

**НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУРСІВ І
ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ**

Факультет ветеринарної медицини

Кафедра біохімії і фізіології тварин ім. акад. М.Ф. Гулого

**Методичні вказівки для викладання
лабораторних занять
з дисципліни**

“ВЕТЕРИНАРНА КЛІНІЧНА БІОХІМІЯ”

Київ 2018

УДК 577.1:636:612.015

Методичні вказівки для викладання лабораторних занять містять методи клініко-біохімічних досліджень біологічного матеріалу тварин; клініко-діагностичне значення біохімічних показників, які найбільш часто використовуються у лабораторній діагностиці. Викладений матеріал дозволить студентам набути навичок лабораторного визначення комплексу біохімічних показників, які характеризують стан обміну речовин в організмі хворих тварин.

Рекомендовано вченою радою факультету ветеринарної медицини протокол № 7 від 8 травня 2018 року.

Укладачі: В.А. Томчук, В.А. Грищенко, В.І. Цвіліховський

Рецензенти: Мельник О.П., Арнаута О.В.

Навчальне видання

**Методичні вказівки для викладання
лабораторних занять
з дисципліни**

“ВЕТЕРИНАРНА КЛІНІЧНА БІОХІМІЯ ”

Укладачі: ТОМЧУК Віктор Анатолійович
ГРИЩЕНКО Вікторія Анатоліївна
ЦВІЛІХОВСЬКИЙ Валерій Іванович

Відповідальний за випуск: В.А. Томчук

Зав. видавничим центром
Редактор

Підписано до друку Формат 60x84 1/16.
Ум. друк. арк. 4,6. Обл.-вид. арк 1,7
Тираж 100 Зам. №

Видавничий центр НУБіП України.
03041 Київ, вул. Героїв оборони, 15

ПРАВИЛА РОБОТИ В БІОХІМІЧНІЙ ЛАБОРАТОРІЇ ТА ІНСТРУКЦІЯ З ТЕХНІКИ БЕЗПЕКИ

Робота в біохімічній лабораторії може нести певну небезпеку для виконавців. Для уникнення нещасних випадків, слід виконувати правила роботи в біохімічній лабораторії та інструкцію з техніки безпеки.

- Не дозволяється приступати до виконання лабораторної роботи не освоївши детально техніку її виконання. Не дозволяється також виконувати процедури, які не описані в роботі.
- Роботи виконуються у спеціальному одязі (халат, шапочка), на своєму робочому місці або під витяжною шафою, у випадку використання токсичних, ароматичних або вогненебезпечних речовин.
- В процесі роботи необхідно дотримуватися тиші, чистоти й акуратності, слідкувати, щоб речовини не потрапляли на шкіру лица і рук, так як більшість сполук викликають подразнення шкіри і слизових оболонок.
- Ніякі речовини в лабораторії не можна пробувати на смак. Нюхати речовини можна, лише обережно направляючи на себе пари або газу легким рухом руки, а не нахланятися над посудиною і вдихати на повні груди.
- На будь-якій посуді, де зберігаються реактиви, повинні бути етикетки з указаними назвами речовин.
- Категорично заборонено зтягувати ротом у скляні піпетки хімічні рідини. Для цього необхідно користуватись спеціальними гумовими “грушами”.
- Під час нагрівання рідких і твердих речовин в пробірках і колбах не можна направляти їх отвори на себе і сусідів. Не можна також заглядати зверху у відкриту нагріваючу посудину для запобігання можливого ураження при викидї гарячої маси.
- При роботі на центрифугах слід пам’ятати про необхідність зрівноваження пробірок.
- Дотримуватись правил роботи та безпеки при роботі з електроприладами.
- При роботі з кислотами, лугами, металевою ртуттю слід пам’ятати, що відпрацьовані речовини слід знешкоджувати і не зливати у каналізаційні труби.
- У лабораторії заборонено приймати їжу, пити воду, палити.
- У разі нещасного випадку негайно повідомити викладача та скористатися аптечкою першої допомоги.
- Після завершення дослідів необхідно привести робоче місце та посуд у належний стан, вимкнути прилади, світло, воду.

З інструкцією ознайомився студент _____ курсу _____ групи, факультету ветеринарної медицини

(П.І.Б.)

(підпис)

НАДАННЯ ПЕРШОЇ ДОЛІКАРСЬКОЇ ДОПОМОГИ В БІОХІМІЧНІЙ ЛАБОРАТОРІЇ

1. Для попередження отруєнь при потраплянні на шкіру ароматичних аміно- і нітросполук потрібно забруднену ділянку тіла ретельно обмити теплою водою, а потім обробити 2 % розчином оцтової кислоти.
2. При термічних опіках уражене місце слід змочити етиловим спиртом або 3-5 % розчином перманганату калію, потім змастити маззю від опіків або 3-5 % розчином свіжоприготовленого таніну.
3. Якщо загорівся одяг, спочатку слід погасити полум'я, накинувши вовняну ковдру або іншим засобом, потім зняти з потерпілого одяг і викликати лікаря. При важких опіках допомога надається тільки медичним персоналом.
4. При хімічних опіках необхідно видалити з шкіри речовину, яка викликала опік, відповідним розчином.
 - При попаданні кислоти або лугу на поверхню шкіри потрібно негайно ретельно промити це місце струменем води з водопровідного крану, а потім, якщо потрапила кислота, обробити уражене місце 2 % розчином гідрокарбонату натрію або 1 % розчином аміаку, а якщо потрапив луг – 1 % розчином лимонної або оцтової кислоти і накласти суху пов'язку.
 - При великих площах опіку шкіри необхідно обмити уражені місця водою і терміново викликати медичну допомогу.
5. При попаданні кислоти або лугу в око потрібно негайно і ретельно промити його водою, а потім 2 % розчином гідрокарбонату натрію, якщо потрапила кислота, або 2 % розчином борної кислоти, якщо потрапив луг.
6. При порізах не торкатися до рани руками або сторонніми предметами, не промивати рану водою і незнайомими ліками. Шкіру навколо рани змастити йодом, накласти стерильну пов'язку і забинтувати.
7. При ураженні електричним струмом потерпілому надається перша медична допомога і викликається обов'язково лікар незалежно від стану потерпілого.
 - Якщо немає можливості негайно викликати лікаря, потерпілого необхідно негайно доставити до лікувального закладу.
 - Якщо потерпілий є при свідомості, але до цього був у непритомному стані, його необхідно покласти в зручну позу (підстелити під нього і накрити зверху чимось з одягу) і до прибуття лікаря забезпечити цілковитий спокій, постійно спостерігаючи за диханням і пульсом. Ні в якому разі не можна дозволяти потерпілому рухатися.
 - Якщо потерпілий знепритомнів, але зберігає стійке дихання і пульс, його необхідно рівно і зручно укласти, розв'язати і розстебнути одяг, створити приплив свіжого повітря, давати нюхати нашатирний спирт, збризнути водою і забезпечити цілковитий спокій.
 - Якщо потерпілий дихає рідко й судорожно, йому потрібно робити штучне дихання й масаж серця.
 - При відсутності у потерпілого ознак життя (дихання і пульсу) йому роблять штучне дихання і закритий (непрямий) масаж серця.

**ТЕМА 1. ПІДГОТОВКА БІОЛОГІЧНОГО МАТЕРІАЛУ ДЛЯ КЛІНІКО-
БІОХІМІЧНОГО ДОСЛІДЖЕННЯ.
ЛАБОРАТОРНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ ШЛУНКОВОГО СОКУ**

Завдання 1. Одержання плазми крові

Плазма – це рідка частина крові, що звільнена від формених елементів. Її одержують центрифугуванням чи відстоюванням стабілізованої крові. Отримання плазми крові зв'язано з необхідністю застосування антикоагулянтних речовин: гепарину, оксалатів, цитратів і фторидів натрію чи калію.

Хід роботи. Стабілізовану антикоагулянтом кров наливають у центрифужні пробірки, врівноважують і центрифугують протягом 15-20 хв. при 1500 – 3000 об/хв.

Види антикоагулянтів

Антикоагулянт	Кількість антикоагулянту (на 15-20 мл крові)
Натрію цитрат, мг	30
Натрію оксалат, мг	15
Калію оксалат, мг	15
5 % розчин натрію цитрату, мл	1
20 % розчин калію або натрію оксалату, мл	0,3-0,5
10 % розчин натрію фториду, мл	0,3-0,5
10 % розчин трилону Б, краплі	4
0,5 % розчин гепарину, мл	0,2

Потім обережно відбирають надосадову рідину (плазму), не чіпаючи щільного осаду, переносять у суху пробірку. Підготовлена плазма крові використовується для проведення біохімічних досліджень.

Висновок: _____

Завдання 2. Одержання сироватки крові

Сироватка крові – це дефібринована плазма. Її отримують із нативної крові без використання антикоагулянту, що супроводжується утворенням кров'яного згустку. Зсідання крові зв'язано з перетворенням розчинного білка плазми фібриногену у нерозчинний білок фібрин. У цьому разі від молекули фібриногену за допомогою ферменту тромбіну відщеплюється чотири пептиди і утворюється фібрин, котрий полімеризується у вигляді довгих тонких ниток. Нитки фібрину утворюють сітку, в якій затримуються клітини крові.

Процес одержання сироватки крові можливо прискорити шляхом центрифугування нативної крові.

Хід роботи. Отримують сироватку з венозної крові, яку відбирають у суху пробірку. При кімнатній температурі кров звертається протягом 5-11 хвилин і при подальшому відстоюванні розшаровується. З неї випадає фібриновий згусток, який має червоний колір, що надають формені елементи крові. Зверху згустку збирається сироватка, котра в нормі має світло-солом'яний колір. Цей процес у лабораторії прискорюють відстоюванням нативної крові (без антикоагулянту) у термостаті при температурі 37-38⁰С протягом 1-2 годин або центрифугуванням пробірок з кров'ю.

Висновок: _____

Завдання 3. Визначення загальної кислотності, вмісту вільної соляної кислоти та зв'язаної соляної кислоти в одній порції шлункового соку

Шлунковий сік – майже безбарвна, злегка опалесцентна (каламутна), сильноокисла багатокомпонентна рідина, яку виробляють залози шлунку для забезпечення процесу травлення. Шлунковий сік має кислу реакцію (рН 1,5 – 2,5), кількість води становить 99-99,5 %, твердий залишок 0,5 – 1 %, питома густина 1,002 – 1,007 г/см³.

Основним неорганічним компонентом шлункового соку є соляна кислота у вільному та зв'язаному з білками стані. Також до складу входять хлориди, фосфати, сульфати, карбонати натрію, кальцію, калію та ін.

Серед органічних сполук – білки, муцин (слиз), лізоцим, ферменти пепсин і ренін, продукти метаболізму.

Соляна кислота активує ферменти, полегшує розщеплення білків, викликаючи їх денатурацію та набухання, обумовлює бактерицидні властивості шлункового соку (гальмує гнильні процеси), стимулює виділення гормонів кишечника. За порушень функції шлунку вміст соляної кислоти у шлунковому соку може збільшуватися або зменшуватися аж до її повної відсутності (ахілії).

При визначенні кислотності шлункового соку розрізняють такі форми: загальну кислотність, вільну соляну кислоту, зв'язану соляну кислоту і загальну соляну кислоту.

Загальну кислотність (титраційні одиниці, титр. од.) вимірюють у мілілітрах 0,1 н. розчину NaOH, витраченого на нейтралізацію 100 мл шлункового соку за присутності індикатору фенолфталеїну (інтервал переходу рН 8,2 – 10; за рН нижче від 8,2 – безбарвний, вище ніж 10 - рожевий).

Вільну соляну кислоту у шлунковому соку вимірюють у мілілітрах 0,1 н. розчину NaOH, витраченого на нейтралізацію шлункового соку за присутності індикатора 2,4-диметиламіноазобензолу (інтервал переходу рН 2,9 – 4; за рН нижче ніж 2,9 – рожево-червоний; вище ніж 4 – жовтий).

Зв'язана соляна кислота перебуває у солеподібному стані, вона зв'язана з білками й продуктами їх перетворення.

Загальна соляна кислота – це сума вільної і зв'язаної соляної кислоти. Визначають загальну кислотність, вміст загальної, вільної і зв'язаної соляної кислоти в одній порції шлункового соку титруванням з використанням двох індикаторів: 2,4 – диметиламіноазобензолу і фенолфталеїну з різними зонами переходу забарвлення.

Хід роботи. Відміряють піпеткою в колбу 10 мл профільтрованого шлункового соку. Додають 1-2 краплі 2,4-диметиламіноазобензолу і 2 краплі фенолфталеїну. Титрують 0,1 н. розчином натрію гідроксиду до жовтувато-червоного забарвлення (колір сьомги) (перший пункт, рН=2,9). Далі продовжують титрування до виникнення лимонно-жовтого кольору (другий пункт, рН=4,0). У разі подальшого титрування колір шлункового соку змінюється на рожевий (третій пункт, рН=8,0).

Перший пункт відповідає вільній соляній кислоті, оскільки при рН=2,9 відтитровується соляна кислота (майже 99%). Середнє арифметичне між другим і третім пунктами титрування вважають таким, що відповідає загальній соляній

кислоті. Третій пункт свідчить про загальну кислотність шлункового соку. Далі перераховують отримані цифри на 100 мл шлункового соку.

Приклад. Припустимо, що на титрування шлункового соку від початку витрачено 0,1н. розчину натрію гідроксиду:

до першого титрування – 4,1 мл;

до другого – 4,44 мл;

до третього – 6,36 мл.

Середнє арифметичне між другим і третім пунктом $\frac{4,44 + 6,36}{2} = 5,40$

Отже, вільна соляна кислота становить $4,1 \times 10 = 41$ титр.од,

загальна соляна кислота становить $5,4 \times 10 = 54$ титр.од,

зв'язана соляна кислота $54 - 41 = 13$ титр.од, і відповідно

загальна кислотність $6,36 \times 10 = 63,6$ титр. од.

Власні розрахунки:

Середнє арифметичне між другим і третім пунктом

Отже, вільна соляна кислота становить _____ титр.од

загальна соляна кислота становить _____ титр.од

зв'язана соляна кислота _____ титр.од

загальна кислотність _____ титр. од.

Висновок: _____

Норма для коней (титр. од.): загальна кислотність – 24-36; вільна соляна кислота – 20-28; зв'язана соляна кислота – 8-12.

Роботу прийнято _____ (підпис викладача)

Для записів

ТЕМА 2. ВИЗНАЧЕННЯ КОНЦЕНТРАЦІЇ ЗАГАЛЬНОГО БІЛКА ТА БІЛКОВИХ ФРАКЦІЙ КРОВІ, ІНТЕРПРЕТАЦІЯ ЇХ ЗМІН

Завдання 1. Визначення вмісту загального білка у сироватці крові (біуретова реакція)

Принцип методу. Білки реагують у лужному середовищі з міддю сірчанокислою з утворенням сполук, які мають фіолетове забарвлення.

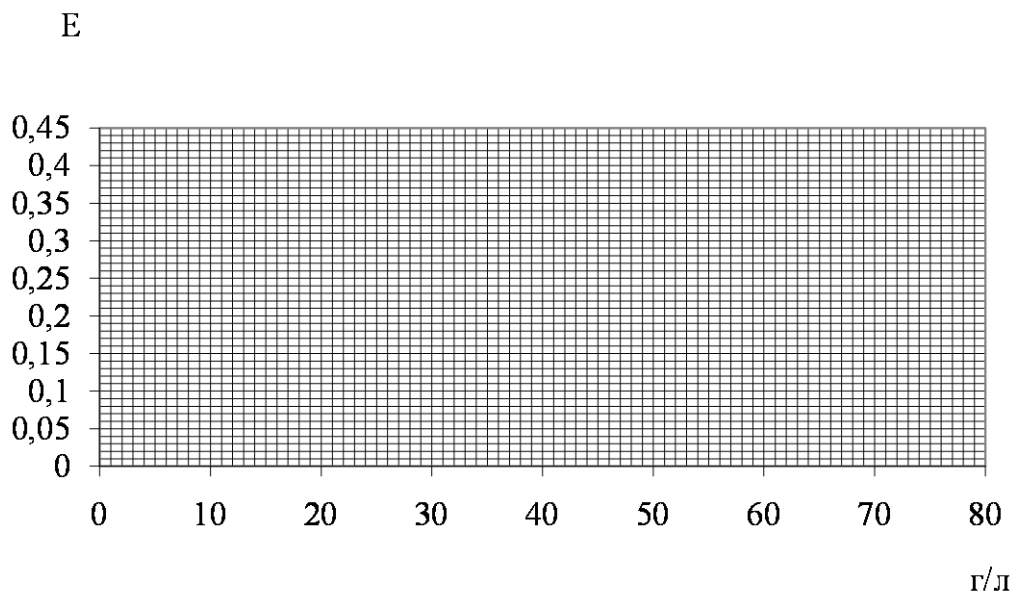
Хід роботи. До 0,1 мл сироватки крові додають 4,9 мл робочого розчину біуретового реактиву, перемішують уникаючи утворення піни.

Через 30 хвилин (не пізніше 1 години) вимірюють оптичну густину дослідної проби на ФЕК у кюветі з товщиною шару **10 мм** при довжині хвилі **540-560 нм** (зелений світлофільтр) відносно контролю.

Контроль. До 4,9 мл робочого розчину біуретового реактиву додають 0,1 мл 0,9% розчину натрію хлористого, витримують 30 хв.

Розрахунок проводять за калібрувальним графіком.

Калібрувальний графік для визначення концентрації загального білка за допомогою біуретового реактиву



Побудувати криву за даними, що наведені в таблиці.

Концентрація загального білка, г/л (бичий альбумін)	0	20,0	40,0	60,0	80,0
Екстинція (E)	0	0,1	0,2	0,3	0,4

Висновок: _____

Норма, г/л: велика рогата худоба – 72-86; вівці – 65-75; свині – 70-85; коні – 60-80; кури – 43-60; собаки – 54-84; коти – 54-82.

Клініко-діагностичне значення: Серед патологічних змін вмісту загального білка сироватки крові можуть зустрічатись:

гіпопротеїнемія — зниження концентрації загального білка;

гіперпротеїнемія — підвищення концентрації загального білка.

Гіпопротеїнемія спостерігається при нефротичному синдромі, ентериті, хронічному панкреатиті, екземах, масивних крововтратах, при затримці води в результаті серцевої декомпенсації, значних втратах білка з сечею при нефритах, тривалому перебігу запальних захворювань та кахексії.

Гіперпротеїнемія відмічається рідко, наприклад, при хронічних запальних захворюваннях, які супроводжуються дегідратацією організму (діарея, блювання). В патології білків плазми крові прийнято розрізняти наступні стани: **диспротеїнемію, дефектопротеїнемію та парап протеїнемію.**

Завдання 2. Визначення концентрації альбуміну у сироватці крові

Принцип методу. Альбумін утворює в слабкокислому середовищі з індикатором бромкрезоловим зеленим у присутності детергенту забарвлений комплекс, інтенсивність забарвлення якого пропорційна концентрації альбуміну.

Хід роботи. Дослідна проба: 0,02 мл сироватки або плазми крові ретельно перемішують, уникаючи утворення піни, з 2,0 мл робочого розчину індикатору, витримують 5 хв. та фотометрують у кюветі з товщиною робочого шару **5 мм** при довжині хвилі **620-630 нм** відносно холостої проби.

Холосту пробу ставлять як дослідну, але замість сироватки використовують 0,02 мл дистильованої води.

Калібрувальну пробу готують як дослідну, але замість сироватки використовують 0,02 мл калібрувального розчину альбуміну.

Для записів

ТЕМА 3. ПРОТЕЇНУРІЯ, ЯКІСНІ РЕАКЦІЇ НА ВИЗНАЧЕННЯ БІЛКА В СЕЧІ

З метою визначення білка в сечі застосовують якісні і кількісні проби.

Принцип методів. Під впливом фізичних і хімічних факторів молекули білка у біологічних рідинах агрегують між собою і стають нерозчинними. Агрегація поліпептидних молекул виникає внаслідок їх денатурації та зміни електричного заряду.

Завдання 1. Проба кип'ятінням

Хід роботи. В пробірку наливають 5 мл профільтрованої сечі, додають кілька крапель 10 % розчину оцтової кислоти (при кислій сечі не треба), легко збовтують і підігрівають до кипіння. Поява опалесценції або пластівчастого осаду вказує на наявність білка в сечі. Чутливість проби 1 : 40000.

Висновок: _____

Завдання 2. Проба з сульфосаліциловою кислотою (Роша і Вільяма)

Хід роботи. В пробірку наливають 3-4 мл профільтрованої сечі і додають 3-5 крапель 20 % розчину сульфосаліцилової кислоти. При наявності білка в сечі спостерігається опалесценція або з'являється білий пластівчастий осад.

Висновок: _____

Завдання 3. Проба з азотною кислотою (Геллера)

Хід роботи. В пробірку наливають 2-3 мл профільтрованої сечі, потім додають піпеткою 1-2 мл 50 % розчину азотної кислоти. Якщо в сечі є білок, то на межі рідин з'являється біле кільце (при вмісті білка 0,0033 г/л воно з'являється через 3 хв). Чутливість проби 1 : 60000.

Висновок: _____

Завдання 4. Кількісна проба з сульфосаліциловою кислотою

Хід роботи: В пробірку наливають 1,25 мл прозорої сечі і додають 5 мл 3 % розчину сульфосаліцилової кислоти. Через 5 хв визначають оптичну густину проби в кюветах з робочою шириною **5 мм** при довжині хвилі **650-590 нм** (оранжевий, червоний світлофільтр) проти контролю.

Приготування контролю: у центрифужну пробірку наливають 1,25 мл 0,9 % натрію хлориду і додають до нього 5 мл 3 % розчину сульфосаліцилової кислоти. Оптичну густину вимірюють при тих самих умовах, що і дослідні проби. З оптичної густини досліду віднімають оптичну густину контролю. Розрахунок проводять за калібрувальним графіком, який будують на основі розведення стандартного альбуміну в 0,9 % розчині натрію хлориду з концентрацією 5, 10, 50, 100 мг у 100 мл розчину. З кожного стандартного розведення беруть 1,25 мл і обробляють як дослідні проби. Калібрувальний графік на сторінці 10 даного зошити.

Висновок: _____

Завдання 5. Експрес-метод визначення білка в сечі діагностичними смужками

Проводиться за допомогою діагностичних смужок типу "Біоскан" (Росія), АльбуФАН, Penta-Phan (Ла-Хема, Чехія).

Принцип методу ґрунтується на зміні кольору кислотно-основного індикатора під впливом білків. Діагностичну смужку необхідно занурити в свіжу сечу і не пізніше 1 хв порівняти її забарвлення з відповідною кольоровою шкалою на тубусі. Результат виражається в грамах білка на 1 л сечі.

Клініко-діагностичне значення. Появу білка в сечі називають **протеїнурією**. Розрізняють дві категорії патологічних станів: позаниркові (неренальні) і ниркові (ренальні).

При **позаниркових протеїнуріях** білок до сечі домішується за ходом сечовивідних шляхів (при уроциститі, уретриті, пієлонефриті, запаленні статевих органів).

При **ниркових протеїнуріях** білок у сечу надходить з нирок. Ниркові протеїнурії бувають функціонального і органічного походження.

Функціональні протеїнурії виникають внаслідок порушення проникливості капілярів клубочків. Їх відмічають у корів до і після родів, а у новонароджених тварин протягом перших трьох діб життя.

Органічні протеїнурії спостерігають при захворюваннях нирок, які характеризуються ураженням їх паренхіми і збільшенням проникливості капілярів клубочків (при гломерулонефриті, нефрозі, застійних явищах, інтоксикації, часто при інфекційних захворюваннях – миті, інфекційній анемії коней, чумі собак).

Роботу прийнято _____ (підпис викладача)

Для записів

ТЕМА 4. НЕБІЛКОВІ АЗОТИСТІ КОМПОНЕНТИ КРОВІ**Завдання 1. Визначення концентрації сечовини у біологічних рідинах**

Принцип методу. Сечовина утворює з діацетилмоноксимом у присутності іонів Fe^{3+} і тіосемикарбазиду комплекс червоного кольору, за інтенсивністю забарвлення якого визначають її концентрацію.

Хід роботи. У пробірки відміряють (відповідно до таблиці) розчини діацетилмоноксиму, плазму (сироватку) крові, фізіологічний розчин та тіосемикарбазид.

Інгредієнти	Калібрувальна проба, мл	Дослідна проба, мл	Холоста проба, мл
Розчин діацетилмоноксиму	2,0	2,0	2,0
Плазма (сироватка) крові	-	0,02	-
Калібрувальний розчин	0,02	-	-
Фізіологічний розчин	-	-	0,02
Розчин тіосемикарбазиду	2,0	2,0	2,0

Пробірки закривають алюмінієвою фольгою, вміст перемішують і розміщують у киплячу водяну баню рівно на 10 хв. Потім пробірки швидко охолоджують у потоці водопровідної води. Вимірюють на фотоколориметрі в кюветі з товщиною оптичного шару **10 мм** відносно холостої проби при довжині хвилі **510-550 нм**.

Концентрацію сечовини розраховують за формулою

$$C = \frac{E_{\text{дос}}}{E_{\text{кал}}} \times 16,65 \text{ ммоль/л,}$$

де C – концентрація сечовини;

$E_{\text{дос}}$ – оптична густина дослідної проби;

$E_{\text{кал}}$ – оптична густина калібрувальної проби;

Власні розрахунки:

$$C = \quad = \quad \text{ммоль/л}$$

Висновок: _____

Норма, ммоль/л: велика рогата худоба – 7,14-10,7; вівці – 2,86-7,14; кози – 3,57-7,14; свині – 3,57-10,7; коні – 3,57-8,57; собаки – 2,1-9,5; коти – 5-10.

Клініко-діагностичне значення.

Підвищується концентрація сечовини в **сироватці крові** при гломерулонофриті, гломерулосклерозі, хронічному порушенні функції нирок, хронічній непрохідності сечових шляхів, при посиленому розпаді білків (злоякісні новоутворення, інтоксикації) та дегідратації організму.

Зменшується концентрація сечовини в **сироватці крові** при паренхіматозній жовтяниці, цирозі печінки.

Збільшується концентрація сечовини у **сечі** при гіпертиреозі, при згодуванні надмірної кількості білка та гарячкових станах.

Зменшується вміст сечовини в **сечі** при нирковій недостатності і при лікуванні анаболічними гормонами.

Завдання 2. Визначення креатиніну у сироватці крові

Принцип методу. Креатинін взаємодіє у лужному середовищі з пікриновою кислотою, утворюючи сполуку червоного кольору. Інтенсивність забарвлення отриманого розчину пропорційна концентрації креатиніну в пробі.

Хід роботи. Послідовність процедури визначення вмісту креатиніну наведена у таблиці.

Інгредієнти	Дослідна проба, мл	Калібрувальна проба, мл	Холоста проба, мл
Калібрувальний розчин креатиніну	–	0,5	–
Сироватка крові	0,5	–	–
Пікринова кислота	1,5	1,5	1,0

Перемішати, витримати **5 хв**, помістити на **15-20 с.** у киплячу водяну баню, потім центрифугувати.

Центрифугат	1,0	1,0	–
10% р-н NaOH	0,05	0,05	0,05

Ретельно перемішати. Якщо після підлучення реакційна суміш темніє, внаслідок випадіння фосфатів, тоді проби слід повторно центрифугувати.

Дистильована вода	1,45	1,45	1,45
-------------------	------	------	------

Витримують **10 хв** і колориметрують при довжині хвилі **500-560 нм**, у кюветі з товщиною шару **5 мм** відносно холостої проби.

Розрахунок проводять за формулами

$$C = \frac{E_{\text{дос}}}{E_{\text{кал}}} \times 10 = \text{мг/л}$$

або

$$C = \frac{E_{\text{дос}}}{E_{\text{кал}}} \times 88,4 = \text{мкмоль/л},$$

де 10 мг/л (88,4 мкмоль/л) вміст креатиніну у 1000 мл калібрувального розчину;

$E_{\text{дос}}$ – оптична густина дослідної проби;

$E_{\text{кал}}$ – оптична густина калібрувальної проби.

Власні розрахунки:

$$C = \quad = \quad \text{мг/л}$$

$$C = \quad = \quad \text{мкмоль/л}$$

Висновок: _____

Норма, мкмоль/л: велика рогата худоба – 88,4-177,0; вівці – 106,0-168,0; кози – 88,4-159,0; свині – 141,0-239,0; коні – 106,0-168,0; собаки – 44,2–132,6; коти – 44,2–132,6.

Клініко-діагностичне значення:

Підвищується рівень креатиніну у ***сироватці крові*** при гломерулонефриті, гломерулосклерозі, хронічній нирковій недостатності, закупорці сечових шляхів, кишковій непрохідності, діабеті, механічній жовтяниці, гіпофункції наднирників, голодуванні, м'язовій атрофії, гіпертиреозі.

Зниження рівня креатиніну в ***сироватці крові*** може мати місце при застосуванні адренокортикотропного гормону гіпофізу.

Збільшення вмісту креатиніну в ***сечі*** відмічається при посиленій м'язовій роботі, гарячкових станах, недостатності функцій печінки та гіпотиреозі.

Зниження креатиніну в ***сечі*** спостерігається при м'язовій атрофії, голодуванні, амілоїдозі нирок, лейкозі та уремії.

Роботу прийнято _____ (підпис викладача)

Для записів

ТЕМА 5. ПОРУШЕННЯ МЕТАБОЛІЗМУ ВУГЛЕВОДІВ І КЛІНІЧНЕ ЗНАЧЕННЯ ДОСЛІДЖЕННЯ ПОКАЗНИКІВ ВУГЛЕВОДНОГО ОБМІНУ

Завдання 1. Визначення глюкози у біологічних рідинах глюкозооксидазним методом

Принцип методу. Глюкоза у присутності глюкозооксидази окислюється киснем повітря до глюконової кислоти і водню перекису. Остання у присутності пероксидази вступає у реакцію з фенолом і 4-амінофеназоном з утворенням сполуки червоно-фіолетового кольору. Інтенсивність забарвлення, що визначається фотометрично, пропорційна кількості глюкози.

Хід роботи. Послідовність процедури визначення вмісту глюкози наведена у таблиці.

Інгредієнти	Холоста проба, мл	Калібрувальна проба, мл	Дослідна проба, мл
Калібрувальний розчин	–	0,05	–
Плазма крові	–	–	0,05
Робочий реактив	4,0	4,0	4,0
Дистильована вода	0,05	–	–

Проби ретельно перемішують і інкубують не менше 20 хв при 37°C або 30 хв при 15-25°C. Через 5-10 хв після початку інкубації пробірки інтенсивно струшують. Після закінчення інкубації вимірюють оптичну густину дослідних і калібрувальної проб при **490-540 нм** відносно робочого реактиву у **10 мм** кюветах.

Забарвлення проб стабільне протягом трьох годин після закінчення інкубації при умові запобігання дії прямих сонячних променів.

Розрахунок концентрації глюкози проводять за формулою

$$C = \frac{E_{\text{дос}}}{E_{\text{кал}}} \times 10,$$

де **C** – концентрація глюкози, ммоль/л;

E_{дос} – оптична густина дослідної проби;

E_{кал.} - оптична густина калібрувальної проби.

Власні розрахунки:

$$C = \quad = \quad \text{ммоль/л}$$

Висновок: _____

Норма, ммоль/л: велика рогата худоба – 2,5-3,3 (телята 4,4-4,7); вівці – 2,5-3,5; свині – 2,5-3,9; коні – 3,0-5,0; собаки – 3,3-4,5; коти – 3,3-4,5.

Клініко-діагностичне значення: В патології обміну глюкози ймовірні такі стани, як *гіперглікемія* й *гіпоглікемія*.

Гіперглікемія — означає збільшення концентрації глюкози в крові, порівняно з нормальним рівнем.

Гіпоглікемія — це падіння концентрації глюкози в крові нижче нормального рівня. Гіперглікемія може бути панкреатичного і позапанкреатичного (аліментарна, печінкова, гормональна, нервова) походження. Гіпоглікемія виникає за розвитку патології органів травлення, нирок, гіперінсулінемії.

Завдання 2. Кількісне визначення концентрації молочної кислоти в сироватці крові за методом Бюхнера

Молочна кислота в організмі тварин є кінцевим продуктом гліколізу і глікогенолізу – анаеробних процесів окиснення глюкози та глікогену. Значна кількість молочної кислоти утворюється в м'язах, надходить у кров, переноситься до серцевого м'яза та в печінку, де окиснюється і використовується як енергетичний матеріал.

Принцип методу. Молочна кислота внаслідок нагрівання з концентрованою сірчаною кислотою перетворюється на оцтовий альдегід, який у разі взаємодії з гідрохіноном утворює сполуку червоно-коричневого кольору. Кількість молочної кислоти визначають колориметрично.

Хід роботи. У дві сухі пробірки наливають по 6 мл дистильованої води. Потім у першу додають 1 мл стандартного розчину молочної кислоти, у другу – 1 мл сироватки крові. У кожену пробірку для осадження білків вливають по 1 мл 5 % розчину ортофосфорної кислоти, струшують та залишають на кілька хвилин, після чого відфільтровують. До фільтратів додають по 1 мл 10

% розчину міді сульфату та по 0,5 г кальцію гідроксиду. Проби перемішують скляними паличками, через 5 хв відфільтровують. Переносять по 1 мл фільтрату в пробірки з притертими корками, додають по 0,1 мл 10 % розчину міді сульфату та по 4 мл концентрованої сірчаної кислоти. Розміщають їх на киплячу водяну баню на 1,5 хв. Вносять по 0,1 мл 20 % розчину гідрохінону, добре перемішують і кип'ятять 15 хвилин. Пробірки охолоджують та колориметрують при довжині хвилі **590 нм** в кюветах на **5 мм**.

Концентрацію молочної кислоти розраховують за формулою:

$$C = \frac{C_{\text{ст}} \times E_{\text{досл}}}{E_{\text{ст}}},$$

де C – концентрація молочної кислоти в сироватці крові, ммоль/л; $C_{\text{ст}}$ – концентрація молочної кислоти в стандартному розчині – 19,98 ммоль/л; $E_{\text{ст}}$ – оптична густина стандартного розчину молочної кислоти; $E_{\text{досл}}$ – оптична густина дослідної проби.

Власні розрахунки:

$$C = \quad = \quad \text{ммоль/л}$$

Норма, ммоль/л: велика рогата худоба – 0,56-2,22; коні – 1,11-1,78; вівці – 1,0-1,33.

Висновок. _____

Клініко-діагностичне значення. Збільшення вмісту молочної кислоти може бути при інтенсивній м'язовій роботі за короткий проміжок часу без достатнього надходження кисню. При цьому не відбувається достатнє окисне декарбоксилювання пірувату до ацетил-КоА, а тільки утворення лактату. Останній може бути використаний у відновний період у разі достатнього надходження кисню. Спостерігають збільшення вмісту молочної кислоти при гострому гнійному запальному ураженні тканин, важкій анемії, тетанії, правці, гіпоксії, зв'язаній із серцевою та легеневою недостатністю, злоякісних но-

воутвореннях, захворюваннях печінки (гострому гепатиті, цирозі, цукровому діабеті, нирковій недостатності, гострому септичному ендокардиті та лейкозі.

Для більшості з вказаних станів (*лактатацидоз*) характерне збільшення співвідношення лактат/піруват, найчастіше становить **10 : 1**.

Завдання 3. Кількісне визначення концентрації піровиноградної кислоти в сечі колориметричним методом

Піровиноградна кислота – один із центральних метаболітів вуглеводного обміну. Визначення її кількості в плазмі крові та сечі широко використовують з діагностичною метою в клінічній практиці.

Принцип методу. Піровиноградна кислота з 2,4-динітрофенілгідразином (2,4-ДНФГ) у лужному середовищі утворює 2,4-динітрофенілгідразони піровиноградної кислоти коричнево-червоного забарвлення, інтенсивність якого пропорційна концентрації піровиноградної кислоти і визначається колориметрично.

Хід роботи. Беруть 2 пробірки, в одну наливають 0,1 мл сечі, у другу – 0,1 мл піровиноградно-кислого натрію, а потім в обидві пробірки додають по 0,9 мл дистильованої води. Після цього вміщують по 0,5 мл 0,1 % розчину 2,4-ДНФГ, змішують і на 20 хв ставлять у темне місце. Пізніше додають по 1 мл 12 % розчину натрію гідроксиду і через 10 хв колориметрують проти контролю (води) при довжині хвилі **440 нм** в **5 мм** кюветах.

Концентрацію піровиноградної кислоти вираховують за формулою:

$$C_{\text{досл}} = \frac{C_{\text{ст}} \times E_{\text{досл}}}{E_{\text{ст}}},$$

де $C_{\text{ст}}$ — концентрація стандартного розчину піровиноградної кислоти; $C_{\text{досл}}$ — концентрація піровиноградної кислоти в сечі, ммоль/л; $E_{\text{досл}}$ — оптична густина досліджуваної проби; $E_{\text{ст}}$ — оптична густина стандарту.

Норма, ммоль/л: велика рогата худоба – 54 ± 24 .

Висновок

Клініко-діагностичне значення. Вміст пірвіноградної кислоти у крові (разом з молочною кислотою) підвищується під час посиленої м'язової роботи, а також при деяких патологічних станах, що супроводжуються судомами (тетанія, правець). Збільшення виділення пірвіноградної кислоти із сечею спостерігається при В₁-гіповітамінозах, серцевій недостатності, токсикозах, захворюваннях печінки, інсулінозалежному цукровому діабеті, діабетичному кетоацидозі, дихальному алкалозі, уремії, а також після введення камфори, стрихніну і адреналіну. До збільшення вмісту пірвіноградної кислоти призводить токсична дія ацетилсаліцилової кислоти, отруєння ртуттю, арсеном і сурмою.

Вміст пірвіноградної кислоти різко підвищується у спинномозковій рідині при травматичних захворюваннях ЦНС, запальних процесах (менінгіт, абсцес мозку). Під впливом наркозу рівень пірвіноградної кислоти у крові дещо знижується. Усі фактори, які зумовлюють збільшення її концентрації, як правило, призводять до збільшення рівня молочної кислоти. Отже, основною причиною нагромадження в крові пірвіноградної та молочної кислот є порушення їх наступного ферментативного перетворення на звичайні продукти розпаду внаслідок різних причин.

Роботу прийнято _____ (підпис викладача)

Для записів

**ТЕМА 6. ГЛЮКОЗУРІЯ, ЯКІСНІ РЕАКЦІЇ НА ВИЯВЛЕННЯ ЦУКРУ
В СЕЧІ**

З різних цукрів у сечі тварин частіше виявляють глюкозу, тому наявність цукру в сечі називають глюкозурією. Для сечі здорових тварин вона не характерна.

Завдання. Виявлення цукру в сечі

Хід роботи. Реакції здійснюють після видалення білка з сечі, тому що він заважає (має редуруючі властивості) виявленню цукру. Для цього до 10-15 мл сечі додають 5-6 крапель 10 % оцтової кислоти і кип'ятять, а потім осад відфільтровують. У фільтраті сечі може бути в основному глюкоза або лактоза. Ці вуглеводи відновлюють оксиди важких металів у лужному середовищі, а в слабкокислому середовищі відновлює тільки глюкоза. Розрізнити їх можна за бродінням: глюкоза бродить, а лактоза — ні.

Висновок: _____

1. Проба Фелінга

У пробірку вміщують по 10 крапель 1 розчину Фелінга (міді сульфату) і II розчину (лужний розчин сегнетової солі), перемішують, додають 20 крапель сечі, нагрівають до кипіння.

За наявності глюкози в сечі випадає жовтий або червоний осад.

Висновок: _____

2. Проба Барфуда

До 2 мл сечі додають 1 мл реактиву Барфуда (міді ацетат розчинений в оцтової кислоті) і нагрівають на водяній бані протягом 5 хв. За наявності глюкози з'являється осад міді (I).

Ця окисно-відновна реакція відрізняється від інших (Троммера, Ніландера, Фелінга, Бенедикта, реакції срібного дзеркала) тим, що окиснення моносахаридів відбувається не в лужному середовищі, а в близькому до нейтрального. У цих умовах дисахариди, що мають відновні властивості (на відміну від моносахаридів) не окиснюються. Проба Барфуда з лактозою негативна.

Висновок: _____

Клініко-діагностичне значення.

Глюкозурія розвивається тоді, коли рівень цукру в крові піднімається вище від “цукрового порогу”. Вона буває при цукровому діабеті, аліментарній гіперглікемії, збудженні ЦНС, ураженні нирок та гіпертиреозі, а також у вагітних тварин і відразу після родів.

Роботу прийнято _____ (підпис викладача)

Для записів

**ТЕМА 7. ПОРУШЕННЯ МЕТАБОЛІЗМУ ЛІПІДІВ І КЛІНІЧНЕ
ЗНАЧЕННЯ ДОСЛІДЖЕННЯ ПОКАЗНИКІВ ЛІПІДНОГО ОБМІНУ****Завдання 1. Визначення загального холестерину за Ільком**

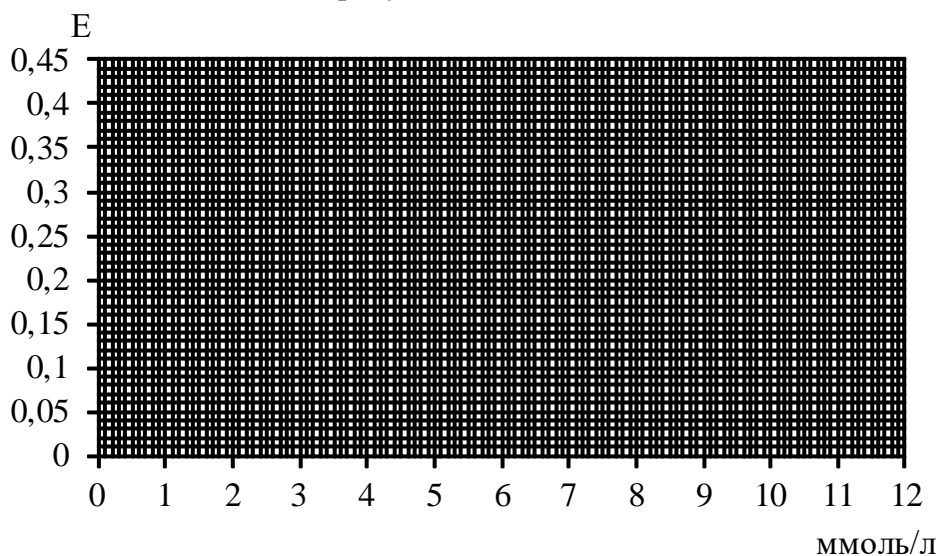
Принцип методу. В основі цього методу визначення лежить реакція Лібермана-Бурхарда, суть якої полягає в тому, що холестерин у присутності оцтового ангідриду і суміші оцтової та сірчаної кислот дає забарвлення смарагдово-зеленої сполуки. За інтенсивністю забарвлення розчину судять про кількість холестерину в ньому.

Хід роботи. До 4,2 мл реактивної суміші додають повільно по стінках пробірки 0,2 мл негемолізованої сироватки крові. Пробірку струшують 10-12 разів і розміщують у термостаті при температурі 37⁰С на 20 хв. Оптичну щільність рідини, забарвленої в зелений колір, вимірюють на ФЕК з червоним світлофільтром (**630-690 нм, 10 мм** кюветах) проти контрольної проби (реактивна суміш). Вміст холестерину визначають за калібрувальним графіком. Для побудови калібрувального графіка готують ряд стандартних розчинів відповідно з таблицею.

Приготовлені стандартні проби обробляють, як дослідні, і за знайденими значеннями екстинції будують калібрувальний графік у координатах: концентрація холестерину — оптична щільність.

Для перерахунку мг % в ммоль/ л отриманий результат множать на 0,026.

Калібрувальна крива для визначення концентрації
холестерину за методом Ілька



Побудувати криву за даними, що наведені в таблиці.

Концентрація холестерину, ммоль/л	0	3,0	6,0	9,0
Екстинція (E)	0	0,1	0,2	0,3

Висновок

Норма, ммоль/л: велика рогата худоба – 2,07-3,11; вівці – 1,35-1,97; кози – 2,07-3,37; свині – 0,93-1,40; коні – 1,94-3,89; собаки – 3,86-6,17; коти – 3,86-6,17.

Клініко-діагностичне значення. Дослідження холестерину використовується в комплексі з іншими тестами для визначення характеру гіперліпопротеїнемій.

Гіперхолестеринемія зустрічається при механічних жовтяницях, нефриті, нефрозі, гіпотиреозі, авітамінозах.

Гіпохолестеринемія спостерігається при туберкульозі, паренхіматозній жовтяниці, гіпертиреозі, анеміях, голодуванні

Завдання 2. Визначення рівня β - і пре- β -ліпопротеїнів (ЛПНГ і ЛПДНГ) у сироватці крові експрес-методом

Принцип методу. При додаванні гепарину до сироватки крові при наявності хлориду кальцію утворюється гепарин-ліпопротеїновий комплекс. Мутність, що виникає пропорційна вмісту β -і пре- β -ліпопротеїнів.

Реактиви:

- розчин кальцію хлориду 25 ммоль/л;
- розчин гепарину (1 мл має містити 1 000 МО).

Матеріал для дослідження. Свіжа сироватка або плазма крові.

Хід визначення. У пробірку з 2,0 мл розчину кальцію хлориду 25 ммоль/л додають 0,2 мл сироватки крові, ретельно перемішують і вимірюють екстинкцію при $\lambda = 630-690$ нм у кюветі з товщиною шару 0,5 см, порівнюючи з дистильованою водою. Потім додають 0,04 мл 1 % розчину гепарину,

ретельно перемішують і точно через 4 хв (за секундоміром) вимірюють екстинкцію.

Різниця між значеннями екстинкцій ($E_2 - E_1$) відповідає екстинкції, зумовленій вмістом β - і пре- β -ліпопротеїнів.

Розрахунок. Вміст β - і пре- β -ліпопротеїнів виражають в одиницях екстинкції, помножених на 100:

$$C = (E_2 - E_1) \cdot 100.$$

Примітки:

- кров тварин досліджують після 12-годинного голодування;
- сироватку потрібно досліджувати негайно після взяття;
- на результати аналізу впливає якість гепарину.

Висновок: _____

Нормативні значення у жуйних становлять 35–55 од.

Клініко-діагностичне значення.

Ліпопротеїни високої густини (ЛПВГ, α -ЛП) – містять значну кількість фосфоліпідів і білку, відіграють основну роль у видаленні холестерину із тканин і володіють антиатерогенними властивостями.

Ліпопротеїни низької густини (ЛПНГ, β -ЛП) – включають в свою основу в основному вільний холестерин і в меншій мірі триацилгліцероли та ін. компоненти. Транспортують холестерин від печінки до тканин.

Ліпопротеїни дуже низької густини (ЛПДНГ, пре β -ЛП) – містять в основному триацилгліцероли і невеликій кількості вільний холестерин. Основна їх функція – це транспорт ендогенних триацилгліцеролів.

Патологічні зміни щодо вмісту ліпопротеїнів у плазмі й сироватці крові називають **дисліпопротеїнеміями**. Вони характеризуються підвищенням, зниженням або практично повною відсутністю вмісту ліпопротеїнів. Трапляються також випадки появи в крові незвичайних або патологічних ліпопротеїнів. Нині знайдено обернену залежність між рівнем холестеролу ЛПВГ і поширенням ішемічної хвороби серця. Високий рівень холестеролу ЛПВГ є антифактором ризику ішемічної хвороби серця.

Висновок: _____

Роботу прийнято _____ (підпис викладача)

Для записів

ТЕМА 8. ДОСЛІДЖЕННЯ ПОКАЗНИКІВ ПОРУШЕННЯ ЛІПІДНОГО ОБМІНУ. ВИЗНАЧЕННЯ КЕТОНОВИХ ТІЛ У СЕЧІ

Завдання 1. Визначення кетонів у сечі за допомогою індикатору

Хід роботи. Індикатор у невеликій кількості (на кінчику ножа) помістити на предметне скло (на фоні білого паперу), нанести 2-3 краплі сечі і через 1-3 хв порівняти отриманий колір з кольоровою шкалою.

Завдання 2. Проба Росса

Приготування реактиву Росса. 1,0 г натрію нітропрусиду змішують з 99 г амонію сульфату.

Хід визначення. У пробірку насипають 1,0 г реактиву Росса, піпеткою наливають 5 мл сечі, додають кристалик NaOH і перемішують. Результати реакції читають через 5 хв при температурі нижче 18 °С. При наявності кетонів у сечі вміст пробірки забарвлюється у червоно-фіолетовий колір.

Завдання 3. Експрес-метод визначення кетонів у сечі

Використовують діагностичні індикаторні смужки, за допомогою яких визначають приблизну концентрацію кетонів у сечі: “Кетотест” (Росія), Кето ФАН і Дія ФАН (La-Chema, Чехія), Penta ФАН. Діагностичну смужку опускають у сечу і впродовж 1 хв порівнюють колір із стандартом, який нанесений на тубус. В основі тесту лежить реакція Легала. Проба більш чутлива до ацетооцтової кислоти, ніж до ацетону, і не чутлива до β-гідроксималярної кислоти. Кольорова шкала на етикетці відображає концентрацію ацетооцтової кислоти в сечі. Ця проба дозволяє виявляти кетонів у сечі від 1,5 до 15 ммоль/л.

Нормативні значення кетонів у сечі, ммоль/л: коні – 0,06–0,66; велика рогата худоба – 0,6–1,5; вівці – 0,59–1,46.

Висновок: _____

Клініко-діагностичне значення. Кетонові тіла синтезуються в печінці і стають своєрідними постачальниками енергії для м'язів, мозку, нирок. Вони також запобігають мобілізації жирних кислот із жирових депо. Печінка не є винятком, бо й вона використовує кетонові тіла як енергетичний матеріал для метаболічних процесів. Для діагностики кетозів і ацидозів важливе значення має визначення кетонових тіл у різних середовищах організму. Підвищення концентрації кетонових тіл у крові спостерігається при голодуванні, тяжкій формі цукрового діабету (**кетонемія**). Цей стан супроводжується різким підвищенням вмісту кетонових тіл в сечі (**кетонурія**), коли вміст ацетонових тіл у добовій сечі може досягати 10 – 50 г і більше (в нормі у жуйних тварин 40 мг кетових тіл). Часто кетонові тіла в сечі виявляють при кетозі, який виникає внаслідок порушення насамперед вуглеводно-жирового, а також білкового й мінерально-вітамінного обмінів у молочних корів, поросних свиноматок і кітних вівцематок.

Для записів

ТЕМА 9. ДОСЛІДЖЕННЯ ЕНЗИМІВ СИРОВАТКИ КРОВІ, ЇХ ЗНАЧЕННЯ В ДІАГНОСТИЦІ ЗАХВОРЮВАНЬ ВНУТРІШНІХ ОРГАНІВ. НЕСПЕЦИФІЧНІ ТА ІНДИКАТОРНІ ФЕРМЕНТИ

Завдання 1. Визначення активності гаммаглутамілтранспептидази у сироватці крові

Принцип методу. Гаммаглутамілтранспептидаза каталізує реакцію переносу L- γ -глутамінового залишку з хромогенного субстрату на гліцилгліцин. У цьому разі звільнюється 4-нітроанілін, кількість якого пропорційна активності ферменту і визначається фотометрично.

Хід роботи. Послідовність додавання інгредієнтів у пробірки наведено у таблиці

Інгредієнти	Дослідна проба, мл	Холоста проба, мл
Субстратно-буферний розчин	0,5	0,5
Інкубують 5 хв при t +37° С		
Сироватка крові	0,05	–
Інкубують 15 хв при t +37° С		
10 % розчин оцтової кислоти	3,0	3,0
Сироватка крові	–	0,05

Перемішати, вимірювати оптичну густина дослідної проби відносно холостої при довжині хвилі 405 нм у кюветі з товщиною оптичного шару 10 мм. Величину активності ферменту у сироватці крові визначають за калібрувальним графіком.

Висновок: _____

Норма, Од/л: корова – 20-48; кінь – 9-25; собаки – 1-40; коти – 2-38.

Клініко-діагностичне значення.

ГГТП сироватки крові має печінкове походження. Тому гіперферментемію спостерігають: при механічній жовтяниці, яка викликана новоутворенням, а

також при холангіті, помірне підвищення активності – при хронічному гепатиті та серцево-судинній недостатності. Хвороби нирок у меншій мірі впливають на активність ГГТП сироватки крові.



Побудувати криву за даними, що наведені в таблиці.

Активність гаммаглутаміл-транспептидази, Од/л	0	25	50	100
Екстинція (Е)	0	0,1	0,2	0,4

Завдання 2. Визначення активності аспаратамінотрансферази у сироватці крові (метод Райтмана – Френкеля)

Принцип методу. В результаті переамінування, що проходить під дією аспаратамінотрансферази, утворюється глютамінова і піровиноградна кислоти. При додаванні 2,4-динітрофенілгідразину у лужному середовище утворюється забарвлений гідразон піровиноградної кислоти, інтенсивність забарвлення якого пропорційно активності ферменту.

Хід роботи. Послідовність додавання інгредієнтів наведено в таблиці

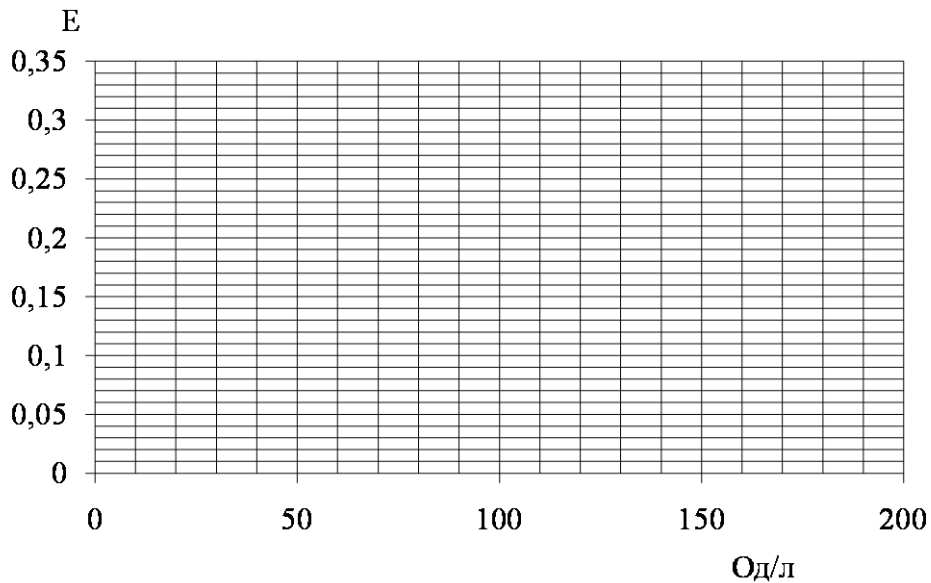
Інгредієнти	Дослідна проба, мл	Холоста проба, мл
Субстратно-буферний розчин	0,5	0,5
Інкубують 5 хв при t +37° С		
Сироватка крові	0,1	0,1
Розчин 2,4-динітрофенілгідразину		0,5
Інкубують 60 хв при t +37° С		
Розчин 2,4-динітрофенілгідразину	0,5	
Витримують 20 хв при кімнатній температурі		
0,4н. розчин їдкоого натрію	5	5

Витримують 10 хв при кімнатній температурі. Вимірюють оптичну густину дослідної проби відносно холостої. При зеленому світлофільтрі (540 нм) в кюветах з товщиною оптичного шару 10 мм.

Висновок: _____

Норма, Од/л: кінь – 50-200; велика рогата худоба – 10-50; свиня – 10-35; дрібна рогата худоба – 10-65; собаки – 10-25; коти – 10-30.

Калібрувальний графік для визначення активності аспартатамінотрансферази або аланінамінотрансферази



Побудувати криву за даними, що наведені в таблиці.

Активність аспартатамінотрансферази або аланінамінотрансферази, Од/л	0	50	110	170
Екстинція (E)	0	0,1	0,2	0,3

Завдання 3. Визначення активності аланінамінотрансферази у сироватці крові

Принцип методу. В результаті переамінування, яке проходить під дією аланінамінотрансферази, утворюється щавлевооцтова і піровиноградна кислоти. При додаванні 2,4-динітрофенілгідразину у лужному середовищі утворюється забарвлений гідразин піровиноградної кислоти, інтенсивність забарвлення якого пропорційна активності ферменту.

Хід роботи. Послідовність додавання інгредієнтів наведено в таблиці

Інгредієнти	Дослідна проба, мл	Холоста проба, мл
Субстратно-буферний розчин	0,5	0,5
Інкубують 5 хв при t +37° С		
Сироватка крові	0,1	0,1
Розчин 2,4-динітрофенілгідразину	–	0,5

Інкубують 30 хв при $t +37^{\circ} \text{C}$		
Розчин 2,4-динітрофенілгідразину	0,5	–
Витримують 20 хв при кімнатній температурі		
0,4 н. розчин натрію їдкоого	5	5

Витримують **10 хв** при кімнатній температурі. Вимірюють оптичну гу-
стину дослідної проби відносно холостої, при зеленому світлофільтрі в кюве-
тах з товщиною оптичного шару **10 мм**.

Висновок: _____

Норма, Од/л: кінь - 5-15; велика рогата худоба - 10-30; свиня - 5-20; дрібна
рогата худоба – 5-25; собаки – 10-55; коти – 10-45.

**Клініко-діагностичне значення. Підвищення активності амінотран-
сфераз в сироватці крові відмічається при цілому ряді захворювань, особливо
при ураженні органів і тканин, які багаті на ці ферменти (серце, печінка,
м'язи). Причинами підвищення активності амінотрансфераз можуть бути: ін-
фаркт міокарда (в 5-10 разів), гострий гепатит і некроз печінки (у 10 разів і
вище), важка гіпоксія тканин (у 100 разів і вище), після хірургічних втручань
і травм, захворюваннях скелетних м'язів (міопатії), холестази, хронічному
гепатиті, у новонароджених тварин (менше, ніж у 5 разів) та гемолізі (in vivo
і in vitro).**

Роботу прийнято _____ (підпис викладача)

Для записів

**ТЕМА 10. КЛІНІЧНА БІОХІМІЯ ПРИ ПАТОЛОГІЇ ПЕЧІНКИ.
ВИЗНАЧЕННЯ ЗАГАЛЬНОГО БІЛІРУБІНУ ТА ЙОГО ФРАКЦІЙ
У БІОЛОГІЧНОМУ МАТЕРІАЛІ**

Завдання 1. Визначення загального та прямого білірубину в сироватці крові

Принцип методу. В присутності кофеїнового реактиву діазотована сульфанілова кислота утворює з прямим та непрямим білірубіном азобілірубін рожево-фіолетового кольору. При відсутності кофеїнового реактиву реагує тільки прямий білірубін. За різницею між загальним та прямим білірубіном визначають концентрацію непрямого білірубину.

Хід роботи. Послідовність процедури визначення вмісту загального та прямого білірубину наведена у таблиці.

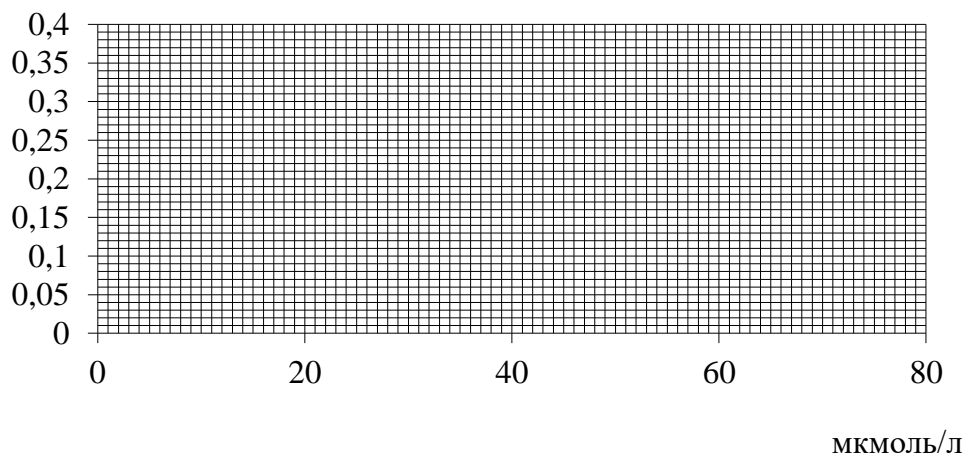
Інгредієнти	Загальний білірубін	Прямий білірубін	Контроль
Сироватка крові, мл	0,5	0,5	0,5
Кофеїновий реактив, мл	1,75	–	1,75
0,9% розчин NaCl, мл	–	1,75	0,25
Діазосуміш, мл	0,25	0,25	–

Для визначення концентрації прямого білірубину проби витримують **5-10 хв.** при кімнатній температурі. Для визначення концентрації загального білірубину проби витримують **20 хв.** при кімнатній температурі. Вимірюють оптичну густину дослідних проб відносно контролю. Від показників оптичної густини, отриманих при дослідженні загального та прямого білірубину, віднімають показник оптичної густини контролю. Екстинцію досліджуваних розчинів визначають при довжині хвилі **560 нм** у **5 мм** кюветах. Отриманий результат оптичної густини використовують для подальших розрахунків. Визначення концентрації білірубину проводять за калібрувальним графіком.

Побудувати криву за даними, що наведені в таблиці.

Білірубін, ммоль/л	0	24	48	72
Екстинція (E)	0	0,12	0,24	0,36

Калібрувальний графік для визначення концентрації загального білірубіну



Побудувати криву за даними, що наведені в таблиці.

Білірубін, мкмоль/л	0	24	48	72
Екстинція (E)	0	0,02	0,025	0,030

Калібрувальний графік для визначення концентрації прямого білірубіну



Висновок: _____

Норма, мкмоль/л: загальний білірубін – велика рогата худоба – 1,71-10,3; вівці 1-7; коні – 5,4-51,4; свині – 1-7; кури – 1,71-6,0; собаки – 3-13,5; коти – 3-12.

прямий білірубін - велика рогата худоба – 0; вівці 0-5; коні – 0-10; свині – 0-5; собаки – 0-5,5; коти – 0- 5,5.

Примітки:

- сироватка має бути негемолізованою;
- перед визначенням білірубину не можна приймати ліки або вживати продукти, які викликають штучне забарвлення сироватки (морква тощо), не слід також застосовувати вітамін С.

Клініко-діагностичне значення. Визначення вмісту білірубину та його фракцій, а також уробіліногенових тіл має важливе значення в диференційній діагностиці жовтяниць різної етіології. Розрізняють: **гемолітичну, паренхіматозну і обтураційну (механічну) жовтяниці.**

При **гемолітичній жовтяниці** гіпербілірубінемія виникає в основному за рахунок непрямого (вільного) білірубину. В результаті посиленого гемолізу відбувається інтенсивне утворення в ретикулоендотеліальній системі непрямого білірубину із зруйнованих еритроцитів. В той же час печінка не здатна до утворення такої значної кількості білірубінглюкуронідів, що і викликає накопичення непрямого білірубину в крові і тканинах. Відомо, що непрямий білірубін не проходить через нирковий фільтр, тому він у сечі при гемолітичній жовтяниці не зустрічається. У сечі білірубін не виявляється, оскільки прямий білірубін за звичай знаходиться у межах не високих цифр. Уробіліноїди в сечі в нормі або збільшені, стеркобілін в калі різко збільшений. Цей вид жовтяниці зустрічається при деяких кровопаразитарних захворюваннях (піроплазмоз, бабезіоз, нутталіоз), інфекційних (інфлуенца), при отруєннях гемолітичними отрутами (куколь, соланін).

При **паренхіматозній жовтяниці** настає деструкція печінкових клітин і їх набряк; порушується екскреція прямого білірубину у жовчні капіляри (первинний холестаза), він потрапляє безпосередньо у кров, де вміст його значно збільшується, збільшується його вміст і в сечі. Крім того, знижується здатність печінкових клітин синтезувати білірубінглюкуроніди; внаслідок цього кількість непрямого білірубину у сироватці крові також збільшується. Ураження гепатоцитів супроводжується порушенням їх здатності руйнуватися до ди- і трипіролів уробіліноген, який надходить із тонкої кишки. Останній потрапляє у велике коло кровообігу і виділяється нирками із сечею. Стеркобілін в калі на висоті жовтяниці відсутній — кал знебарвлений (**ахолічний кал**). Збільшення уробіліноїдів у сечі і нормалізація стеркобіліну в калі

— сприятлива ознака. Збільшення обох фракцій спостерігається при ураженні паренхіми печінки факторами інфекційного і токсичного характеру: при інфекційній анемії, гострих і хронічних гепатитах, отруєннях чотирихлористим вуглецем, свинцем, діхлоретаном, при тривалому застосуванні сильнодіючих лікарських препаратів.

При *обтураційній жовтяниці* порушено жовчовиділення, що приводить до різкого збільшення вмісту прямого білірубіну в крові (гіпербілірубінемія). Дещо збільшується у крові концентрація і непрямого білірубіну. Різко знижується вміст стеркобіліну в калі. Повна обтурація жовчної протоки супроводжується відсутністю жовчних пігментів в калі (*ахолічний кал*). Це можливо при закупорці жовчних шляхів камінцями, паразитами.

Завдання 2. Якісні реакції на вітамін А

Принцип методу. 1. При додаванні концентрованої сірчаної кислоти вітамін А дає червоне забарвлення, яке змінюється на червоно-буре.

2. При реакції з заліза сульфатом (II) у кислому середовищі утворюється червоно-рожева сполука.

Хід роботи. Реакція Друммонда з концентрованою сірчаною кислотою. У суху пробірку по стінці вносять 3 краплі масляного розчину вітаміну А або риб'ячого жиру. Потім додають обережно 2 краплі сірчаної кислоти. У місці контакту вітаміну А з сірчаною кислотою з'являється фіолетове забарвлення, яке переходить у вишнево-червоне.

Висновок: _____

Реакція з заліза сульфатом (II). У пробірку до 2-3 крапель масляного розчину вітаміну А або риб'ячого жиру приливають 5-10 крапель льодяної оцтової кислоти, насиченої заліза сульфатом (II), 2-4 краплі концентрованої сірчаної кислоти. З'являється блакитне забарвлення, яке поступово змінюється на червоно-рожеве. Каротини дають при цій реакції зелене забарвлення.

Висновок: _____

Клініко-діагностичне значення:

Концентрація ***каротину*** має сезонне коливання з підвищенням у пасо-вищній період. Знижується рівень каротину при дефіциті його в кормах, при захворюваннях ШКТ, гепатитах. Різних інтоксикаціях, при недостатчі в кор-мах білків, вуглеводів, вітаміну В₆. При ***дефіциті вітаміну А*** в раціоні тва-рин спостерігається атрофія і дегенерація секретуючого епітелію дихальних шляхів, кишечника, слинних залоз, сечостатевого каналу, порушення зору та ураження ЦНС.

Роботу прийнято _____ (підпис викладача)

Для записів

Дата “ _____ ” _____ 20__р.

ТЕМА 11. ГЕМОГЛОБІНОПАТІЇ. КЛІНІКО-ДІАГНОСТИЧНЕ ЗНАЧЕННЯ ДОСЛІДЖЕННЯ ВМІСТУ ГЕМОГЛОБІНУ

Завдання. Визначення гемоглобіну крові гемоглобінціанідним методом

Принцип методу. Взаємодія гемоглобіну з ацетонціангідрином і червоною кров'яною сіллю у лужному середовищі приводить до утворення комплексу оранжевого кольору, концентрація якого прямо пропорційна концентрації гемоглобіну

Хід роботи. Перед визначенням ретельно перемішують кров. Відбирають у чисту пробірку мікропіпеткою 0,02 мл крові. Потім вносять 5,0 мл трансформуючого реактиву, ретельно перемішують і через 10 хв. вимірюють оптичну густину на фотоелектроколориметрі при довжині хвилі **500-560 нм** (зелений світлофільтр) у кюветі з товщиною шару **10 мм** відносно контрольної проби – дистильованої води, оскільки екстракція води практично дорівнює екстинції трансформуючого реактиву. Концентрацію гемоглобіну визначають за калібрувальним графіком або формулою.

Висновок: _____

Норма, г/л: велика рогата худоба – 95-125; вівці – 90-135; кози – 100-150; свині – 90-110; коні – 90-140; собаки – 110-170; кури – 80-120.

Клініко-діагностичне значення.

Зниження концентрації гемоглобіну у крові зустрічається при анеміях різної етіології.

Підвищення вмісту гемоглобіну в крові – при еритремії або при дегідратації організму (відносний характер).

Завдання 2. Визначення вмісту гемоглобіну в сечі гемоглобінціанідним методом

Принцип методу. Гемоглобін при взаємодії з калієм залізоціанідом (червона кров'яна сіль) окиснюється до метгемоглобіну, який утворює з аце-

тонціангідрином кольоровий геміглобінціанід, інтенсивність забарвлення якого пропорційна концентрації гемоглобіну.

Хід визначення. До 5 мл трансформуючого реактиву в пробірку додають 0,02 мл сечі і перемішують. Через 10 хв записують показники фотоелектроколориметра при довжині хвилі 540 нм (зелений світлофільтр) у кюветі шириною 10 мм проти контрольної проби (робочий розчин або дистильована вода). За формулою або калібрувальним графіком визначають уміст гемоглобіну в сечі (г/100 мл або г/л):

$$Hb \text{ г/100 мл} = E_{дп} / E_{ст} \times 59,75 \times 251 \times 0,001, \text{ де}$$

$E_{дп}$ – екстинція дослідної проби;

$E_{ст}$ – екстинція стандартного розчину;

59,75 – концентрація геміглобінціаніду в стандартному розчині;

251 – розведення сечі;

0,001 – коефіцієнт для перерахунку мг/100 мл у г/100 мл.

Висновок: _____

Клініко-діагностичне значення.

Виділення гемоглобіну із сечею називають **гемоглобінурією**, яка буває первинною і вторинною. Первинна гемоглобінурія є наслідком масового гемолізу еритроцитів у кров'яному руслі, коли гемоглобін, який вивільнюється, не встигає повністю перетворитися на білірубін. Вторинна гемоглобінурія зумовлена виходом гемоглобіну з еритроцитів уже в сечі при їхньому розпаді. Первинна гемоглобінурія є важливим симптомом гемолітичної хвороби поросят, післяродової гемоглобінурії корів, пароксизмальної гемоглобінурії телят, лептоспірозу, кровопаразитарних хвороб (бабезіоз, нуталіоз, піроплазмідоз) і деяких інтоксикацій. Сеча при гемоглобінурії набуває бурочервоного кольору.

Роботу прийнято _____ **(підпис викладача)**

Для записів

ТЕМА 12. ДОСЛІДЖЕННЯ ВОДНО-ЕЛЕКТРОЛІТНОГО ОБМІНУ ТА КЛІНІКО-БІОХІМІЧНЕ ЗНАЧЕННЯ ЦИХ ДОСЛІДЖЕНЬ

Завдання 1. Визначення фосфору у сироватці крові

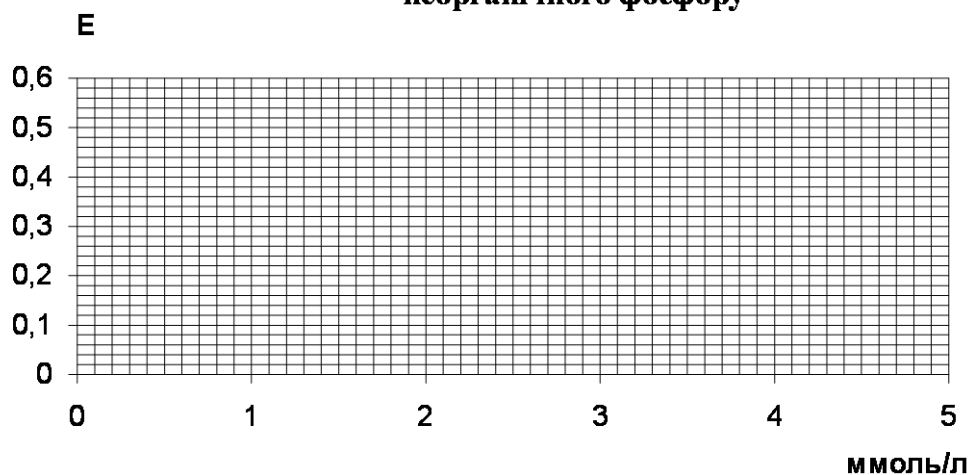
Принцип методу. У безбілковому центрифугаті залишається неорганічний фосфор, який реагує з молібденовою кислотою з утворенням фосфорно-молібденової кислоти. Остання відновлюється аскорбіновою кислотою до синього фосфорно-молібденового комплексу. Інтенсивність забарвлення пропорційна концентрації неорганічного фосфору.

Хід роботи. У центрифужній пробірці змішують 0,8 мл дистильованої води, 0,2 мл сироватки крові і 1,0 мл 10 %-го розчину трихлороцтової кислоти. Через 10 хв. центрифугують. До 1,0 мл центрифугату додають 0,2 мл розчину амонію молібдату, 0,04 мл розчину аскорбінової кислоти і 0,36 мл дистильованої води. Через 20 хв. відстоювання при кімнатній температурі проби колориметрують відносно контролю при червоному світлофільтрі (630-690 нм) у кюветі з товщиною шару 5 мм. Контроль готують подібно до дослідної проби, але замість центрифугату беруть 1,0 мл дистильованої води.

Визначення вмісту фосфору в пробі проводять за калібрувальним графіком.

Побудувати криву за даними, що наведені в таблиці.

Калібрувальний графік для визначення концентрації неорганічного фосфору



Екстинція (E)	0	0,25	0,37	0,48
Неорганічний фосфор, ммоль/л	0	1	2	3

Висновок: _____

Норма, ммоль/л: велика рогата худоба – 1,45-2,1 (телята 1,78-2,42); вівці 1,45-2,48; кози 1,94-2,58; коні – 1,45-1,78; свині – 1,45-2,1; собаки – 0,84-2,0; коти – 1,45-2,62.

Клініко-діагностичне значення.

Підвищення концентрації неорганічного фосфору в крові має місце при нирковій недостатності, гіпаратиреозі і гіпервітамінозі D.

Зниження – при гіпаратиреозі, недостатності функції щитоподібної залози (гіпотиреозі), гіповітамінозі D (рахіт, остеомаліяція), стеатореї, голодуванні або кахексії, порушенні функції ниркових каналців, діабетичному кетоацидозі (особливо при видужуванні), іноді при вагітності.

Завдання 2. Визначення кальцію в сироватці крові трилонометричним титруванням у присутності мурексиду

Принцип методу. Вільний мурексид у лужному середовищі має синьо-фіолетове забарвлення, а зв'язаний у комплекс з кальцієм – рожево-оранжеве. Під час титрування розчином трилону Б цей комплекс руйнується, а зв'язаний мурексид звільнюється. Проба набуває фіолетового кольору.

Хід роботи. У маленьку конічну колбу або стаканчик вносять 20 мл дистильованої води, 0,2 мл 9 н. розчину NaOH і додають на кінчику скальпеля (30-40мг) індикатор. Розчин набуває бузкового кольору. До нього додають 1 мл сироватки крові, після чого з'являється рожеве забарвлення. Розчин титрують трилоном Б до появи бузкового забарвлення індикатору.

Для визначення титру розчину трилону Б проводять титрування, використовуючи замість сироватки крові стандартний розчин кальцію .

Розрахунок проводять за формулою

$$X = \frac{A}{B} \times C ,$$

де **X** – концентрація кальцію у сироватці крові, ммоль/л;

A – об'єм розчину трилону Б, витраченого на титрування проби, мл;

B – об'єм трилону Б, витраченого на титрування стандартного розчину

кальцію, мл;

C – концентрація кальцію у стандартному розчині (2,0 ммоль/л).

Власні розрахунки:

$$X = \quad = \quad \text{ммоль/л}$$

Висновок: _____

Норма, ммоль/л: велика рогата худоба – 2,25-3,0 (телята 2,5-8,13); вівці - 2,38-3,38; кози - 2,5-3,25; коні – 2,5-3,5; свині – 2,5-3,5 (поросята 2,5-3,25); собаки – 2,25-2,95; коти – 1,5-2,55.

Клініко-діагностичне значення.

Підвищення вмісту кальцію в плазмі крові виявляється при надлишковому введенні в організм вітаміну D (цей вітамін сприяє всмоктуванню кальцію в кров і гальмує виведення його з організму). Фізіологічна гіперкальцемія буває у новонароджених після 4 доби життя.

Зниження концентрації кальцію в плазмі крові відмічається при захворюваннях нирок (хронічній нирковій недостатності, нефриті), при зниженні секреції в крові гормонів паращитовидної залози, зниженні вмісту альбуміну в плазмі, діареї, дефіциті вітаміну D, рахіті.

Завдання 3. Визначення буферної ємності сироватки крові

Хід роботи. Беруть дві колби в одну з них вносять 2 мл сироватки крові та розводять водою у 10 разів, у другу вносять 2 мл фосфатного буферу рН=7,4 та розводять дистильованою водою також у 10 разів. Потім у дві колби додають по 2 краплі індикатору фенолфталеїну. Вміст колби з фосфатним буфером та сироваткою крові титрують 0,1 н розчином NaOH до появи малиново-червоного забарвлення (рН=9,0).

Розрахунок проводять за формулою:

$$B = \frac{A \times 10 \times n}{(pH_1 - pH_0) \times 2},$$

де A – кількість 0,1 н розчину NaOH, який було витрачено на титрування, мл;

10 – розведення сироватки крові;

pH₀ – величина рН до початку титрування (7,4);

pH₁ – величина рН після титрування (9,0).

Порівняти буферну ємність сироватки крові з буферною ємністю фосфатного буфера.

Висновок: _____

Роботу прийнято _____ (підпис викладача)

Для записів

ТЕМА 13. ДОСЛІДЖЕННЯ КИСЛОТНО-ЛУЖНОГО СТАНУ ОРГАНІЗМУ ТВАРИН, ІНТЕРПРЕТАЦІЯ ОТРИМАНИХ РЕЗУЛЬТАТІВ

Завдання 1. Визначити показники кислотно-лужного стану крові телят, якщо величина рН сечі дорівнює 6,21 (згідно з матеріалами, викладеними у методичних вказівках “Визначення кислотно-лужного стану і корекція метаболічного ацидозу в організмі новонароджених телят”, укладачі: Мельничук Д.О., Любецька Т.В., Малько В.А, Томчук В.А.).

Проби сечі телят для досліджень відбирають у целофанові мішечки в ранковий час до годування під час природного сечовипускання у кількості 100-200 мл. Реакцію сечі визначають на рН-метрі одразу ж або не пізніше 3-х годин після взяття проби. В останньому випадку пробу покривають шаром вазелінового масла і зберігають на льоду.

Приклад. Визначення показників КЛС крові телят за величиною рН їхньої сечі при умові, якщо її значення = 6,45.

У загальне рівняння для визначення показників КЛС крові почергово підставляємо відповідні дані:

$$X_1 = \frac{y - a_1}{b_1}$$

де: X_1 — величина рН крові; y — величина рН сечі теляти = 6,45;

$a_1 = (-33,2283)$ і $b_1 = (5,37083)$, отже:

$$pH_{\text{крові}} = \frac{6,45 + 33,2283}{5,37083} = 7,38$$

Аналогічно робимо і для інших показників КЛС крові:

$$X_2 = \frac{y - a_2}{b_2}, \text{ де } X_2 \text{ — концентрація } HCO_3^-; a_2 = 4,87152 \text{ і } b_2 = 0,045691,$$

або:

$$HCO_3^- = \frac{6,45 - 4,87152}{0,045691} = 34,6 \text{ ммоль/л}$$

$$X_3 = \frac{y - a_3}{b_3}, \text{ де } X_3 \text{ — буферні основи (БО); } a_3 = 3,81104 \text{ і } b_3 = 0,048366,$$

або:

$$BO = \frac{6,45 - 3,81104}{0,048366} = 54,5 \text{ ммоль/л}$$

$$X_4 = \frac{y - a_4}{b_4}, \text{ де } X_4 - \text{зсув буферних основ (ЗБО); } a_4=6,08761 \text{ } b_4=0,04689,$$

$$\text{або: } \text{ЗБО} = \frac{6,45 - 6,08761}{0,04689} = 7,7 \text{ ммоль/л}$$

Одержані результати свідчать, що показники КЛС крові тварини (величина рН крові - 7,38; HCO_3^- - 34,6 ммоль/л; БО - 54,5 ммоль/л і ЗБО - 7,7 ммоль/л) знаходяться у межах нормальних величин.

Фізіологічним значенням рН сечі 6,3-6,5 новонароджених телят віком від 1-го до 10-и днів відповідає такий рівень показників кислотно-лужного стану їхньої крові: рН: 7,36-7,43; HCO_3^- : 32,0-40,0 ммоль/л; БО: 48,0-59,7 ммоль/л і ЗБО: 4,0-12,0 ммоль/л.

Значення величини рН сечі новонароджених телят 6,29-6,05 свідчить про зниження лужного резерву в організмі і про тенденцію розвитку ацидозу. При більш низьких величинах рН сечі в організмі телят спостерігається гострий метаболічний ацидоз різного ступеня прояву. При цьому зсув буферних основ набуває від'ємного значення.

Визначення показників КЛС крові телят за допомогою величини рН сечі дає можливість здійснювати діагностику кислотно-лужного стану в умовах виробництва, і, у разі вияву порушень, дозволяє більш раціонально проводити корекцію його порушень.

Величина рН сечі дорівнює . Визначити показники кислотно-лужного стану крові телят.

рН крові =

HCO_3^- = ммоль/л

БО = ммоль/л

ЗБО = ммоль/л

Висновок

Норма: рН – 7,36; $[\text{HCO}_3^-]$ = 32,0-40,0 ммоль/л; БО = 48,0-59,7 ммоль/л; ЗБО = 4,0-12,0 ммоль/л (для телят 10 добового віку).

Завдання 2. Розрахувати корегуючу кількість натрію гідрокарбонату при розвитку у новонароджених телят метаболічного ацидозу (рН=5,8, маса тіла 40 кг) за допомогою номограми (згідно з матеріалами, викладеними у методичних вказівках “Визначення кислотно-лужного стану і корекція метаболічного ацидозу в організмі новонароджених телят”, укладачі: Мельничук Д.О., Любецька Т.В., Малько В.А, Томчук В.А.).

Серед терапевтичних засобів при лікуванні диспепсії тварин, інших захворювань новонароджених телят, які супроводжуються гострим розладом травлення, з метою нормалізації кислотно-лужного стану (корекція метаболічного ацидозу) використовують натрій гідрокарбонат. При цьому існуючі способи корекції метаболічного ацидозу в організмі хворих телят не враховують ступінь його прояву.

З метою корекції метаболічного ацидозу в організмі новонароджених телят віком від 1-го до 10-и днів кратну дозу натрію гідрокарбонату для перорального застосування обраховують за такою формулою:

$$(\text{NaHCO}_3/\text{г}) = \text{ЗБО} \times a \times 0,042, \text{ де:}$$

ЗБО - зсув буферних основ крові (ммоль/л);

a - маса тіла (кг); 0,042 — кількість г NaHCO_3^- на 1 кг маси тіла і одиницю ЗБО – (г/ммоль/л x кг)

Так, для двох телят з однаковою масою тіла 35 кг і зсувом буферних основ (-7,0) і (-1,5) відповідно, визначеним за допомогою приладу "мікроаструп", коректуюча кількість гідрокарбонату натрію обраховується за формулою 2.

Приклад 1. NaHCO_3 (г) = 7 x 35 x 0,042 = 10,0.

Приклад 2. NaHCO_3 (г) = 1,5 x 35 x 0,042 = 2,5.

Отже, кратна доза гідрокарбонату натрію для тварин з однаковою масою тіла значно змінюється залежно від ступеня тяжкості ацидозу в їхньому організмі. Таким чином, ступінь прояву порушень КЛС крові в бік ацидозу є підставою для обрахунку терапевтичних доз натрію гідрокарбонату в комплексній терапії.

Якщо прилад "мікроаструп" відсутній, для розрахунку коригуючої кількості натрію гідрокарбонату беруть сечу телят, визначають її рН і користуються такою формулою:

$$NaHCO_3 (\bar{a}) = \frac{y - 6,08761}{0,04689} \cdot a \cdot 0,042; \text{ де}$$

y - величина рН сечі;

$6,08761$ і $0,04689$ - коефіцієнти лінійної регресії; a - маса тіла теляти (кг); $0,042$ - кількість (кг) натрію гідрокарбонату на 1 кг маси тіла і одиницю ЗБО (г/(ммоль/л-кг)).

З метою спрощення наведених обрахунків показників стану КЛС крові телят і коригуючої кількості натрію гідрокарбонату можна користуватися номограмою (рис. 1). За допомогою номограми, виходячи з величини рН сечі телят, визначають величину зсуву буферних основ; знаючи дані про масу тіла телят, знаходять кількість натрію гідрокарбонату, яка необхідна для корекції ацидозу в їхньому організмі.

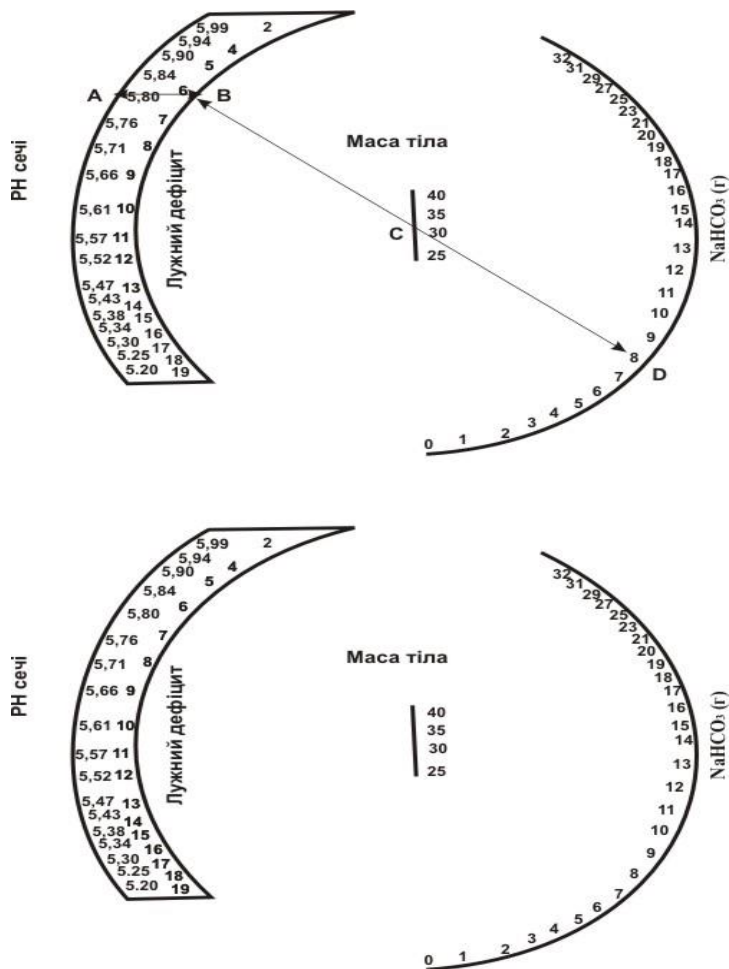


Рис 1. Номограма для розрахунку дози натрію гідрокарбонату з метою корекції метаболічного ацидозу в організмі телят.

Схема користування номограмою

Визначають величину рН сечі телят і знаходять одержаний показник на номограмі (точка А). Після цього на горизонталі від цієї точки знаходять величину зсуву буферних основ (точка В). Точку В сполучають з точкою С (маса тіла теляти) і за допомогою лінійки на цій же лінії знаходять точку D, яка вказує на кількість натрію гідрокарбонату, яка необхідна теляті на один прийом, щоб нормалізувати показники кислотно-лужного стану крові.

Враховуючи взаємозалежність ферментативних реакцій у процесі травлення, кратну дозу натрію гідрокарбонату дають хворим телятам в один прийом за 30 хвилин перед випоюванням молока або молозива. Бікарбонат натрію висипають на корінь язика і зразу випоюють 100-150 мл теплої кип'яченої води. Залежно від тяжкості патологічного процесу в організмі дозу повторюють 2-3 рази за добу. Тривалість корекції визначається клінічним станом тварини.

Висновок: кількість натрію гідрокарбонату, яка необхідна тварині на один прийом, щоб нормалізувати показники кислотно-лужного стану крові становить _____ г/гол.

Клініко-діагностичне значення. Розлади кислотно-лужного стану організму тварин можуть бути у вигляді ацидозу і алкалозу (респіраторні, метаболічні).

Респіраторний ацидоз виникає при пневмонії, бронхіті, емфіземі, ларингоспазмі, бронхоспазмі, пневмотораксі, гідротораксі, гемотораксі, аспірації, асфіксії; патологічних процесах, які пригнічують ЦНС (дихальний центр) — травми, набряки, пухлини головного мозку; отруєнні барбітуратами.

Респіраторний алкалоз — є результатом підвищення альвеолярної вентилляції. При цьому розвивається гіпокапнія, що характерно для пневмофіброзу, застійної серцевої недостатності; гіпоксії на фоні анемії; для стресового стану, гарячки, отруєння саліцилатами та вагітних.

Метаболічний ацидоз розвивається внаслідок первинної гіпобікарбонатемії. Це відмічається при накопиченні у крові органічних кислот; втраті основ через ШКТ або блокуванні екскреції кислот нирками (диспепсії, ілеусі, цукровому діабеті, гіпоксії, циркулярній недостатності).

Метаболічний алкалоз — стан, яких характеризується підвищенням рівня бікарбонату та зниженням концентрації іону водню і хлорид-іону у позаклітинній рідині. Це можливо при втраті шлункового вмісту у разі блювання і відсмоктування через зонд; при призначенні великих доз бікарбонату натрію.

Роботу прийнято _____ (підпис викладача)

Для записів

**ТЕМА 14 - 15. БІОХІМІЧНІ МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ
ІМУНОДЕФІЦИТНОГО СТАНУ ОРГАНІЗМУ ТВАРИН**

Завдання 1. Тимолова проба

Принцип методу. Імуноглобуліни сироватки крові осаджуються при рН 7,55 тимоловим реактивом. Інтенсивність помутніння, пропорційна вмісту імуноглобулінів і визначається фотоколориметрично.

Хід роботи. Проведення аналізу здійснюється згідно з таблицею.

Інгредієнти	Дослідна проба, мл	Контрольна проба, мл
Сироватка крові	0,05	-
Тимоловий реактив	3,00	3,00
Фізіологічний розчин	-	0,05

Вміст пробірок перемішують і залишають на **30 хв** при кімнатній температурі. Потім знову перемішують, вимірюють оптичну густину дослідної проби відносно контрольного розчину.

Довжина хвилі **620-660 нм**, кювета **10 мм**. Величину каламутності вираховують за калібрувальним графіком.



Побудувати криву за даними, що наведені в таблиці.

Тимоловий реактив, SH-одиниць	0	7,5	10	15
Екстинція (E)	0	0,014	0,018	0,026

Висновок: _____

Клініко-діагностичне значення. Тимолова проба в нормі складає 0-4 од. SH. Вона позитивна при паренхіматозному гепатиті, тоді як у хворих механічною жовтяницею — негативна (однак стає позитивною, якщо процес ускладнюється паренхіматозним гепатитом). Збільшується тимолова проба при цирозі печінки.

Завдання 2. Цинк-сульфатна проба

Принцип методу. Цинку сульфат в буферному розчині осаджує із сироватки крові переважно γ -глобуліни.

Хід роботи. Визначення проводять за допомогою набору реактивів для проведення цинк-сульфатної проби. Інтенсивність помутніння визначають за допомогою фотоколориметра.

Розрахунок проводять за калібрувальним графіком, який будують так само, як для тимолової проби.

Клініко-діагностична інтерпретація відповідає такому ж значенню як для тимолової проби.

Висновок: _____

Завдання 3. Імунохроматографічний аналіз

Імунохроматографічний аналіз (ІХА) – це експрес варіант імуноферментного аналізу, в якому імунологічна реакція проходить під час міграції крізь пори індикаторної стрічки. На поверхню стрічки нанесено імуноспецифічний реагент (антиген чи антитіло) у вигляді двох полос – тестової та контрольної. Стрічку занурюють у досліджуваний зразок і під дією капілярних сил рідина мігрує в інший бік. У випадках, коли зразок позитивний, він за-

барвлює тестову та контрольну полоси, якщо негативний – тільки контрольну полосу (рис. 2).



Рис. 2. Результати ІХА тестів (праворуч зразок позитивний, ліворуч – негативний).

Висновок: _____

Клініко-діагностичне значення.

Підвищення концентрації γ -глобулінів у сироватці (плазмі) крові спостерігають при бактеріальних інфекціях, інфекційному гепатиті, токсичному ураженні печінки, деяких вірусних (краснуха, інфекційний моновірус), аутоімунних (хвороби сполучної тканини), паразитарних захворюваннях, хронічних інфекціях (бруцельоз, ехінококоз печінки, малярія), холециститі, цирозі печінки, пієлонефриті, гострому поліартриті, сепсисі, гемолітичній жовтяниці.

Гіпогаммаглобулінемія виникає внаслідок виснаження імунної системи при тривалих хронічних інфекціях, лімфопенії, лімфогранулематозі, мієломі, ентериті, дистрофії печінки, хворобах нирок, опіках. Після лікування цитостатиками, імунодепресантами, кортикостероїдами розвивається ***агаммаглобулінемія***.

Роботу прийнято _____ (підпис викладача)

Для записів