оксида серебра (реактив Толленса).

В водном растворе аммиака оксид серебра растворяется с образованием комплексного соединения - гидроксид диамминсеребра(I) $[\text{Ag}(\text{NH}_3)_2]\text{OH}$

Количественное определение концентрации глюкозы на приборе «Стат Факс»

Для работы используется набор реагентов для определения концентрации глюкозы в сыворотке и плазме крови энзиматическим колориметрическим методом без депротеинизации.

Принцип метода:

РО-глюкоза под действием фермента глюкозооксидазы окисляется до О-глюконолактона. Образующаяся в данной реакции перекись водорода при участии фермента пероксидазы способствует окислительному азосочетанию 4-аминоантипирина и фенола с образованием окрашенного соединения (хинониминный краситель). Интенсивность окраски реакционной среды пропорциональна содержанию глюкозы в исследуемом материале и определяется фотометрически.

Исследуемый материал:

Сыворотка или плазма крови. Отделить от клеточных элементов немедленно! Для замедления гликолиза и предотвращения свертывания при заборе крови использовать пробирки, содержащие фторид натрия и антикоагулянт.

Состав набора:

Реагент № 1. Буфер

Реагент № 2. Ферменты (лиофилизат)

Калибратор - раствор глюкозы 10 ммоль/л

Подготовка реагентов к процедуре анализа и их стабильность:

Содержимое одного флакона с реагентом № 2 растворить в содержимом одного флакона с реагентом № 1 при аккуратном перемешивании. Рабочий реагент готов к применению через 2 минуты после растворения. Рабочий реагент стабилен при температуре 2-8°C в защищенном от света месте в плотно закрытом флаконе не менее 6 месяцев. Тщательно закрывать флакон с рабочим реагентом после каждого использования. Бледно-розовая окраска рабочего реагента с величиной оптической плотности до 0,250 А, измеренной против дистиллированной воды при длине волны 500 нм, не влияет на правильность определения глюкозы в исследуемом образце.

Калибратор готов к использованию; после вскрытия флакона калибратор стабилен не менее 6 месяцев при температуре 2-8°C.

Невскрытые реагенты стабильны в 18 месяцев в защищенном от света месте: реагент № 2 и калибратор при температуре 2-8°C, реагент № 1 при комнатной температуре. Дата изготовления, серия и номер набора по каталогу указаны на упаковке.

Процедура анализа:

Компоненты реакционной среды	Опытная проба	Калибровочная проба	Контрольная (холостая) проба
Рабочий реагент, мл	2,0	2,0	2,0
Сыворотка, плазма, мл	0,01	-	-
Калибратор, мл	-	0,01	-
Вода дистиллированная, мл	-	-	0,01

Реакционную смесь тщательно перемешайте и инкубируйте не менее 20 минут при 37°C или 30 минут при комнатной температуре (18-25°C). После окончания инкубации измерьте оптическую плотность опытной и калибровочной проб против контрольной (холостой) пробы при длине волны 500 нм (490 - 540 нм). Окраска растворов стабильна в течение 1 часа после окончания инкубации при хранении проб в защищенном от света месте при комнатной температуре.

Норма глюкозы для здоровых животных

Показатель	Обозначение, Единицы измерения	Норма глюкозы						
		Овцы, козы	Свиньи	Лошади	КРС	Кошка	Собака	Куры
Концентрация глюкозы	ммоль/л	2,2- 3,3	3,3-5,5	3,05- 5,27	2,2- 3,3	3,4-6,1	3,3-6,0	1,44- 7,77

Оформление работы: Записать основные качественные реакции на глюкозу, сравнить полученный результат количественного определения глюкозы в сыворотке крови с нормальными показателями без патологии.

2.5 Лабораторная работа №5 (2 часа).

Тема: Определение холестерина, триглицеридов, липазы в сыворотке крови.

2.5.1 Цель работы: освоить методики определения липидов в сыворотке крови у различных видов животных.

2.5.2 Задачи работы:

1. Изучить нормы содержания липидов в сыворотке крови.

2. Количественное определение холестерина.

2.5.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

1. Пробирки.
2. Стат Факс биохимический анализатор.
3. Сыворотка крови.

2.5.4 Описание (ход) работы:

Определение триглицеридов.

Набор реагентов для определения концентрации триглицеридов в сыворотке и плазме крови энзиматическим колориметрическим методом.

Принцип метода:

Липаза катализирует гидролиз липидов до глицерина и жирных кислот. Глицерин запускает ряд сопряженных ферментативных реакций с участием ферментов глицерокиназы в присутствии АТФ и глицеролфосфатоксидазы. Образующаяся в ходе данных реакций перекись водорода при участии фермента пероксидазы способствует окислительному азосочетанию 4-аминоантипирина и фенола с образованием окрашенного соединения (хинониминный краситель). Интенсивность окраски реакционной среды пропорциональна содержанию триглицеридов в исследуемом материале и определяется фотометрически.

Исследуемый материал:

Свежая сыворотка крови, гепаринизированная или ЭДТА-плазма крови без следов гемолиза. Забор крови желательнее производить после 12-ти часового голодания. Исследуемый материал может храниться 3 дня при температуре 2 - 8°C.

Состав набора: Реагент № 1. Буфер (50 мл) Реагент № 2. Лиофилизат (1 флакон) Калибратор - 2,29 ммоль/л (200 мг/100 мл) (2 мл)

Подготовка реагентов к процедуре анализа и их стабильность:

Содержимое одного флакона с реагентом № 2 растворить в содержимом одного флакона с реагентом Л"» 1 при аккуратном перемешивании. Рабочий реагент готов к применению через 20 минут после растворения. Рабочий реагент стабилен при температуре 2-8°C в защищенном от света месте в плотно закрытом флаконе не менее 6 месяцев. Тщательно закрывать флакон с рабочим реагентом после каждого использования. Бледно-розовая окраска рабочего реагента с величиной оптической плотности до 0,250 А, измеренной против дистиллированной воды при длине волны 500 нм, не влияет на правильность определения триглицеридов в исследуемом образце. Избегайте контакта рабочего реагента с источниками глицерина извне (мыла, крема и др.).

Калибратор готов к использованию; после вскрытия флакона калибратор стабилен не менее 6 месяцев при температуре 2-8°C.

Невскрытые реагенты стабильны в течение года в защищенном от света месте: реагент № 2 и калибратор при температуре 2-8°C, реагент № 1 при комнатной температуре.

Процедура анализа.

Компоненты реакционной среды	Опытная проба	Калибровочная проба	Контрольная проба
Рабочий реагент, мл	2,0	2,0	2,0
Сыворотка (плазма), мл	0,02	-	-
Калибратор, мл	-	0,02	-
Вода дистилл., мл	-	-	0,02

Реакционную смесь тщательно перемешайте и инкубируйте не менее 15 минут при комнатной температуре (18-25°C) или 10 минут при температуре 37°C. После окончания инкубации измерьте оптическую плотность опытной и калибровочной проб против контрольной (холостой) пробы при длине волны 500 нм (490 - 540 нм). Окраска растворов стабильна в течение 1 часа после окончания инкубации при хранении проб в защищенном от света месте при комнатной температуре. Объемы исследуемого образца и монореагента можно изменить, соблюдая соотношение 1:100.

Автоматические анализаторы:	
Длина волны	500 нм
Измерение против	Контрольной пробы
Метод измерения	Конечная точка
Изменение оптической плотности	Возрастает
Температура	37°C
Соотношение образец / реагент	1:100
Время преинкубации	3 секунды
Время реакции	600 секунд
Предел абсорбции контрольной пробы Предел максимальной абсорбции	0.250 А 2.000 А
Калибратор	2,29 ммоль/л
Линейность	0,1-11,4 ммоль/л

Расчет концентрации триглицеридов (С, ммоль/л) проведите по формуле:

$C = \frac{E_{\text{пробы}}}{E_{\text{калибр}}} \times 2,29 \text{ ммоль/л}$, где:

$E_{\text{калибр}}$

$E_{\text{пробы}}$ - ед. он г. плот, исследуемой пробы

$E_{\text{калибр}}$ - ед. опт. плот, калибровочной пробы

2,29 ммоль/л - концентрация триглицеридов в калибраторе

Нормальные величины: 0,15 -1,71 ммоль/л или 13 -160 мг/100 мл

Группа риска - 1,71 - 2,29 ммоль/л или 160 - 200 мг/100 мл Патологические показатели: > 2,29 ммоль/л или 200 мг/100 мл

Аналитические характеристики:

Линейность - 0,1-11,4 ммоль/л Коэффициент вариации - не более 5%

Определение общего холестерина

Набор реагентов для определения концентрации общего холестерина в сыворотке и плазме крови энзиматическим колориметрическим методом.

Принцип метода:

Холестерин из состава эфиров высвобождается под действием фермента холестерин-эстеразы (ХЭ). При участии фермента холестериноксидазы (ХО) холестерин окисляется до 4-холестен-3-она. Образующаяся перекись водорода, при участии фермента пероксидазы, способствует окислительному азосочетанию 4-аминоантипирина (4-ААП) и фенола с образованием окрашенного соединения (хинониминового краситель). Интенсивность окраски реакционной среды пропорциональна содержанию холестерина в исследуемом материале и определяется фотометрически при длине волны 500 (490-520) нм.

Исследуемый материал:

Сыворотка, гепаринизированная или ЭДТА-плазма крови без следов гемолиза.

Проба стабильна 7 дней при температуре 2-8°C.

Состав набора:

Реагент № 1. Буфер

Реагент № 2. Ферменты (лиофилизат)

Калибратор- раствор холестерина 5,17 ммоль/л

Подготовка реагентов к процедуре анализа и их стабильность:

Содержимое одного флакона с реагентом № 2 растворить в содержимом одного флакона с реагентом № 1 при аккуратном перемешивании. Рабочий реагент готов к применению через 2 минуты после растворения. Рабочий реагент стабилен при температуре 2-8°C в защищенном от света месте в плотно закрытом флаконе не более 6 месяцев. Тщательно закрывать флакон с рабочим реагентом после каждого использования. Бледно-розовая окраска рабочего реагента с величиной оптической плотности до 0,200 А, измеренной против дистиллированной воды при длине волны 500 нм, не влияет на правильность определения холестерина в исследуемом образце.

Калибратор готов к использованию; после вскрытия флакона калибратор стабилен не менее 6 месяцев при температуре 2-8°C.

Невскрытые реагенты стабильны в течение года в защищенном от света месте: реагент № 2 и калибратор при температуре 2-8°C, реагент № 1 при комнатной температуре. Дата изготовления, серия и номер набора по каталогу указаны на упаковке.

Процедура анализа:

Компоненты реакционной среды	Опытная проба	Калибровочная проба	Контрольная проба
Рабочий реагент, мл	2,0	2,0	2,0
Сыворотка (плазма), мл	0,02	-	-
Калибратор, мл	-	0,02	-
Вода дистилл., мл	-	-	0,02

Реакционную смесь тщательно перемешайте и инкубируйте не менее 15 минут при комнатной температуре (18-25°C) или 10 минут при температуре 37°C. После окончания инкубации измерьте оптическую плотность опытной и калибровочной проб против контрольной (холостой) пробы при длине волны 500 нм (490 - 540 нм). Окраска растворов стабильна в течение 1 часа после окончания инкубации при хранении проб в защищенном от света месте при комнатной температуре.

Расчет концентрации холестерина (С, ммоль/л) проведите по формуле:

$S_k = \frac{E_{\text{пробы}}}{E_{\text{калибр}}} \times 5,17 \text{ ммоль/л}$, где

$E_{\text{калибр}}$

$E_{\text{пробы}}$ - ед. опт. плот, исследуемой пробы

$E_{\text{калибр}}$ - ед. опт. плот, калибровочной пробы

5,17 ммоль/л - концентрация холестерина в калибраторе

Оформление работы: Записать полученный результат в таблицу и сравнить с нормой.

2.6 Лабораторная работа №6 (2 часа).

Тема: **Особенности обмена минеральных веществ и витаминов в организме животных. Определение уровня меди, цинка, железа, витаминов А и Е в сыворотке крови.**

2.6.1 Цель работы: ознакомиться с основными методами определения микро- и макроэлементов, а так же витаминов в сыворотке крови животных.

2.6.2 Задачи работы:

1. Освоить приборы по определению микро-макроэлементов в крови.
2. Хроматографические методы анализа при исследовании витаминов.

2.6.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

1. Биохимический анализатор «Стат Факс»,
2. Атомно-абсорбционный анализатор «Спектр 5-3»,
3. Жидкостной хроматограф «Орлант».

2.6.4 Описание (ход) работы:

Определение микро- и макроэлементов на биохимическом анализаторе «Стат Факс»

Определение цинка.

Набор реагентов для определения концентрации цинка в сыворотке (плазме) крови и моче прямым колориметрическим методом без депротеинизации (хромоген 5-Вг-РАР8). Количество определений зависит от характеристик используемого биохимического анализатора и минимального рабочего объема кюветы. Согласно стандартной процедуре анализа набор рассчитан на 50 определений.

Принцип метода:

Цинк, диссоциированный из белкового комплекса под действием детергента, в щелочной среде реагирует с 2-(5-бром-2-пиридилазо)-5-(1Ч-пропил-М-сульфопропиламино)-фенолом (5-Вг-РАР8), с образованием окрашенного комплекса. Интенсивность окраски реакционной среды пропорциональна содержанию цинка в исследуемом материале и определяется фотометрически при длине волны 560 нм (540-580 нм). Интерференция других микроэлементов (железа и меди), присутствующих в образце, устраняется использованием особых условий реакции и определенных маскирующих агентов.

Исследуемый материал:

Сыворотка или только гепаринизированная плазма крови без следов гемолиза и выраженной липемии. Сыворотку/плазму необходимо отделить от форменных элементов не позднее чем через 1 час после забора крови. Пробы стабильны в течение 3-х дней при температуре +2- 8°C.

Состав набора:

Монореагент (50 мл)

Калибратор - 30,6 мкмоль/л (200 мкг/100 мл) (2мл)

Подготовка реагентов к процедуре анализа и их стабильность:

Перед работой нагрейте монореагент до комнатной температуры. Калибратор готов к использованию; после вскрытия флакона калибратор стабилен не менее 6 месяцев. Плотно закрывайте флаконы сразу после каждого использования реагентов.

Невскрытые реагенты стабильны не менее 12 месяцев при хранении в защищенном от света месте при температуре +2 - 8°C.

Стандартная процедура анализа:

Подготовьте пробы следующего состава:	Опытная проба	Калибровочная проба	Контрольная проба
Монореагент, мл	1,0	1,0	1,0
Исследуемый образец, мкл	50	-	-
Калибратор, мкл	-	50	-
Вода бидистилл., мкл	-	-	50

Объемы опытных проб и реагентов могут быть пропорционально изменены, соблюдая соотношение образец/реагент 1:20.

Пробы тщательно перемешайте и инкубируйте 5 мин при +37°C или 10 мин при комнатной температуре. Измерьте оптические плотности опытной и калибровочной проб

против контрольной пробы при длине волны 560 нм (540-580 нм) в кювете с длиной оптического пути 1 см. Интенсивность окраски стабильна не менее 20 минут.

Автоматические анализаторы:	
Длина волны	560 нм
Измерение против	Контрольной пробы
Метод измерения	Конечная точка
Изменение оптической плотности	Возрастает
Температура	37°C
Соотношение образец/реагент	1:20
Время реакции	300 секунд
Предел абсорбции контрольной пробы против воздуха Предел максимальной абсорбции	0.50A 2,00 A
Калибратор	30,6 мкмоль/л (200 мкг/дл)
Линейность	306 мкмоль/л (2000 мкг/дл)

Расчет концентрации цинка (С) в исследуемом образце проведите по формуле: для образцов сыворотки/плазмы для образцов мочи

$$C = \frac{E_{\text{пробы}}}{E_{\text{калибр}}} \times 30,6 \text{ мкмоль/л}$$

$$C = \frac{E_{\text{пробы}}}{E_{\text{калибр}}} \times V \times 30,6$$

мкмоль/24ч

Е калибр.

Е калибр.

где:

Е пробы - оптическая плотность исследуемой пробы,

Е калибр. - оптическая плотность калибровочной пробы,

30,6 - концентрация цинка в калибраторе мкмоль/л,

V - суточный объем мочи, л/24ч.

Фактор пересчета: мкмоль/л * 6,536 = мкг/дл

Определение меди в сыворотке крови.

Набор реагентов для определения концентрации меди в сыворотке (плазме) крови прямым колориметрическим методом без депротеинизации (хромоген 3,5-ФВг-РАЕ8А). Количество определений зависит от характеристик используемого биохимического анализатора и минимального рабочего объема кюветы. Согласно стандартной процедуре анализа набор рассчитан на 50 определений.

Принцип метода:

Медь, диссоциированная из белкового комплекса под действием детергента, в кислой среде реагирует с 4-(3,5-дибром-2-пиридилазо)-этил-(3-сульфопропил) анилином (3,5-6ЧВг-РАЕ8А), с образованием окрашенного комплекса. Интенсивность окраски реакционной среды пропорциональна содержанию меди в исследуемом материале и определяется фотометрически при длине волны 580 нм (570-590 нм). Интерференция других микроэлементов (железа и цинка), присутствующих в образце, устраняется использованием особых условий реакции и определенных маскирующих агентов.

Исследуемый материал:

Сыворотка или плазма (только гепаринизированная) крови без следов гемолиза и выраженной липемии. Сыворотку/плазму необходимо отделить от форменных элементов не позднее чем через 1 час после забора крови. Пробы стабильны в течение 3-х дней при температуре +2- 8°C.

Состав набора:

Монореагент (50 мл)

Калибратор - 31,5 мкмоль/л (200 мкг/100 мл) (2 мл)

Подготовка реагентов к процедуре анализа и их стабильность:

Монореагент и калибратор готовы к использованию; после вскрытия флакона калибратор стабилен не менее 6 месяцев. Плотно закрывайте флаконы сразу после каждого использования реагентов.

Невскрытые реагенты стабильны не менее 12 месяцев при хранении в защищенном от света месте при температуре +18 - 25°C.

При +2-8°C возможно выпадение осадка, в этом случае нагрейте реагент до комнатной температуры, а затем перемешайте до полного растворения осадка.

Стандартная процедура анализа:

Подготовьте пробы следующего состава:	Опытная проба	Калибровочная проба	Контрольная проба
Монореагент, мл	1,0	1,0	1,0
Исследуемый образец, мкл	50	-	-
Калибратор, мкл	-	50	-
Вода бидистилл., мкл	-	-	50

Объемы опытных проб и реагентов могут быть пропорционально изменены, соблюдая соотношение образец/реагент 1:20.

Пробы тщательно перемешайте и инкубируйте 5 мин при +37°C. Измерьте оптические плотности опытной и калибровочной проб против контрольной пробы при длине волны 580 нм (570-590 нм) в кювете с длиной оптического пути 1 см. Интенсивность окраски стабильна не менее 20 минут.

Автоматические анализаторы:	
Длина волны	580 им
Измерение против	Контрольной пробы
Метод измерения	Конечная точка
Изменение оптической плотности Температура	Возрастает 37°C
Соотношение образец/реагент	1:20
Время реакции	300 секунд
Предел абсорбции контрольной пробы против воздуха Предел максимальной абсорбции	0,50А 2,00 А
Калибратор	31,5 мкмоль/л (200 мкг/дл)
Линейность	315 мкмоль/л (2000 мкг/дл)

Расчет концентрации меди (С) в исследуемом образце проведите по формуле:

$$C = \frac{E_{\text{пробы}}}{E_{\text{калибр}}} \times 31,5 \text{ мкмоль/л}$$

где:

Е пробы - оптическая плотность исследуемой пробы,

Е калибр. - оптическая плотность калибровочной пробы, 31,5 - концентрация меди в калибраторе, мкмоль/л,

Фактор пересчета: мкмоль/л * 6358 = мкг/дл

Определение железа.

Набор реагентов для определения концентрации железа в сыворотке или плазме крови колориметрическим методом без депротеинизации (хромоген №(го-РАР5).

Принцип метода:

В кислой среде комплексы белка с железом диссоциируют, и железо переходит под действием восстановителя в Fe^{++} . Ионы двухвалентного железа связываются с хромогеном (№пч>-РАР8), образуя окрашенный комплекс, интенсивность окраски которого пропорциональна содержанию железа в пробе.

Исследуемый материал:

Сыворотка или гепаринизированная плазма крови без следов гемолиза и выраженной липемии. Сыворотку необходимо отделить от форменных элементов не позднее чем через 1 час после забора крови. Пробы стабильны в течение 3-х дней при температуре 2 - 8°C.

Состав набора:

Монореагент

Калибратор - 30 мкмоль/л (167 мкг/100 мл)

Подготовка реагентов к процедуре анализа и их стабильность:

Перед работой нагрейте монореагент до комнатной температуры. Калибратор готов к использованию; после вскрытия флакона калибратор стабилен не менее 6 месяцев. Плотно закрывайте флаконы сразу после каждого использования реагентов. Невскрытые реагенты стабильны не менее 12 месяцев при хранении в защищенном от света месте при температуре 2 - 8°C. Дата изготовления, серия и номер по каталогу указаны на упаковке.

Процедура анализа:

ВАРИАНТАМ - ЛИНЕЙНОСТЬ: 5-179 мкмоль/л

Подготовьте пробы следующего состава:	Опытная проба	Калибровочная проба	Контрольная проба
Монореагент, мл	1,00	1,00	1,00
Исследуемый образец, мкл	50	-	-
Калибратор, мл	-	50	-
Вода бидистиллир., мл	-	-	50

Пробы тщательно перемешайте и инкубируйте 10 минут при температуре 37°C. Измерьте оптические плотности опытной и калибровочной проб против контрольной пробы при длине волны 578 нм (570 - 590нм). Интенсивность окраски стабильна не менее часа.

ВАРИАНТ №2 - ЛИНЕЙНОСТЬ: 1-45 мкмоль/л

Подготовьте пробы следующего состава:	Опытная проба	Калибровочная проба	Контрольная проба
Монореагент, мл	1,00	1,00	1,00
Исследуемый образец, мкл	200	-	-
Калибратор, мл	-	50	-
Вода бидистиллир., мл	-	150	200

Пробы тщательно перемешайте и инкубируйте 10 минут при температуре 37°C. Измерьте оптические плотности опытной и калибровочной проб против контрольной пробы при длине волны 578 нм (570 - 590нм). Интенсивность окраски стабильна не менее часа.

Автоматические анализаторы:	
-----------------------------	--

Длина волны	578 нм
Измерение против	Контрольной пробы
Метод измерения	Конечная точка
Изменение оптической плотности Температура	Возрастает 37°C
Соотношение образец/реагент для Варианта 1	1:20
Соотношение образец/реагент для Варианта 2	1:5
Время реакции	600 секунд
Предел абсорбции контрольной пробы против воздуха Предел максимальной абсорбции	030А 2,00 А
Калибратор для Варианта №1	30мкмоль/л (167мкг/дл)
Калибратор для Варианта №2 Линейность для Варианта №1 Линейность для Варианта №2	7,5мкмоль/л (41,75мкг/дл) 5 - 179мкмоль/л (28-1000мкг/дл) 1 - 45мкмоль/л (6-250мкг/дл)

Расчет концентрации железа в исследуемом образце проведите по формулам:
ВАРИАНТ №1

$$C = \frac{E_{\text{пробы}}}{E_{\text{калибр}}} \times \text{мкмоль/л} \quad \text{или} \quad C = \frac{E_{\text{пробы}}}{E_{\text{калибр}}} \times 167 \text{мкг/дл}$$

где:

Е пробы - оптическая плотность опытной пробы,

Е калибр. - оптическая плотность калибровочной пробы,

30мкмоль/л и 167мкг/дл - концентрация железа в калибраторе

Определение микроэлементов в сыворотке крови атомно-абсорбционным методом

Методика подготовки сыворотки крови для анализа.

К 2,0 мл сыворотке крови добавляем 1,0 мл 1,2% раствора HCl и инкубируем в течение 15 минут. После гидролиза белков их осаждает 1,0 мл 20% трихлоруксусной кислоты.

Через 20 мин. центрифугируем 10-15 мин. При 2500 тыс. обор/мин.

Надосадочную жидкость отбираем для анализа.

РЕАКТИВЫ.

а) Для приготовления 1,2% соляной кислоты нужно взять 27,5 мл концентрированной HCl и довести до 1 литра дистиллированной водой.

б) Для приготовления 20% трихлоруксусной кислоты взвесить навеску больше чем 20 г, на 0,5-1,0 гр. и довести объем дистиллированной водой до 100 мл в мерной колбе.

Принцип метода.

В эппендорф берется 300 мкл. плазмы крови, смешивается с 300 мкл. этанола и 300 мкл. гексана.

Полученная смесь интенсивно встряхивается на вортексе в течение 1 мин., затем центрифугируется 3 мин. при 3000 об./мин. Супернатант отделяется. Операция повторяется не менее 3 раз.

Полученные гексановые вытяжки объединяются и упариваются в токе азота или под вакуумом при Т не более 40°C.

Упаренный образец растворяется в 2х50 мкл. смеси хлороформ : метанол (1:1), переносится в конический эппендорф минимального объема и добавляется 150 мкл. подвижной фазы «А» (состав приведен ниже).

В случае выпадения осадка эппендорф центрифугируется при 1000 – 1500 об/мин. в течение 1 мин.

Супернатант переносится в стеклянную коническую вставку для виал объемом 200 мкл. и анализируется.

Условия хроматографирования жирорастворимых витаминов, выделенных из плазмы крови.

Колонка: RP C8, длина 250 мм, диаметр 4 мм.

Температура колонки: 35⁰С.

Длины волн, nm:

Канал 1: 265, переключение на 292 с 13,4 мин.

Канал 2: 292, переключение на 450 с 10 мин.

Подвижная фаза:

«А» - раствор 100 ммол. ацетата аммония в смеси метанол: ацетонитрил (60:40).

«В» - раствор 100 ммол. ацетата аммония в воде.

Оформление работы: Записать в таблицу полученные результаты различными методами и сравнить их с нормами.

2.7 Лабораторная работа №7(2часа).

Тема: **Лабораторные методы исследования печени. Определение общего билирубина, щелочной фосфатазы, АЛАТ в сыворотке крови.**

2.7.1 Цель работы: — изучить и исследовать основные показатели, которые необходимы при постановке диагноза заболевания печени.

2.7.2 Задачи работы:

1. Определить основные заболевания печени, которые встречаются у животных.

2. Как диагностируют заболевание печени по биохимическим показателям.

2.7.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

1. Биохимический анализатор «Стат Факс»,

2.7.4 Описание (ход) работы:

Определение билирубина.

Набор реагентов для определения концентрация общего и прямого билирубина в сыворотке крови. Метод Йендрассика-Грофа.

Принцип метода:

Прямой (связанный, конъюгированный с глюкуроновой кислотой) билирубин непосредственно реагирует с диазотированной сульфаниловой кислотой, а общий билирубин - в присутствии кофеинового реагента с образованием окрашенного азосоединения. Интенсивность окраски реакционной среды пропорциональна концентрации билирубина и измеряется фотометрически при длине волны 535 (500-560) нм.

Исследуемый материал:

Сыворотка крови без следов гемолиза. Пробы стабильны 2 часа при комнатной температуре в защищенном от света месте. Хранить исследуемый материал при температуре 2-8⁰С, в защищенном от света месте не более 5 дней.

Состав набора:

Реагент № 1. Кофеиновый реагент (200 мл)

Реагент № 2. Сульфаниломм кислота (55 мл)

Реагент № 3. Натрия нитрит (2 мл)

Реагент № 4. Физиологический раствор (250 мл)

Калибратор - 85,5 мкмоль/л (в 2 мл дистил. воды) 1 флакон

Подготовка реагентов к процедуре анализа и их стабильность:

Для исследования приготовьте диазореагент: смешайте необходимые количества реагентов № 2 и № 3 в соотношении 100 : 23* Диазореагент стабилен не менее 10 дней при температуре 2-8⁰С в плотно закрытой посуде из темного стекла.

Содержимое флакона с калибратором растворите в 2 мл дистиллированной воды. После полного растворения концентрация билирубина - 85,5 мкмоль/л.

Растворенный калибратор стабилен в течение 5 дней при температуре 2-8°C в защищенном от света месте.

Срок хранения всех реагентов год при комнатной температуре. Реагент № 3 и калибратор светочувствительны - хранить в защищенном от света месте. Дата изготовления, серия и номер набора по каталогу указаны на упаковке.

Процедура анализа:

Подготовьте пробы следующего состава:	Опытная проба		Контрольная проба	Калибровочная проба
	Общий билирубин	Прямой билирубин		
Сыворотка, мл	ОД	ОД	ОД	-
Реагент № 1, мл	1,4	-	-	1,4
Реагент №4, мл	од	1,6	1,8	од
Калибратор, мл	-	-	-	од
Диазореагент, мл	ОД	ОД	-	од

Пробы тщательно перемешайте.

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

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

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

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

$$C = \frac{E_{\text{пробы}}}{E_{\text{калибр}}} \times 85,5 \text{ мкмоль/л, где}$$

Е пробы - экстинкция опытной пробы,

Е калибр. - экстинкция калибровочной пробы,

853 - концентрация билирубина в калибраторе, мкмоль/л.

Нормальные значения:

общий билирубин - 8,5-20 мкмоль/л. прямой билирубин - до 4,0 мкмоль/л.

Аналитические характеристики набора:

Линейность - до 400 мкмоль/л.

Значение коэффициента вариации - не более 5 %.

Определение аланинаминотрансферазы.

Набор реагентов для определения активности аланинаминотрансферазы в сыворотке и плазме крови энзиматическим кинетическим методом (стабилизированные растворы).

Принцип метода:

Под действием фермента аланинаминотрансферазы (АЛТ) в результате переаминирования происходит перенос аминогруппы с аланна на а-кетоглутарат. Образующийся в данной реакции пируват при участии фермента лактатдегидрогеназы (ЛДГ) и кофермента НАДНг превращается в лактат. Скорость окисления НАДМ2 в ходе второй реакции определяется по уменьшению оптической плотности реакционной среды при 340 нм и пропорциональна активности АЛТ.

Состав набора:

Реагент № 1. Буфер-субстратный раствор (40 мл)

Реагент № 2. Фермент-кофакторный раствор (10 мл)

Подготовка реагентов к процедуре анализа и их стабильность:

Перед проведением анализа смешайте необходимые количества реагентов № 1 и № 2 в соотношении 4:1. Рабочий реагент стабилен при температуре 2-8°C в защищенном от света месте в плотно закрытом флаконе 14 дней. Тщательно закрывайте флаконы с реагентами после каждого использования.

Реагенты № 1 и № 2 готовы к применению. Срок хранения 12 месяцев при температуре 2-8°C. Срок годности, серия и номер набора по каталогу указаны на упаковке.

Процедура анализа:

Исследование проводите непосредственно в термостатируемой фотометрической кювете с длиной оптического пути 1 см при длине волны 340 нм (334 или 365 нм) против воздуха. Смешайте 1 мл рабочего реагента и 0,1 мл анализируемого материала и через 1 минуту начните считывание величины экстинкции с интервалом в 1 минуту в течение 3 минут. Вычислите среднее изменение экстинкции за 1 минуту (ДЕ/мин).

Если ДЕ/мин превышает 0,060/мин при длине волны 365 нм или 0,110/мин при длине волны 340/334 нм, разведите исследуемый образец в 10 раз физиологическим раствором и повторите анализ; результат умножьте на 10.

Расчет активности фермента проводите по формуле:

$\text{Ед/л} = 3235 \times \text{ДЕ}_{365\text{нм}} / \text{мин}$ $\text{Ед/л} = 1746 \times \text{ДЕ}_{340\text{нм}} / \text{мин}$ $\text{Ед/л} = 1780 \times \text{ДЕ}_{334\text{нм}} / \text{мин}$

Аналитические характеристики набора:

Линейность-до 190 Ед/л

Воспроизводимость - коэффициент вариации не более 5%

Определение щелочной фосфатазы.

Набор реагентов для определения активности щелочной фосфатазы в сыворотке и плазме крови оптимизированным кинетическим методом с диэтаноламиновым (ДЭА) буфером.

Принцип метода:

Скорость образования л- нитрофенола, измеряемая фотометрически, пропорциональна активности фермента

Метод рекомендован Немецким обществом клинической химии (БСКС).

Исследуемый материал:

Сыворотка или гепаринизированная плазма крови без следов гемолиза.

Пробы могут храниться не более 4 часов при комнатной температуре 7 дней при 2 - 4 °C.

После замораживания пробы необходимо реактивировать при комнатной температуре в течение 18 - 24 часов.

Состав набора:

Реагент № 1. Буфер

Реагент № 2. Субстрат

Подготовка реагентов к процедуре анализа и их стабильность:

Невскрытые реагенты, входящие в набор, стабильны в течение 12 месяцев при 2-8°C в темноте. Замораживание реагентов недопустимо!

Рабочий реагент: смешайте необходимое количество реагента № 1 и реагента № 2 в соотношении 4:1. Рабочий реагент стабилен не менее 30 дней при 2-8°C в темноте.

Процедура анализа.

Перед началом работы доведите температуру рабочего реагента до температуры исследования.

В кювету фотометра с толщиной поглощающего слоя 1 см внесите 2 мл рабочего реагента и 0,05 мл исследуемой пробы. Тщательно перемешайте и через 1 мин измерьте исходную экстинкцию при длине волны 405 нм. Повторите измерение точно через 1, 2 и 3 мин. Общее время реакции не должно превышать 6 минут. Вычислите среднюю величину изменения экстинкции за 1 минуту ДЕ/мин. Расчет: активность щелочной фосфатазы, Ед/л = $3571 \times \text{ДЕ/мин}$, где ДЕ/мин - среднее изменение экстинкции за 1 мин, 3571 - фактор пересчета.

Если изменение абсорбции ДЕ/мин превышает 0,300 разведите пробу в 10 раз 0,9% N801, повторите измерение и результат умножьте на 10. Нормальные величины в зависимости от температуры проведения исследования:

при 25°C - 60 -170 Ед/л.

при 30°C - 80 - 220 Ед/л

при 37°C - 100- 290 Ед/л

АВТОМАТИЧЕСКИЕ АНАЛИЗАТОРЫ:		
Параметры:		
Длина волны		405 нм
Измерение против		Воздуха
Метод измерения		Кинетика
Изменение оптической плотности		Возрастает
Температура		37°C
Соотношение образен/реагент		1:40
Время преинкубации		60 секунд
Время реакции		60 секунд
Верхний предел абсорбции контрольной Максимально допустимое изменение оптической плотности ДЕ/мин		0.550
		0.300 3571
Фактор пробы линейность		1070 Ед/л

Обратите внимание: активность щелочной Фосфатазы очень сильно зависит от буферной системы, в которой проводится анализ. В силу этого недопустимо сравнивать результаты полученные в гттиновом, диэтаноламиновом или АМР буферах. Соответственно и нормальные значения активности щелочной Фосфатазы для различных систем определения существенно различаются.

Оформление работы: Записать метод определения и полученные результаты по каждому исследуемому показателю.

2.8 Лабораторная работа №8(2часа).

Тема: **Определение активности ферментов АЛТ, АСТ, ЛДГ, глутамилтрансферазы, альфа-амилазы (липазы), щелочной фосфатазы в сыворотке крови.**

2.8.1 Цель работы: изучить основные ферменты которые исследуются в клинической биохимии и провести исследование сыворотки крови различных видов животных.

2.8.2 Задачи работы:

1. Изучить основные ферменты крови.
2. Нормы для здоровых животных.

2.8.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

1. Биохимический анализатор «Стат Факс»,

2.8.4 Описание (ход) работы:

Исследование аспаратаминотрансферазы

Набор реагентов для определения активности аспаратаминотрансферазы в сыворотке и плазме крови энзиматическим кинетическим методом (стабилизированные растворы).

Принцип метода:

Под действием фермента аспаратаминотрансферазы (ЛСТ) в результате переаминирования происходит перенос аминокетогруппы с аспартата на α -кетоглутарат. Образующийся в данной реакции оксалоацетат при участии фермента малатдегидрогеназы (МДГ) и кофермента НАДНг превращается в малат. Скорость окисления НАДНг в ходе второй реакции определяется по уменьшению оптической плотности реакционной среды при 340 нм и пропорциональна активности ЛСТ.

Исследуемый материал:

Свежая сыворотка крови без следов гемолиза. Активность фермента в сыворотке снижается после 3-х дней хранения при температуре 2-8°C на 10%, при температуре 18-25°C на 17%.

Состав набора:

Реагент № 1. Буфер-субстратный раствор (40 мл)

Реагент № 2. Фермент-кофакторный раствор (10 мл)

Подготовка реагентов к процедуре анализа и их стабильность:

Перед проведением анализа смешайте необходимые количества реагентов № 1 и № 2 в соотношении 4:1. Рабочий реагент стабилен при температуре 2-8°C в защищенном от света месте в плотно закрытом флаконе 14 дней. Тщательно закрывайте флаконы с реагентами после каждого использования.

Реагенты № 1 и № 2 готовы к применению. Срок хранения 12 месяцев при температуре 2-8°C. Срок годности, серия и номер набора по каталогу указаны на упаковке.

Процедура анализа:

Исследование проводите непосредственно в термостатируемой фотометрической кювете с длиной оптического пути 1 см при длине волны 340 нм (334 или 365 нм) против воздуха. Смешайте 1 мл рабочего реагента и 0,1 мл анализируемого материала и через 1 минуту начните считывание величины экстинкции с интервалом в 1 минуту в течение 3 минут. Вычислите среднее изменение экстинкции за 1 минуту (АЕ/мин).

Автоматические анализаторы:

Длина волны	340 нм
Измерение против	Воздуха
Метод измерения	Кинетика
Изменение оптической плотности	Уменьшается
Температура	37°C
Соотношение образец / реагент	----- 1:10 60 секунд
Время преинкубации	-----
Время реакции	60 секунд
Верхний предел абсорбции	2,000 А
контрольной пробы Нижний предел абсорбции контрольной пробы Максимально допустимое изменение оптической плотности/мин	
Фактор	0,950 А 0,110 А
	1746
Линейность	до 190 Ед/л

Если АЕ/мин превышает 0,060/мин при длине волны 365 нм или 0,110/мин при длине волны 340/334 нм, разведите исследуемый образец в 10 раз физиологическим раствором и повторите анализ; результат умножьте на 10.

Расчет активности фермента проводите по формуле:

$$\text{Ед/л} = 3235 \times \text{ДЕ} / \text{мин} \quad \text{Ед/л} = 1746 \times \text{АЕ} / \text{мин} \quad \text{Ед/л} = 1780 \times \text{ДЕ} / \text{мин}$$

Измерение у-глутамилтрансферазы

Набор реагентов для определения активности у-глутамилтрансферазы в сыворотке и плазме крови кинетическим методом.

Принцип метода:

у-глутамилтрансфераза (у-ГТФ) катализирует перенос у-глутам иловой группы с синтетического субстрата Ё-у-глутамил-3-карбокси-4-нитроанилид на глицилглицин.

Скорость образования в реакции 5-амино-2-нитробензоата определяется по увеличению оптической плотности реакционной среды при 405 нм и пропорционально активности у-глутамилтрансферазы.

Исследуемый материал:

Сыворотка или плазма (гепарин, ЭДТА) крови.

Активность фермента сохраняется в течение 7 дней при 2-8°C.

Состав набора: Реагент № 1. Буфер (40 мл) Реагент № 2. Субстрат (10 мл)

Подготовка реагентов к процедуре анализа и их стабильность:

Смешайте необходимые количества реагентов № 1 и № 2 в соотношении 4:1. Рабочий реагент стабилен при температуре 2-8°C в защищенном от света месте в плотно закрытом флаконе 14 дней. Тщательно закрывайте флаконы с реагентами после каждого использования. Перед проведением анализа прогрейте рабочий реагент до 37°C. Реагенты № 1 и Х» 2 готовы к применению. Срок хранения 12 месяцев при температуре 2-8°C. Срок годности, серия и номер набора по каталогу указаны на упаковке.

Процедура анализа:

Исследование проводите непосредственно в термостатируемой фотометрической кювете с длиной оптического пути 1 см при длине волны 405 нм против воздуха. Смешайте 1 мл рабочего реагента и 0,1 мл анализируемого материала, тщательно перемешайте и через 1 минуту начните считывание величины экстинкции с интервалом в 1 минуту в течение 3 минут.

Вычислите среднее изменение экстинкции за 1 минуту (АЕ/мин)._____

Расчет активности фермента проводите по формуле:

$$\text{Ед/л} = 1158 \times \text{ДЕ} / \text{мин}$$

Определение α-амилазы

Набор реагентов для определения активности α-амилазы в биологических жидкостях энзиматическим кинетическим методом, рекомендации ГРСС, (стабилизированные растворы).

Принцип метода:

Под действием фермента α-амилазы синтетический субстрат ЕР8 [4,6-эгилиден (С₇)-/-нитрофенил-(С₁)-аД)-мальтогептаозид] гидролизуетс я с образованием нитрофенилмальто-зидов, которые подвергаются дальнейшему расщеплению α-глюкозидазой до глюкозы (С) и окрашенного продукта реакции /"-нитрофенола (р-№). Скорость нарастания концентрации /7-нитрофенола в ходе второй реакции определяется по увеличению оптической плотности реакционной среды при 405 нм и пропорциональна активности α-амилазы.

Исследуемый материал:

Свежая сыворотка или гепаринизированная плазма крови без следов гемолиза, моча. Для сбора суточной мочи необходимо довести рН мочи до щелочных пределов. Активность фермента в исследуемом материале сохраняется 5 дней при 2 - 8°C.

Состав набора: Реагент № 1. Буфер Реагент № 2. Субстрат

Подготовка реагентов к процедуре анализа и их стабильность:

Перед проведением анализа смешайте необходимые количества реагентов № 1 и № 2 в соотношении 4:1. Рабочий реагент стабилен при температуре 2~8°C в защищенном от света месте в плотно закрытом флаконе 14 дней. Тщательно закрывайте флаконы с реагентами после каждого использования.

Реагенты № 1 и № 2 готовы к применению. Срок хранения 6 месяцев при температуре 2-8°C.

Процедура анализа:

Исследование проводите непосредственно в термостатируемой фотометрической кювете с длиной оптического пути 1 см при длине волны 405 нм против воздуха.

Смешайте 0,04 мл сыворотки или плазмы и 1 мл рабочего реагента; соотношение образец/реагент 1:25.

Для исследования мочи смешайте 0,02 мл мочи и 1 мл рабочего реагента; соотношение образец/реагент 1:50.

Через 2 минуты начните считывание величины экстинкции с интервалом в 1 минуту в течение 3 минут. Вычислите среднее изменение экстинкции за 1 минуту (АЕ/мин).

Автоматические анализаторы:

Длина волны	405 нм
Измерение против	Воздуха
Метод измерения	Кинетика
Изменение оптической плотности	Увеличивается
Температура	37°C
Соотношение образец сыворотки/реагент	1:25 1:50
Соотношение образец мочи/реагент	
Время преинкубации	120 секунд
Время реакции	60 секунд
Верхний предел абсорбции контрольной пробы Фактор	0.500 А 3141*
Линейность	5-1640 МЕ/л

Если ДЕ/мин превышает 0,500/мин при длине волны 405 нм разведите исследуемый образец в 10 раз физиологическим раствором и повторите анализ; результат умножьте на 10.

Определение аминотрансферазы.

Набор реактивов для приготовления 1200 мл рабочих растворов для определения каталитической концентрации аминотрансферазы АсАТ и АлАТ в сыворотке крови. Объем достаточен для 180 анализов.

Принцип метода

Аланин-аминотрансфераза (1-аланин: 2-оксоглутарат аминотрансфераза) катализирует реакцию между аланином и 2-оксоглутаратом, в результате которой они превращаются в -глутамат и соль пировиноградной кислоты. Определение основано на измерении оптической концентрации гидразонов 2-оксоглутаровой и пировиноградной кислот в щелочной среде. Гидразон пировиноградной кислоты обладает более высокой оптической плотностью.

Реактивы

1. Эталонный раствор (3 мл) натрий пировинограднокислый 2 ммоль/л
2. 2,4-динитрофенилгидразин (100 мл) раствор 1 ммоль/л в HCL 1 моль/л
3. Натрий гидроокись (1 флакон)

4. Субстрат АсАТ (50 мл) фосфатный буфер 0,1 моль/л, аспартат 0,2 моль/л, 2-оксоглутарат 2 ммоль/л

5 Субстрат АлАТ (50 мл) фосфатный буфер 0,1 моль/л, ЭБ-альфа-аланин 0,2 моль/л, 2-оксоглутарат 2 ммоль/л

Состав инкубационной смеси

Аминотрансфераза АсАТ

Фосфатный буфер рН 7,4 (25 °С) и аспартат 2-оксоглутарат

Соотношение сыворотка крови/инкубационная смесь

Аминотрансфераза АлАТ

Фосфатный буфер рН 7,4 (25 °С) альфа-аланин 2-оксоглутарат

Соотношение сыворотка крови/инкубационная смесь

Референтные величины

АсАТ, АлАТ (мккат/л) Предельные величины Приведены* диапазон референтных значений является ориентировочным. Рекомендуются каждой лаборатории вычислять свои диапазоны нормальных величин.

Воспроизводимость

Около! 8%

Вспомогательный реактив (не входит в состав набора)

Физиологический раствор

Приготавливают растворением 0,9 г хлорида натрия в 100 мл дистиллированной воды.

Приготовление рабочего раствора Раствор гидроокиси натрия

В мерной колбе вместимостью 1000 мл растворяют в дистиллированной воде содержимое флакона с Реактивом 3. Устойчивость: раствор устойчив.

Проведение анализа

Длина волны (500-530) нм, кювета .1 см, температура инкубации (37±0,1)°С.

Реактив 4 и 5 перед анализом нагревают до (37 ±0,1)°С.

83,0 ммоль/л

83,0 ммоль/л

1,7 ммоль/л

1/6

83,0 ммоль/л

166,0 ммоль/л

1,7 ммоль/л

1/6

0,06-0,14 0,42

Отмерить(мл)	Проба	Контрольный раствор
Реактив 4 или 5 Физиологический раствор	0,25	0,25 0,05
Предварительно инкубируют в течение 3 мин при 37 °С		
Сыворотка крови	0,05	-
Инкубируют точно 60 мин при 37 °С		
Реактив 2	0,25	0,25
Перемешивают и оставляют стоять 20 мин при температуре (с +15 до +25) °С		
Раствор NaOH	2,50	2,50
Перемешивают и спустя 10 мин измеряют оптическую плотность пробы против контрольного раствора (А) для АсАТ при (В) для АлАТ.		

Калибровка

В обозначенные пробирки вносят пипеткой отдельные растворы в вышеприведенном порядке. После добавления Реактива 2 содержимое пробирок

перемешивают и спустя 20 мин добавляют раствор NaOH. Через 10 мин измеряют оптическую плотность раствора № 2-5 против раствора № 1.

Строят калибровочный график зависимости оптической плотности от кат. концентрации соответствующего фермента АсАТ или АлАТ.

Расчет

По оптической плотности пробы (А) или (В) на соответствующем калибровочном графике находят кат. концентрацию АсАТ или АлАТ в сыворотке крови.

Предупреждение

Пробы сыворотки крови можно хранить даже неделю при (с +2 до +8)°С. При кат. концентрации ферментов свыше 0,56 мккат/л анализ следует повторить с сывороткой, разведенной физиологическим раствором (результат х разведение).

При кат. концентрации фермента	Разведение
(0,56 - 0,70) (0,70 - 0,80) (0,80-1,00) (1,00-1,20) Лай0а 1,20	3х 5х 10х 30х 50х

Повышенное содержание кетовеществ вызывает завышение активности ферментов АсАТ и АлАТ. В таких случаях необходимо вычесть из оптической плотности пробы (А) или (В) оптическую плотность сывороточного контрольного раствора. Сывороточный контрольный раствор приготавливают точно так же, как пробу, с той лишь разницей, что сыворотку добавляют в пробирку после Реактива 2. Гемолиз повышает кат. концентрацию ферментов АсАТ и АлАТ. Снижение результатов вызывают синтетические моющие средства (сапунаты).

Оформление работы: Записать значение полученные на приборе и сравнить с нормой, так же записать значение каждого фермента в организме животного.

2.9 Лабораторная работа №9(2часа).

Тема: **Биохимия мочи: общий белок, сахар, кетоновые тела, нитриты, рН, билирубин, лейкоциты.**

2.9.1 Цель работы: изучить количественный метод исследования мочи и научиться работать на приборе.

2.9.2 Задачи работы:

1. Изучить прибор анализатор мочи.
2. Интерпретация полученных результатов.

2.9.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

1. Анализатор мочи.

2.9.4 Описание (ход) работы:

Работа на анализаторе. Включите питание прибора. Прибор включится и перейдет в режим самодиагностики. После прибор перейдет в режим готовности к работе. Опустите тест-полоску в образец на 2 секунды. Достаньте её, просушите на фильтровальной бумаге и положите в держатель. Положите тест-полоску во вход держателя тест-полоски. Затем вы услышите звуковой сигнал и начнётся измерение. На мониторе отобразится «Testing is going on». На таймере с левой стороны будет отображаться время. Когда на таймере будет 0, отобразиться результат тестов. Затем держатель тест-полоски выйдет в исходную позицию, и прибор вернётся в состояние готовности, но на экране будут отражаться результаты. Удалите использованную тест-полоску. Затем вы можете выполнить новый анализ.

Оформление работы. Исследуемые результаты мочи записать в таблицу и сравнить с нормами.

2.10 Лабораторная работа №10 (2 часа).

Тема: **Определение гормонов T_3 , T_4 , ТТГ для диагностики гипотиреоза в организме животных.**

2.10.1 Цель работы: изучить основные гормоны щитовидной железы и метод их определения.

2.10.2 Задачи работы:

1. Изучить прибор Пикон
2. Гормоны их нормы в крови животных.

2.10.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

1. Иммуноферментный анализатор Пикон.
2. Сыворотка крови.

2.10.4 Описание (ход) работы:

Инструкция по применению набора реагентов для иммуноферментного определения трийодтиронина в сыворотке (плазме) крови « T_3 – ИФА».

Определение трийодтиронина основано на использовании конкурентного иммуноферментного анализа. На внутренней поверхности лунок планшета иммобилизованы кроличьи поликлональные антитела к T_3 . Трийодтиронин из образца конкурирует с конъюгированным T_3 за связывание с антителами на поверхности лунки. В результате образуется связанный с пластиком «сэндвич», содержащий пероксидазу. Во время инкубации с раствором субстрата тетраметилбензидина (ТМБ) происходит окрашивание растворов в лунках. Интенсивность окраски обратно пропорциональна концентрации трийодтиронина в исследуемом образце. Концентрацию трийодтиронина в исследуемых образцах определяют по калибровочному графику зависимости оптической плотности от содержания трийодтиронина в калибровочных пробах.

Инструкция по применению набора реагентов для иммуноферментного определения тироксина в сыворотке (плазме) крови « T_4 – ИФА».

Определение T_4 основано на использовании конкурентного иммуноферментного анализа. На внутренней поверхности лунок планшета иммобилизованы мышинные моноклональные антитела к T_4 . Во время инкубации T_4 из образца конкурирует с конъюгированным T_4 за связывание с антителами на поверхности лунки. в результате образуется связанный с пластиком «сэндвич», содержащий пероксидазу. Во время инкубации с раствором субстрата тетриметилбензидина (ТМБ) происходит окрашивание растворов в лунках. Интенсивность окраски обратно пропорциональна концентрации T_4 в исследуемом образце. Концентрацию T_4 в исследуемых образцах определяют по калибровочному графику зависимости оптической плотности от содержания T_4 в калибровочных пробах.

Инструкция по применению набора реагентов для иммуноферментного определения тиреотропного гормона в сыворотке (плазме) крови «ТТГ – ИФА»

Определение тиреотропного гормона основано на использовании «сэндвич» - варианта твердофазного иммуноферментного анализа. На внутренней поверхности лунок планшета иммобилизованы мышинные моноклональные антитела к бета-цепи ТТГ человека. В лунках планшета при добавлении исследуемого образца, происходит связывание ТТГ, содержащегося в исследуемом образце, с антителами на твердой фазе. Образовавшийся комплекс выявляют с помощью конъюгата фрагмента мышинных моноклональных антител к бета-цепи ТТГ с пероксидазой. В результате образуется связанный с пластиком «сэндвич», содержащий пероксидазу. Во время инкубации с раствором субстрата тетраметилбензидина (ТМБ) происходит окрашивание растворов в лунках. Интенсивность окраски прямо пропорциональна концентрации тиреотропного гормона в исследуемом образце. Концентрацию тиреотропного гормона в исследуемых

образцах определяют по калибровочному графику зависимости оптической плотности от содержания тиреотропного гормона в калибровочных пробах.

Оформление работы. Рассчитать количество гормонов в сыворотке крови, сравнить ее с нормой и сделать вывод.