

**В. А. Томчук, В. А. Грищенко,
В. І. Цвіліховський**

ВЕТЕРИНАРНА БІОХІМІЯ

Київ-2017

УДК 577.1:619(072)

ББК 28.0

Т-56

*Рекомендовано Вченою радою НУБіП України
(протокол № 3 від 25 жовтня 2017 року)*

Рецензенти:

С. А Ткачук, доктор ветеринарних наук, професор, академік академії наук вищої освіти України, Національний університет біоресурсів і природокористування України

В. В. Чумаченко, доктор ветеринарних наук, старший науковий співробітник, Державний науково-контрольний інститут біотехнології і штамів мікроорганізмів (ДНКІБШМ) Державної служби України з питань безпечності харчових продуктів та захисту споживачів

С. П. Весельський, доктор біологічних наук, старший науковий співробітник, Київський національний університет імені Тараса Шевченка

Т-56 Ветеринарна біохімія: навчальний посібник для підготовки студентів вищих навчальних закладів / Томчук В.А., Грищенко В.А., Цвіліховський В.І. – К.: ЦП «Компринт», 2017. – 568 с.

ISBN

У посібнику описано особливості змін метаболізму за патології органів серцево-судинної, респіраторної, травної та сечової систем та відповідні біохімічні констеляції; способи діагностики імунодефіцитного стану організму в новонароджених тварин і прогнозування його розвитку; проаналізовано біохімічні методи дослідження у ветеринарії (об'ємно-аналітичні, електрохімічні, оптичні, хроматографічні) та забезпечення якості діяльності біохімічної лабораторії.

Рекомендується для набуття практичних навичок, які необхідні для проведення експериментальних досліджень із використанням біохімічних методів. Для поліпшення засвоєння теоретичного матеріалу наведено ряд методик (лабораторних робіт).

Посібник розрахований на аспірантів, докторантів і молодих спеціалістів, які навчаються та працюють в області ветеринарної медицини для підготовки фахівців з питань біохімічних досліджень у лабораторній діагностиці хвороб тварин.

УДК 577.1:619(072)

ББК 28.0

© В. А. Томчук, В. А. Грищенко
В. І. Цвіліховський

ISBN

© НУБіП України, 2017

ЗМІСТ

	Вступ	9
Частина I	БІОХІМІЧНІ МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ У ВЕТЕРИНАРІЇ	12
1.1.	Об'ємно-аналітичні методи дослідження	12
1.1.1.	Способи вираження концентрації розчинів	13
1.1.2.	Визначення густини розчинів	15
1.1.3.	Види титриметричного аналізу	17
1.2.	Електрохімічні методи аналізу	24
1.2.1.	Вольтамперометрія	24
1.2.2.	Кондуктометрія	25
1.2.3.	Потенціометрія	28
1.3.	Оптичні методи аналізу	34
1.3.1.	Спектрофотометричні методи аналізу	38
1.3.2.	Атомна спектроскопія	43
1.3.3.	Рефрактометричний метод аналізу	50
1.4.	Хроматографічні методи аналізу	53
1.4.1.	Класифікації хроматографічних методів	54
1.4.2.	Тонкошарова хроматографія	56
1.4.3.	Іонообмінна хроматографія	57
1.4.4.	Газова хроматографія	58
1.4.5.	Рідинна хроматографія	63
1.4.6.	Хроматомас-спектрометрія	66
	Контрольні питання	67
	Рекомендована література	70
Частина II	МЕТОДИКИ ПРОВЕДЕННЯ АНАЛІЗУ РЕЧОВИН БІОХІМІЧНИМИ МЕТОДАМИ	72
	<i>Практична робота 2.1. Техніка безпеки в лабораторії</i>	72
	<i>Практична робота 2.2. Зважування та центрифугування</i>	77
	<i>Практична робота 2.3. Центрифугування речовин</i>	86
	<i>Лабораторна робота 2.1. Визначення кислотного числа титриметричним методом з візуальною індикацією</i>	95
	<i>Лабораторна робота 2.2. Визначення йодного числа (метод Кауфмана)</i>	97
	<i>Лабораторна робота 2.3. Потенціометричне виз-</i>	

	начення іонів калію в розчині	100
	<i>Лабораторна робота 2.4. Потенціометричне визначення рН розчинів</i>	101
	<i>Лабораторна робота 2.5. Визначення вітаміну А і каротиноїдів</i>	102
	<i>Лабораторна робота 2.6. Визначення вмісту хімічних елементів методом атомно-емісійної спектроскопії</i>	104
	<i>Лабораторна робота 2.7. Визначення показника заломлення</i>	105
	<i>Лабораторна робота 2.8. Визначення жирнокислотного складу тваринних жирів</i>	107
	<i>Лабораторна робота 2.9. Визначення вмісту афлатоксинів</i>	110
	Додаток. Приготування реактивів	113
	Рекомендована література	118
Частина	ЛАБОРАТОРНА ДІАГНОСТИКА ПОРУШЕНЬ МЕТАБОЛІЗМУ ПРИ ПАТОЛОГІЇ ВНУТРІШНІХ ОРГАНІВ	121
Ш		
3.1.	<i>Структура і функції біологічних мембран та патологія клітин</i>	121
3.1.1.	Структурна організація клітинної мембрани та її модифікація під дією патологічних чинників	121
3.1.2.	Пошкодження плазматичної мембрани як один із механізмів розвитку патології клітини	126
3.1.3	Універсальні закономірності змін ліпідного складу клітинних структур при патологічних станах	128
3.2.	<i>Зміни метаболізму за патології внутрішніх органів та їх лабораторна діагностика</i>	135
3.2.1.	Вплив фізіологічного стану тварин на біохімічний профіль крові	135
3.2.2.	Ензимодіагностика хвороб тварин	149
3.2.3.	Лабораторна діагностика порушень біохімічних процесів у легенях і міокарді при хворобах респіраторної та серцево-судинної систем	168
3.2.4.	Біохімічні процеси в організмі тварин при хворобах органів системи травлення, лабораторна діагностика їх порушень	192

3.2.5.	Лабораторна діагностика порушень метаболізму в нефроцитах при нефропатіях і функціональних розладах органів сечовиділення	229
3.2.6.	Порушення водно-електролітного обміну і кислотно-лужного стану організму тварин та їх лабораторна діагностика	248
3.2.7.	Гемоглобінопатії та їх лабораторна діагностика	270
3.2.8.	Біохімічні механізми імунної відповіді організму. Експрес-діагностика імунодефіциту в новонароджених тварин	280
3.3.	<i>Біохімічні аналізатори у лабораторній діагностиці</i>	311
3.3.1.	Біохімічні аналізатори: принципи роботи та сфери використання	311
3.3.2.	Модернізація спектроскопічних методів дослідження і лабораторної діагностики хвороб тварин ..	320
3.4.	<i>Експериментальне моделювання окремих патологій внутрішніх органів</i>	325
3.4.1.	Моделювання гастро- та ентеропатології з виразково-ерозійним процесом	325
3.4.2.	Моделювання медикаментозного ураження печінки під дією парацетамолу	341
3.4.3.	Моделювання медикаментозного ураження печінки під дією тетрацикліну	343
3.4.4.	Моделювання токсичного гепатиту при введенні щурам диклофенаку	344
3.4.5.	Моделювання гепатопатології при введенні щурам Кадмію	354
3.4.6.	Моделювання гепатопатології при дії на організм іонізуючої радіації	361
3.4.7.	Моделювання імунодефіциту	366
	Тести контролю знань	370
	Рекомендована література	378
Частина IV	ДОСЛІДЖЕННЯ БІОХІМІЧНИХ ПОКАЗНИКІВ ТА ЇХ КЛІНІКО-БІОХІМІЧНА ІНТЕРПРЕТАЦІЯ	381
	<i>Лабораторна робота 4.1. Визначення активності γ-глутамілтранспептидази в сироватці крові</i>	<i>381</i>
	<i>Лабораторна робота 4.2. Визначення активності</i>	

аспартатамінотрансферази в сироватці крові (метод Райтмана-Френкеля)	382
<i>Лабораторна робота 4.3.</i> Визначення активності аланінамінотрансферази в сироватці крові	383
<i>Лабораторна робота 4.4.</i> Визначення активності креатинфосфокінази в сироватці крові уніфікованим методом	384
<i>Лабораторна робота 4.5.</i> Визначення активності лактатдегідрогенази в сироватці крові	386
<i>Лабораторна робота 4.6.</i> Визначення активності α -амілази в сироватці крові та сечі (метод Каравея)	387
<i>Лабораторна робота 4.7.</i> Визначення активності ліпази в сироватці крові уніфікованим методом	389
<i>Лабораторна робота 4.8.</i> Визначення активності трансамідинази в сироватці крові уніфікованим методом	391
<i>Лабораторна робота 4.9.</i> Визначення вмісту загального протеїну в сироватці (плазмі) крові біуретовим (уніфікованим) методом	393
<i>Лабораторна робота 4.10.</i> Визначення концентрації альбуміну в сироватці крові	395
<i>Лабораторна робота 4.11.</i> Уніфікований метод визначення концентрації сечовини в сироватці крові за кольоровою реакцією з діацетилмоноксимом	396
<i>Лабораторна робота 4.12.</i> Визначення концентрації креатиніну в біологічних рідинах	398
<i>Лабораторна робота 4.13.</i> Визначення вмісту протеїну в сечі	401
<i>Лабораторна робота 4.14.</i> Визначення вмісту гемоглобіну в сечі гемоглобінціанідним методом	407
<i>Лабораторна робота 4.15.</i> Визначення рівня ліпопротеїнів низької і дуже низької щільності у сироватці крові експрес-методом	409
<i>Лабораторна робота 4.16.</i> Дослідження вмісту холестеролу в плазмі (сироватці) крові	410
<i>Лабораторна робота 4.17.</i> Визначення концентрації глюкози у біологічних рідинах глюкозо-	

	оксидазним методом	411
	<i>Лабораторна робота 4.18. Визначення вмісту сіалових кислот у плазмі крові</i>	413
	<i>Лабораторна робота 4.19. Визначення вмісту білірубіну в сироватці крові (метод Іендрашика, Клеггорна та Грофа)</i>	413
	<i>Лабораторна робота 4.20. Тимолова проба</i>	417
	<i>Лабораторна робота 4.21. Цинк-сульфатна проба</i>	418
	<i>Лабораторна робота 4.22. Дослідження вмісту гемоглобіну крові гемоглобінціанідним методом ..</i>	418
	<i>Лабораторна робота 4.23. Дослідження вмісту оксигемоглобіну (НЬО₂) Fe²⁺ в крові</i>	419
	<i>Лабораторна робота 4.24. Дослідження вмісту карбоксигемоглобіну (НЬСО) Fe²⁺ в крові</i>	420
	Рекомендована література	422
Частина V	ЗАБЕЗПЕЧЕННЯ ЯКОСТІ ДІЯЛЬНОСТІ БІОХІМІЧНОЇ ЛАБОРАТОРІЇ	425
5.1.	<i>Стандарти для лабораторій, їх загальні положення (ISO 9001, ISO/IEC17025, ISO 15189, GLP)</i>	425
5.1.1.	Введення в забезпечення якості	425
5.1.2.	Система менеджменту якості, забезпечення якості і контролю якості	426
5.1.3.	Стандарти та їхні основні положення	428
5.1.4.	Загальні положення стандартів ISO 9001, ISO/IEC 17025 та ISO 15189	429
5.1.5.	Положення стандарту ISO 9001	430
5.1.6.	Положення стандарту ISO/IEC 17025	432
5.1.7.	Положення стандарту ISO 15189	432
5.2.	<i>Відбір проб та підготовка до аналізу</i>	434
5.2.1.	Важливість відбору проб	434
5.2.2.	Ідентифікація видів проб	436
5.2.3.	Суть і значення планів відбору проб	440
5.2.4.	Нормативні і юридичні вимоги	441
5.2.5.	Види відбору проб	443
5.2.6.	Кількість проб і розмір проби	445
5.2.7.	Невизначеність відбору проби	446
5.2.8.	Кількість первинних проб	447
5.3.	<i>Валідації аналітичних методик та правиль-</i>	

	ність проведення вимірювань	448
5.3.1.	Селективність	453
5.3.2.	Діапазон вимірювань	454
5.3.3.	Звіт валідації та документація	458
5.3.4.	Організація лабораторного процесу	460
5.4.	Правила проведення контролю якості та обробка даних	479
5.4.1.	Контроль якості	479
5.4.2.	Лабораторне середовище	482
5.4.3.	Планування лабораторії	483
5.4.4.	Обладнання, скляний посуд і пристосування	484
5.4.5.	Хімічні реактиви та витратні матеріали	491
5.4.6.	Технічне обслуговування та калібрування обладнання	494
5.4.7.	Основи статистики	497
	Контрольні питання	506
	Рекомендована література	507
Частина VI	Стандарти і стандартизація в біохімічній лабораторній практиці	509
	Обладнання, посуд і техніка безпеки роботи в лабораторії	509
	Вимоги до роботи з біологічним матеріалом	512
	Методи визначення вуглеводів	512
	Методи визначення жирів	515
	Методи визначення білка	519
	Методи визначення ензимів	521
	Методи визначення вітамінів	522
	Методи визначення нуклеїнових кислот	522
	Методи визначення якості води, рН і мінеральних речовин	524
	Методи визначення мікотоксинів, пестицидів та радіонуклідів	531
	Додатки	532
	Умовні скорочення	565

ВСТУП

Ветеринарна біохімія – наука, яка вивчає класичні питання біологічної хімії та їх застосування у прикладній ветеринарії. Мета навчальної дисципліни – надати необхідні теоретичні знання й практичні уміння з питань методології проведення різноманітних біохімічних досліджень та комплексної оцінки індикаторних показників різного біологічного матеріалу, отриманого від хворих тварин, для визначення функціонального стану їх організму і лабораторної діагностики хвороб різних систем і органів, правильної інтерпретації одержаних результатів, а також забезпечення якості функціонування біохімічних лабораторій.

Практичне використання біохімічних методів в діагностичних лабораторіях потребує підготовки висококваліфікованих спеціалістів у ветеринарії та суміжних областях біології, аналітичної хімії, медицині тощо. Біохімічним методам притаманна висока чутливість і точність. Все це обумовлює необхідність створення відповідної сучасної навчальної літератури.

Нині існує ряд підручників і навчальних посібників, методичних вказівок, де описані біохімічні методи, що використовуються для аналізу речовин у лабораторній діагностиці хвороб тварин. Але в багатьох із них наведені розрізнені, несистематизовані відомості, в певних випадках вони перенавантажені теоретичними викладками.

Автори цього навчального посібника орієнтувалися на те, щоби надати не тільки огляд відповідної науково-методичної літератури з біохімії, але й на висвітлення практичних аспектів найважливіших модифікацій методів лабораторного аналізу. Певні етапи використання цих методів викладені детально, що дозволяє відносно легко їх відтворити в експериментальних дослідженнях.

Навчальний посібник складається з шести частин. У першій з них наведено матеріал стосовно загальної характеристики, теоретичних основ та застосуванню методів біохімічних досліджень. Зазначена частина складається з розділів, в яких викладені теоретичні основи та загальні принципи цих методів, їх класифікація та використання в сучасних біохімічних лабораторіях. Зокрема, розглядаються теоретичні та практичні аспекти використання об'ємно-аналітичних, електрохімічних, оптичних та хромато-

графічних методів аналізу речовин у різному біологічному матеріалі.

У другій частині навчального посібника наведені методики (лабораторні роботи) проведення практичних експериментальних досліджень описаними вище методами. Особлива увага приділена роботам щодо визначення показників якості та безпеки продукції АПК. Запропонований підхід сприяє не тільки засвоєнню теоретичного матеріалу, але і набуттю практичних навичок, що необхідні для проведення експериментальних досліджень.

У третій частині посібника наведено матеріали стосовно лабораторної діагностики порушень метаболізму в організмі тварин при патології внутрішніх органів із використанням біохімічних методів дослідження. Важливе місце посідають концептуальні, теоретичні та методологічні основи ветеринарної біохімії; описано специфіку отримання нових результатів біохімічних досліджень за допомогою найсучасніших методів та приладів у лабораторній діагностиці на національному та міжнародному рівнях; зазначаються молекулярні механізми патогенезу найпоширеніших хвороб тварин; особливості впливу фізіологічних, вікових, породних, сезонних та інших факторів на біохімічні процеси в організмі здорових тварин та обумовлені ними зміни біохімічних показників; правила забору проб біоматеріалу, належні умови його зберігання і транспортування до лабораторії; діагностичне значення результатів біохімічного дослідження біологічного матеріалу та його залежності від ступеня зв'язку досліджуваного параметра з патологічним процесом; індикаторні біохімічні показники (біохімічні констеляції) найпоширеніших патологічних процесів та хвороб тварин; доаналітичний, аналітичний та постаналітичний етапи контролю діагностичною лабораторією якості процесу отримання біохімічних показників; чинні державні та Міжнародні стандарти у лабораторній справі.

У четвертій частині навчального посібника наведено методики (лабораторні роботи) проведення конкретних експериментальних досліджень біохімічними методами. Особлива увага приділена опису робіт щодо визначення індикаторних показників, що дозволяють охарактеризувати стан здоров'я тварини та індивідуальні особливості патогенезу окремих хвороб внутрішніх органів. Такий підхід сприяє не тільки засвоєнню теоретичного матеріалу, але і

набуттю практичних навичок, які необхідні для проведення експериментальних досліджень.

У п'ятій частині посібника представлено теоретичний матеріал, який присвячено питанням забезпечення якості діяльності біохімічних лабораторій. Насамперед, це: стандарти для лабораторій, їх загальні положення (ISO 9001, ISO/IEC17025, ISO 15189, GLP); відбір проб та їх підготовка до аналізу, валідації аналітичних методик і правильність проведення вимірювань, а також правила проведення контролю якості та способи обробки даних.

У навчальному посібнику наведено також «Контрольні питання» і «Тести контролю знань» для самоконтролю, список «Рекомендованої літератури» до кожної частини, в якому представлено, зокрема, джерела, де описані спеціальні теоретичні питання, а також опис лабораторних робіт. Водночас теоретичний матеріал доповнено інформацією щодо стандартів і стандартизації в біохімічній лабораторній практиці (частина VI), додатками і списком умовних скорочень, що поліпшує засвоєння представлених питань.

За змістом, стилем, формою текстового та ілюстративного оформлення навчальний посібник орієнтований на аспірантів і молодих спеціалістів в області ветеринарії та її суміжних спеціальностей, які будуть працювати або вже працюють в діагностичних лабораторіях із використанням біохімічних методів аналізу речовин.

Автори висловлюють щирю вдячність усім, хто сприяв виданню цього навчального посібника, висловив критичні зауваження і побажання для його покращення. Вони будуть також вдячні всім, хто надасть будь-які пропозиції стосовно доповнення змісту навчального посібника, що не залишиться поза уваги.

ЧАСТИНА I

БІОХІМІЧНІ МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ У ВЕТЕРИНАРІЇ

1.1. ОБ'ЄМНО-АНАЛІТИЧНІ МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

В основі кількісного хімічного аналізу лежить проведення хімічних реакцій між зразком, який досліджується, та підібраними й приготовленими реактивами. За кількістю витрачених реактивів або здобутих продуктів реакції розраховують склад аналізованого зразка.

Хімічний аналіз поділяють на *ваговий та об'ємний*. Ваговий (*гравіметричний*) аналіз базується на повному (кількісному) виділенні будь-якого компонента з аналізованого зразка у вигляді певної речовини з наступним точним зважуванням.

Об'ємний (*титриметричний*) аналіз ґрунтується на точному визначенні об'єму розчину речовини (відомої концентрації), який необхідний для повного перебігу реакції з даним об'ємом досліджуваного розчину. Кількість речовини у розчині визначають титруванням – до розчину з аналізованою речовиною поступово приливають розчин з точно відомою концентрацією речовин. Кінцеву точку титрування (*точку еквівалентності*) визначають за використання індикаторів чи фізико-хімічними методами (за електропровідністю, світлопропусканням тощо). За кількістю робочого розчину, що пішов на титрування, розраховують результати аналізу.

Типи титрування:

- *Пряме титрування* – розчин досліджуваної речовини безпосередньо титрують стандартним розчином (титрант).

- *Зворотне титрування* застосовують тоді, коли речовина, яка визначається, не реагує з титрантом. У цьому випадку до досліджуваного розчину додають надлишок (певний об'єм) розчину третьої речовини відомої концентрації, яка реагує з досліджуваною речовиною в еквівалентній кількості. Надлишок третьої речовини відтитровують стандартним розчином.

- *Замісне титрування* застосовують, якщо речовина, яка визначається, не взаємодіє з титрантом або реагує з ним не в стехіометричному відношенні. У цьому випадку до досліджуваного роз-

чину додають спочатку явний надлишок реагенту, а потім титрують один з продуктів реакції титрантом.

1.1.1. Способи вираження концентрації розчинів

Розчини готуються з розрахункових кількостей окремих компо-нентів. При цьому тверді речовини беруться за масою, а рідкі – за об'ємом. Залежно від точності роботи речовини відважують на техніко-хімічних чи аналітичних вагах, а рідину відмірюють мірними циліндрами чи скляними або автоматичними піпетками. Для розчинення наважки використовують колби чи хімічні стакани, або циліндри.

Для приготування розчину з певною концентрацією придатні лише ті речовини, які можуть бути отримані у чистому вигляді, мають постійний склад, не змінюються на повітрі та при зберіганні. До таких речовин належать багато солей (калію біхромат, натрію хлорид та ін.), кислот (щавлева, бурштинова). Речовини, які задовільняють перелічені вимоги, називаються *вихідними* або *стандартними*.

Кожний розчин має якісну та кількісну характеристику. Кількісний склад розчину визначається кількісним співвідношенням розчинника та розчиненої речовини і виражається кількістю або концентрацією розчинених речовин в одиниці об'єму.

Концентрація розчинів виражається найчастіше у відсотках — вагових, об'ємно-вагових або об'ємних, у грам-молях на 1 дм³ розчину, грам-еквівалентах на 1 дм³ розчину та титром.

Відсоткові розчини – це розчини, в яких концентрація визначається кількістю речовини в грамах у 100 г розчину (вагова відсоткова концентрація, m_b/m_a), кількістю речовини в грамах у 100 см³ розчину (об'ємно-вагова концентрація, m_b/V), кількістю мілілітрів розчиненої речовини у 100 см³ розчину (об'ємна концентрація, V/V):

$$C_{\%} = \frac{m_b}{m_a + m_b} \cdot 100\%$$

де m_b – маса розчиненої речовини; m_a – маса розчинника.

Молярні розчини (C_M або M) – це розчини, в 1 дм³ яких міститься певне число грам-молекул розчиненої речовини:

$$C_M = m/(V \cdot M),$$

де m – маса розчиненої речовини, г;

V – об'єм розчину, л;

M – молекулярна маса речовини.

Грам-молекула – це кількість речовини в грамах, яка чисельно дорівнює відносній молекулярній масі цієї речовини. Наприклад, молекулярна маса NaCl становить 58,45, тому грам-молекула NaCl дорівнює 58,45.

Користуватися молярними розчинами зручно в тому розумінні, що за однакової молярної концентрації рівні об'єми розчинів різних речовин містять однакове число молекул.

Нормальні розчини – це розчини, в 1 дм³ яких міститься грам-еквівалент розчиненої речовини (позначаються – n , або N):

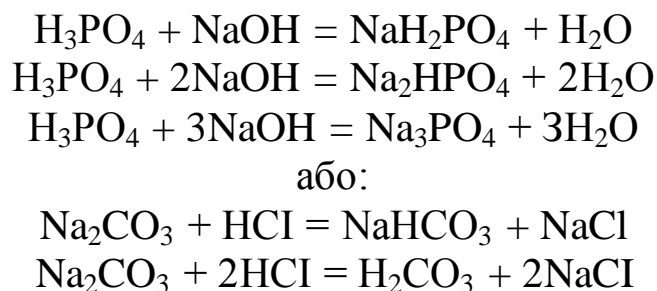
$$C_N = m/(V \cdot E).$$

Грам-еквівалент (г·екв.) – це кількість грамів речовини, еквівалентна (хімічно рівноцінна) грам-атому або грам-іону Гідрогену (1,008 г) у цій реакції. При визначенні еквівалента елемента необхідно виходити з його сполуки з Гідрогеном. Еквівалент можна розрахувати за складом сполуки даного елемента з будь-яким іншим, еквівалент якого відомий.

Грам-еквівалент розраховується шляхом ділення молекулярної маси речовини (M) на число зарядів або електронів (n), які беруть участь у відповідній реакції:

$$E = M/n.$$

З цього випливає, що грам-еквівалент однієї і тієї ж речовини, яка вступає в різні реакції, може бути різним. Наприклад:



Грам-еквівалент речовини, яка бере участь в окисно-відновних реакціях, дорівнює молекулярній масі, поділеній на число відданих або прийнятих молекулою речовини електронів.

Через те, що хімічні речовини взаємодіють в еквівалентних кількостях, розчини однакової нормальності реагують у рівних об'ємах. У загальному випадку об'єми розчинів речовин, що про-реагували, обернено пропорційні їхнім нормальностям:

$$V_1/V_2=N_2/N_1 \quad \text{або} \quad N_1 \cdot V_1 = N_2 \cdot V_2.$$

Титровані розчини. *Титр* – це кількість грамів розчиненої речовини в 1 см³ розчину; він розраховується шляхом поділу маси на об'єм (г/см³):

$$T = m/V.$$

Титр розчину за його нормальністю розраховують за формулою:

$$T=N \cdot E/1000,$$

де N – нормальність розчину, E – еквівалент розчиненої речовини.

Титр розчину за його відсотковою концентрацією розраховують за формулою:

$$T=C_{\%} \cdot \rho/100,$$

де $C_{\%}$ — концентрація у відсотках; ρ — густина розчину, г/см³.

За точністю вираження концентрації розчини поділяють на *точні й наближені*. Точними розчинами вважаються молярні, нормальні і титровані; вони використовуються переважно для аналітичних досліджень. До наближених належать розчини, концентрація яких виражена у вагових або об'ємних відсотках.

1.1.2. Визначення густини розчинів

При виконанні тих чи інших біохімічних досліджень часто доводиться визначати густину деяких рідин – розчинів, кислот,

спиртів, твердих та газоподібних речовин, а також біологічних речовин – сечі, молока тощо.

Густина (питома маса) – це відношення маси речовини до її об'єму; вона показує, у скільки разів маса аналізованої рідини більша або менша, ніж маса води, взятої в такому ж об'ємі:

$$\rho = \frac{m}{V},$$

де ρ – густина речовини, г/см³;

m – маса речовини, г;

V – об'єм тіла, см³.

Розрізняють абсолютну та відносну густину. *Абсолютна густина* виражається в кілограмах на кубічний метр (кг/м³). *Відносна густина* – це відношення густини досліджуваної речовини до густини дистильованої води при $t = 4^{\circ}\text{C}$ (іноді – іншої сполуки):

$$d = \frac{\rho_{\text{речовини}}}{\rho_{\text{води}}}.$$

У повсякденній практиці звичайно користуються відносною густиною. Визначати відносну густину рідин можна за допомогою ареометрів (рис. 1.1).



Рис. 1.1. Ареометри різних типів

Ці вимірювальні прилади являють собою скляну трубку, яка розширюється донизу і заповнена свинцевим дробом, ртуттю або іншим важким матеріалом. У верхній, тоншій частині є шкала з поділками, яка показує густину рідини. При визначенні густини ареометр занурюється в розчин тим глибше, чим менша густина розчину. Іноді ареометри оснащені термометрами, що дозволяє одночасно вимірювати і температуру.

Густина розчину залежить і від температури: при її зниженні відносна густина збільшується, а при підвищенні – зменшується. Тому всі виміри густини розчинів слід проводити при постійній температурі. Густина розчину, як правило, залежить від концентрації: вона збільшується зі збільшенням концентрації розчиненої речовини.

1.1.3. Види титриметричного аналізу

В основі титриметричного аналізу покладено такі типи хімічних реакцій:

- **нейтралізації** (*кисотно-лужне титрування*) – нейтралізація – реакції зі зміною рН розчинів.

- **окиснення-відновлення** (*перманганатометрія, йодометрія, хроматометрія*) – реакції, які протікають зі зміною окиснювально-відновних потенціалів в системі титрування.

- **осадження** (*аргентометрія, роданідометрія, меркуриметрія*) – реакції, які протікають з утворенням малорозчинної сполуки, при цьому змінюються концентрації осаджуваних іонів в розчині.

- **комплексоутворення** (*комплексонометрія*) – реакції, які засновані на утворенні комплексних сполук іонів металів (всіх, окрім одновалентних) з комплексоном. При цьому змінюються концентрації іонів металів в розчині, який титрується.

1. Метод нейтралізації. Основною реакцією в методі нейтралізації є реакція взаємодії іонів водню H^+ і гідроксид-іонів OH^- . Тому суть реакції нейтралізації полягає в перенесенні іонів водню (протонів) від кислоти до лугу. Кисотно-лужні реакції супроводжуються зміною концентрації іонів водню, які визначаються у методах кислотно-лужного титрування.

Використовуючи розчин будь-якої кислоти (органічної або неорганічної), можна визначати кількість лугу (*ацидиметрія*), а використовуючи титровані розчини лугів – кислоти (*алкаліметрія*).

За допомогою цього методу визначають також деякі солі, що мають сильнолужну реакцію внаслідок гідролізу і тому титруються кислотами (наприклад Na_2CO_3 , $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$).

При титруванні за методом нейтралізації, по-перше, слід зафіксувати момент, коли кислотність або лужність розчину досягне потрібного значення, а по-друге, визначити, за якого рівня кислотності або лужності розчину титрування слід закінчувати.

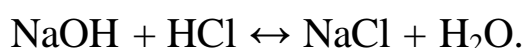
Момент закінчення реакції титрування, тобто *точку еквівалентності*, як правило, визначають за зміною кольору індикатора – речовини, яка змінює своє забарвлення залежно від значення рН розчину. Очевидно, що відповідно до того, в кислому або лужному середовищі знаходиться індикатор, його власна дисоціація буде зменшуватись або зростати, про що і свідчити колір розчину (табл. 1.1).

Таблиця 1.1. – Залежність кольору індикатора від рН розчину

Індикатор	Колір розчину		рН розчину
	у кислому середовищі	у лужному середовищі	
Метилловий оранжевий	Рожевий	Жовтий	3,1–4,4
Метилловий червоний	Червоний	Жовтий	4,2–6,2
Лакмус	Червоний	Синій	5,0–8,0
Нейтральний червоний	Червоний	Жовтий	6,8–8,0
Фенолфталеїн	Безбарвний	Червоно-фіолетовий	8,2–10

Титрування закінчують у різних середовищах залежно від сили кислот і лугів, що нейтралізуються.

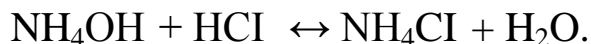
1. Титрування сильного лугу сильною кислотою, або навпаки. Наприклад, розчин NaOH титрують розчином HCl :



Утворений NaCl є сіллю сильного лугу і сильної кислоти, яка не піддається гідролізу, і тому в точці еквівалентності рН розчину не змінюється і дорівнює 7.

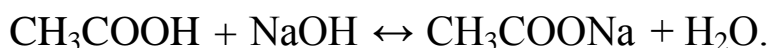
Найбільш придатним індикатором у цьому разі є лакмус або нейтральний червоний, але, якщо в розчині присутній CO_2 , застосовують метиловий оранжевий; за відсутності CO_2 можна титрувати з фенолфталеїном.

2. Титрування слабкого лугу сильною кислотою, або навпаки. Наприклад, розчин NH_4OH титрують розчином HCl :



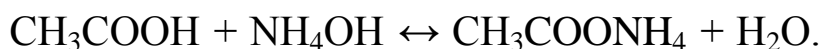
Унаслідок гідролізу утвореної солі слабкого лугу і сильної кислоти NH_4Cl у точці еквівалентності розчин має слабо кислу реакцію ($\text{pH} = 5,2$). Тому при титруванні слід застосовувати індикатор з інтервалом переходу забарвлення за pH 4,4–6,2, тобто метиловий червоний.

3. Титрування слабкої кислоти сильним лугом, або навпаки. Наприклад, розчин CH_3COOH титрують розчином NaOH :



У точці еквівалентності внаслідок гідролізу утвореної солі слабкої кислоти і сильного лугу CH_3COONa реакція розчину слабо лужна ($\text{pH} \approx 8,9$). Тому при титруванні слід застосовувати індикатор з інтервалом переходу забарвлення за pH 8,2–10,0, тобто фенолфталеїн.

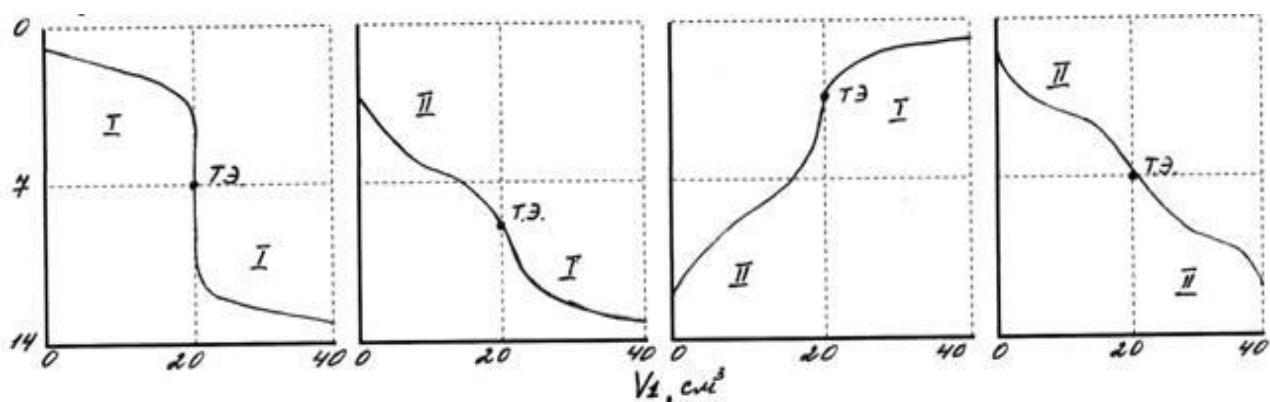
4. Титрування слабкої кислоти слабким лугом, або навпаки. Наприклад, розчин CH_3COOH титрують розчином NH_4OH :



У точці еквівалентності реакція середовища нейтральна. Теоретично таке титрування треба проводити, застосовуючи індикатор з інтервалом переходу забарвлення за pH 7,0, але практично таке титрування неможливе, тому що в точці еквівалентності не відбувається різкої зміни pH розчину, внаслідок чого забарвлення індикатора також не змінюється. Пояснюється це тим, що слабодисоційовані кислоти й луги не здатні спричинити різкої зміни дисоціацій індикатора.

Залежність рН титрованого розчину від об'єму прилитого розчину лугу і його концентрації зручно виражати графічно, відкладаючи по осі ординат значення рН, а по осі абсцис – об'єми лугу.

Крива, яка виражає зміну значення рН титрованого розчину в залежності від об'єму прилитого робочого розчину називається кривою титрування. Горизонтальну лінію, яка проходить через точку, що відповідає $\text{pH} = 7$, називають лінією нейтральності, а вертикальну, яка проходить через точку еквівалентності, – лінією еквівалентності. Форма кривої титрування буде визначатися характером взаємодії титруемого і робочого розчину, тобто силою кислоти і лугу (рис.1.2).



**Сильної
кислоти
сильною
основою**

**Слабкої
кислоти
сильною
основою**

**Слабкої
основи
сильною
кислотою**

**Слабкої
кислоти
слабкою
основою**

Рис. 1.2. Криві титрування

Момент закінчення титрування встановлюють за зміною кольору кислотно-основного індикатора. Індикатор слід вибирати у відповідності з кривою титрування таким чином, щоб стрибок титрування відповідав інтервалу переходу індикатора в точці еквівалентності. Точку еквівалентності можна також встановлювати за допомогою спеціальних приладів, наприклад рН-метрів.

2. Методи оксидиметрії. При оксидиметричному титруванні використовуються реакції окиснення-відновлення, які супроводжуються переходом електронів від одних молекул, атомів, іонів (відновників) до інших (окисників). Унаслідок цього змінюються ступені окиснення атомів, що входять до складу реагуючих речовин. *Окиснення* – це процес віддачі електронів, а *відновлення* –

процес їх приєднання. Тому ступінь окиснення атома зростає при окисненні і зменшується при відновленні.

Робочими розчинами в оксидиметрії є розчин окисників (KMnO_4 , I_2 , $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$, KBrO_3 та ін.) і відновників ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, SnCl_2 , NaAsO_2 та ін).

Усі методи оксидиметрії класифікують залежно від окисника або відновника, які використовуються в робочому розчині. Наприклад, якщо метод базується на окисненні перманганатом, його називають *перманганатометрією*, на окисненні йодом – *йодометрією*, на окисненні хроматом – *хроматометрією* та ін.

Йодометрія. Вільний йод здатен забирати електрони від речовин, які легко їх віддають (відновники), і тому є окисником. Іони I^- під впливом речовин, які здатні приєднувати електрони – окисників, легко віддають їх і виступають таким чином як відновники.

Виходячи з цього, можна констатувати, що метод йодометрії ґрунтується на окисно-відновних процесах, які пов'язані з перетворенням елементарного) йоду на іони I^- , або навпаки. Речовини, які окиснюються, можна визначати за кількістю вільного йоду, який вступає в реакцію з ними. Відновлюючі речовини визначаються за кількістю виділеного при реакції з ними вільного йоду. Таким чином, визначаючи кількість йоду до і після реакції можна обчислити кількість окисненої або відновленої речовини.

Як робочий розчин застосовують розчин натрію тіосульфат $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ та йоду, а індикатором служить крохмаль.

3. Методи осадження. Методами осадження називають методи об'ємного аналізу, які ґрунтуються на використанні реакцій, що супроводжуються випадінням осаду.

Реакції осадження належать до оборотних іонообмінних реакцій. Вони відбуваються в тому випадку, коли протилежно заряджені іони двох розчинних речовин-електролітів утворюють малорозчинну речовину.

Але як відомо, випадінням осаду супроводжується досить велика кількість хімічних реакцій, проте далеко не всі з них можуть бути використані для об'ємно-аналітичних визначень. Багато подібних реакцій не відповідають певним вимогам щодо характеру осаду, повноти осадження, можливості підбору відповідного індикатора.

Необхідною умовою придатності реакцій осадження для об'ємних визначень, як і у випадку інших об'ємно-аналітичних

лоіндикатори органічної природи – мурексид, еріохром чорний Т (хромоген спеціальний ЕТОО), кислотний хром темно-синій та деякі інші. Їхній колір різко відрізняється від кольору розчину самого індикатора. Поблизу точки еквівалентності, коли майже всі катіони, що визначаються, зв'язуються з комплексонами в комплекс, тобто концентрація іонів, що визначаються, різко зменшується, забарвлення розчину змінюється.

Методично комплексометричні визначення можна проводити прямим або зворотнім титруванням. При прямому визначенні титрування проводять за певного значення рН стандартним (робочим) розчином ЕДТА. Точку еквівалентності встановлюють за допомогою металоіндикаторів, де початковий колір комплексної сполуки, яка утворена індикатором з катіоном, що визначається, зникає і з'являється забарвлення, яке властиве вільному індикатору. При зворотному титруванні до аналізованого розчину додають вимірний об'єм стандартного розчину ЕДТА, надлишок якого відтитрують стандартним розчином солі цинку. Користуючись методами комплексоутворення можна кількісно визначати катіони (Ag^+ , Hg^{2+} , Al^{3+} та ін.) та аніони (CN^- , F^- , Cl^- та ін.), які здатні вступати в реакцію комплексоутворення.

1.2. ЕЛЕКТРОХІМІЧНІ МЕТОДИ АНАЛІЗУ

Електрохімічні методи аналізу (ЕХМА) – група методів кількісного хімічного аналізу, в основі яких лежать електрохімічні процеси. Для них характерні висока чутливість і селективність, швидкість відгуку на зміну складу аналізованого об'єкта, легкість автоматизації та можливість дистанційного управління. І, нарешті, вони не вимагають дорогого аналітичного устаткування і можуть застосовуватися в лабораторних і виробничих умовах.

Електрохімічні методи аналізу засновані на дослідженні процесів, що протікають на поверхні електрода або в навколоелектродному просторі. Аналітичним сигналом служить електричний параметр (електричний потенціал, сила струму, опір та ін.), який піддається вимірюванню. За вимірюваним електричним параметром системи, ЕХМА поділяють на *потенціометрію* (вимірюють E , V при $I = 0 A$), *вольтамперометрію* (вимірюють I , A як функцію від накладеного зовні E , V), *кулонометрію* (вимірюють Q , $Kл$ при $I = const$ або $E = const$), *кондуктометрію* (вимірюють W , $См$ або $Ом^{-1}$). Деякі електрохімічні методи використовуються для визначення кінцевої точки титрування (*амперметричне титрування*, *кондуктометричне титрування*, *кулонометричне титрування*).

1.2.1. Вольтамперометрія

Вольтамперометрія – це електрохімічний метод якісного та кількісного аналізу, який ґрунтується на реєстрації вольт-амперних кривих (вольтамперограм) – залежності між силою електричного струму I у ланцюзі і напругою E при електролізі розчину досліджуваної речовини. У розчин занурюють індикаторний мікроелектрод, на якому досліджувана електрохімічно активна (електроактивна) речовина – деполяризатор відновлюється чи окиснюється, і неполяризований допоміжний електрод порівняння, потенціал якого залишається практично незмінним при електролізі.

Залежно від типу індикаторного електрода розрізняють *полярографію* (ртутний капаючий мікроелектрод, а спеціальний прилад – *полярограф*) та *вольтамперометрію* (будь-який мікроелектрод, крім капаючого ртутного). Вольтамперметричні методи, залежно від способу проведення аналізу, поділяють на прямі та непрямі (*амперметричне титрування*). Зміна електричного потенціалу мікро-

електрода під дією прикладеної напруги спричиняє виникнення струму у ланцюзі. Вольтамперометрію застосовують: для кількісного аналізу неорганічних і органічних речовин у дуже широкому інтервалі – від 10^{-10} до десятків %.

З метою зменшення електричного опору розчину до нього додають надлишок індиферентного електроліту (фонового), іони якого не відновлюються і не окиснюються в умовах електролізу. Фоновий електроліт також дозволяє усунути міграційний струм, який виникає за рахунок міграції частинок деполяризатора під дією електричного поля.

1.2.2. Кондуктометрія

Кондуктометричні методи аналізу засновані на вимірюванні електропровідності досліджуваних розчинів і застосовуються для визначення концентрації солей, кислот, лугів і т. д. *Електропровідність* – здатність речовини проводити електричний струм. Обернена їй величина називається *електричним опором*. Електропровідність (іонна провідність) розчину (W) обернена величині опору (R):

$$W=1/R.$$

Одиниця виміру електропровідності – сіменс (См) або Ом^{-1} .

Більшість рідин не мають вільних носіїв заряду і є діелектриками. Виняток становлять електроліти, наприклад вода чи розчини солей у воді. В електролітах частина нейтральних молекул дисоціює, утворюючи негативно та позитивно заряджені іони. Електропровідність електролітів зумовлена рухом цих іонів до аноду і катоду, відповідно. Електропровідність електроліта є адитивною величиною, тобто визначається властивостями всіх іонів, які присутні в розчині. Електропровідність залежить від кількості носіїв заряду в одиниці об'єму розчину (концентрації), їх складу та рухомості. Отже, електропровідність розчину є показником концентрації розчиненої речовини, а вимірювання електропровідності розчинів може бути використане для кількісного визначення хімічного складу розчину (кондуктометрія).

В аналітичній хімії користуються *питомою електропровідністю* (χ) – здатністю розчину електроліту проводити електричний струм – величина, яка обернена *питомому опору* розчину (ρ).

$$\chi = 1/\rho.$$

У Міжнародній системі одиниць СІ питома електропровідність вимірюється в сименсах на метр ($\text{См}\cdot\text{м}^{-1}$) чи в $\text{Ом}^{-1}\cdot\text{м}^{-1}$.

Величина питомої електропровідності електроліту залежить від ряду факторів: природи електроліту, температури, концентрації розчину.

Для виключення впливу концентрації на величину електропровідності введено поняття молярної електропровідності:

$$\Lambda = \chi/C.$$

Молярна електропровідність (Λ) – це електропровідність молярного розчину вміщеного між двома електродами площею 1 м^2 , які знаходяться на відстані 1 м один від одного. Одиницею виміру Λ в системі одиниць СІ є $\text{Ом}^{-1}\cdot\text{м}^2\cdot\text{моль}^{-1}$. Якщо кількість речовини виражають в моль-екв, то величину Λ називають *еквівалентною електропровідністю* і виражають в $\text{Ом}^{-1}\cdot\text{м}^2\cdot\text{моль-екв}^{-1}$. Молярна електропровідність збільшується зі зменшенням концентрації електроліту і, за нескінченного розбавлення, коли взаємний вплив іонів майже відсутній, вона досягає максимального (граничного) значення:

$$\Lambda = \Lambda^0 + B\cdot\sqrt{C},$$

де Λ^0 – гранична молярна електропровідність, $\text{Ом}^{-1}\cdot\text{м}^2\cdot\text{моль}^{-1}$; B – емпіричний коефіцієнт.

Увага! При розрахунках в кондуктометрії поряд з одиницями СІ застосовують позасистемні одиниці виміру: відстань між електродами вимірюють в см, еквівалентну електропровідність – в $\text{Ом}^{-1}\cdot\text{см}^2\cdot\text{моль}^{-1}$ тощо. Тому, під час розв'язування задач, слід ретельно слідкувати за розмірностями всіх величин і за необхідності вводити в розрахункові формули відповідні коефіцієнти.

Залежність електропровідності розчинів електролітів від концентрації та природи заряджених частинок, що їх складають покладено в основу кондуктометричних методів аналізу.

Пряма кондуктометрія – метод, що дозволяє безпосередньо визначати концентрацію електроліту шляхом вимірювання електропровідності розчину з відомим якісним складом.

Враховуючи лінійний характер залежності питомої електропровідності розчинів від концентрації електролітів для практичного використання рекомендується цілий ряд експрес методів, заснованих на даному електрохімічному ефекті. Наприклад, на основі кондуктометрії розроблена методика визначення масової частки кухонної солі в сичужним сирі. При цьому в якості аналізованого об'єкта використовувалася водна витяжка сичужного сиру.

Кондуктометричне титрування – метод аналізу, заснований на визначенні вмісту речовини в процесі титрування аналізованого розчину порціями відомого реагенту до перегину кривої титрування. Криву будують за вимірюваннями питомої електропровідності аналізованого розчину, яка змінюється в результаті хімічних реакцій в процесі титрування.

Точність кондуктометричного титрування становить 1 %, але якщо вжити заходів щодо термостатування аналізованого розчину, то точність визначення можна в кілька разів збільшити. Точка еквівалентності на графіку обумовлюється перетином двох прямих. Одна пряма (до точки еквівалентності) відображає зміну концентрації аналізованого іона та іонів титранту, а інша (після точки еквівалентності) є наслідком збільшення концентрації іонів титранту.

Хронокондуктометричне титрування – засноване на визначенні вмісту речовини за витраченим на титрування часу, яке автоматично фіксується на діаграмній стрічці реєстратора кривої титрування.

Прилад, який використовується для вимірювання електропровідності електролітів (розчинів, колоїдних систем, розплавів), називається *кондуктометр* (рис. 1.3).

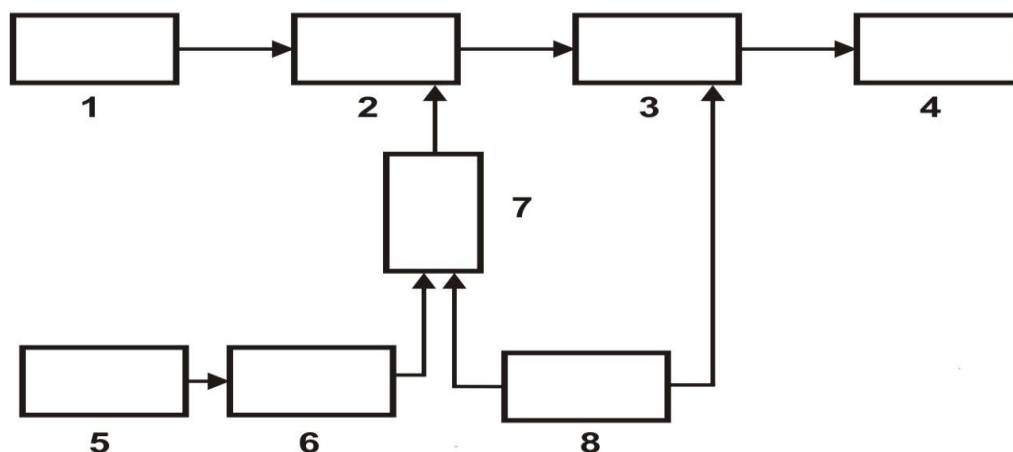


Рис. 1.3. Блок-схема кондуктометра АК-215: 1 – датчик електропровідності; 2 – перетворювач; 3 – синхронний детектор; 4 – нормуючий перетворювач 0–5 мА; 5 – датчик температур; 6 – нормуючий посилювач; 7 – електронний комутатор; 8 – генератор

Особливості кондуктометричних методів аналізу:

1. Можливість проводити визначення не тільки у прозорих, але і в забарвлених і каламутних розчинах, а також у присутності окислювачів, відновників органічних речовин.

2. Висока чутливість методу, що дозволяє працювати з розведеними розчинами.

3. Аналіз водних та органічних розчинів.

4. Можливість автоматизації процесу (хронокондуктометрія).

5. У багатьох випадках відсутність необхідності проводити попередню пробопідготовки.

6. Простота визначення кінцевої точки титрування.

7. Можливість проведення диференційованого титрування сумішей електролітів, що неможливо при титруванні з візуальною індикацією кінцевої точки титрування.

1.2.3. Потенціометрія

Потенціометричний метод – базується на залежності рівновісного потенціалу електрода від активності (концентрації) досліджуваного іона. Для реєстрації потенціалу необхідно скласти *гальванічний елемент* (ГЕ) з індикаторного електрода та електрода порівняння (потенціал якого не залежить від складу досліджуваного розчину) (рис. 1.4).

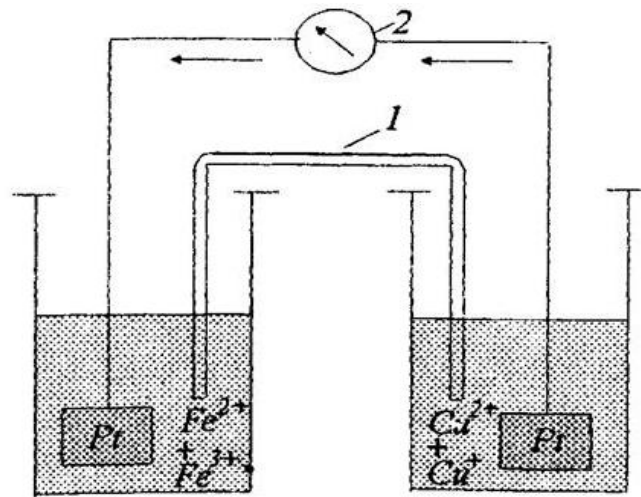


Рис. 1.4. Схема гальванічного елементу: 1 – соляний місток; 2 – мілівольтметр

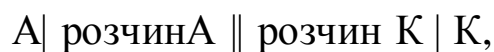
Електрорушійна сила (ЕРС) гальванічного елемента визначається рівнянням:

$$ЕРС = E_k - E_a$$

де E_k – потенціал катода (позитивний електрод ГЕ, на якому відбуваються процеси відновлення);

E_a – потенціал анода (негативний електрод ГЕ, на якому відбуваються процеси окиснення).

Схематично ГЕ, як і будь-яку електрохімічну комірку, записують наступним чином:



де А та К – матеріал, з якого виготовлено анод та катод, відповідно; розчин А – склад розчину, в який занурено відповідний електрод; знак \parallel застосовують якщо катодний і анодний простори розділені повністю (дифузійний потенціал елімінований за допомогою сольового містка), знак $|$ застосовують у випадку розділення катодного і анодного просторів напівпроникною мембраною.

Виміряти потенціал одного електрода не можливо, але можна виміряти різницю потенціалів індикаторного електроду та електроду порівняння – ЕРС редокс-пари.

При постійній величині потенціалу одного електроду за значенням електрорушійної сили можна визначити потенціал другого електроду редокс-пари. Електрод, потенціал якого порівнюється з

другим електродом у гальванічному елементі і умовно приймається рівним нулю називається *електрод порівняння* (стандартний електрод). У якості електродів порівняння використовують каломельні та хлорсрібні електроди.

Каломельний електрод складається з металевої ртуті і розчину калію хлориду, насиченому відносно ртуті хлористої (каломелі).

Хлорсрібний електрод складається із срібного дроту, покритого рівномірним шаром срібла хлориду в розчині, що містить калію хлорид до насичення. Потенціал цих електродів характеризується стійкістю під час проведення потенціометричного вимірювання, а зміна електрорушійної сили електродної пари буде залежати від потенціалу другого електроду пари.

Індикаторний електрод – це електрод, потенціал якого змінюється в залежності від концентрації іонів. Електроди поділяються наступним чином:

- електроди на основі рідких катіонів, наприклад, калій-, натрій-, кальцій-селективні електроди;
- електроди на основі рідких аніонів, наприклад, нітрат-, фосфат-, карбонат-селективні електроди;
- електроди з твердими мембранами, наприклад, фторидів лантану, берилію, бору, сульфідно- та галогенідо-селективні електроди;
- скляні електроди;
- газові електроди, що містять мембрану, яка проникна для газів, наприклад, O_2 , CO_2 , H_2S ;
- ензимні (ферментні);
- напівпровідникові.

Взагалі для кожної реакції, як правило підбирається відповідний індикаторний електрод. Цей вибір залежить від типу реакції, інтервалу змін рН, часу вимірювання тощо, наприклад: хінгідриновий, скляний – для реакцій нейтралізації; срібний і ртутний – для реакцій осадження і комплексоутворення; індиферентні метали (платина, паладій, золото) – для окисно-відновного титрування.

Рівновісний потенціал індикаторного електроду зв'язаний з активністю (у наближенні концентрації) іонів, які приймають участь в електродному процесі за рівнянням *Нернста*:

$$E = E^{\circ} + R \cdot T / (n \cdot F) \ln (a_{\text{окис}} / a_{\text{віднов}}),$$

де R – універсальна газова стала (8,31 Дж/(моль·К));

T – абсолютна температура;

F – постійна Фарадея (96500 Кл/моль);

n – число електронів, які беруть участь в реакції; $a_{\text{окис}}$, $a_{\text{віднов}}$ – активності відповідно окисненої та відновленої форм редокс-системи;

E° – стандартний потенціал редокс-системи.

Потенціометричний метод використовують для визначення концентрації іонів в розчині (*пряма потенціометрія*) та *потенціометричного титрування*, коли еквівалентну точку визначають за різкою зміною потенціалу.

Пряма потенціометрія. Методом прямої потенціометрії визначають концентрацію іонів водню (рН-метрія) і деяких інших іонів: K^+ , Na^+ , Cl^- , F^- , NH_4^+ (іономерія).

Для визначення рН частіше всього використовують скляні електроди. Вони являють собою трубку, до кінця якої припаяна кулька. Всередині електроду знаходиться хлористоводнева кислота (НСІ), насичений розчин $AgCl$ та срібний дріт, тому розчин має постійну активність (концентрацію) іонів Гідрогену. При вимірювання рН розчину між внутрішньою та зовнішньою поверхнями скляної мембрани виникає різниця потенціалів. При цьому потенціал внутрішньої поверхні залишається практично постійним, а потенціал зовнішньої поверхні залежить від рН розчину, який аналізується. Перевагами скляного електроду є простота роботи, швидке встановлення рівноваги та можливість визначення рН в окиснювально-відновних системах.

У прямій потенціометрії градуювання електрохімічної комірки полягає в тому, що її по черзі заповнюють стандартними розчинами іону (X), занурюють в неї іонселективний електрод та вимірюють $E_{ст}$. Із залежності $E_{ст}$ від $lgc(X)$ знаходять параметри E° та θ , а потім досліджуваному розчині вимірюють E_x та визначають:

$$lgc(X) = \frac{E_x - E^\circ}{\theta}$$

де θ – стала величина для конкретної електрохімічної комірки, яка близька до теоретичного значення, що підраховується як $R \cdot T / (n \cdot F)$.

Потенціометричне титрування. Потенціометричне титрування засноване на визначенні точки еквівалентності за результатами потенціометричних вимірів. Поблизу точки еквівалентності

відбувається різка зміна (стрибок) потенціалу індикаторного електроду. Так само, як і в інших титрометричних методах, реакції титрування потенціометра повинні протікати строго стехіометрично, мати високу швидкість і йти до кінця.

Для потенціометричного титрування збирають ланцюг з індикаторного електроду в аналізованому розчині і електроду порівняння. В якості електродів порівняння найчастіше використовують каломельний або хлорсрібний електроди. Тип індикаторного електроду залежить від властивостей розчину, що піддається титруванню, та його взаємодії з електродом.

Для знаходження точки еквівалентності часто будують диференціальну криву в координатах ($\Delta E/\Delta V - V$). На точку еквівалентності вказує максимум отриманої кривої, а відлік по осі абсцис, відповідний цьому максимуму, дає об'єм титранта (V), який витрачений на титрування до точки еквівалентності.

Основними перевагами методу потенціометричного титрування є висока точність і можливість проводити визначення в розбавлених розчинах, в каламутних і забарвлених середовищах, а також визначати декілька речовин в одному розчині без попереднього розділення. Значно розширюється сфера практичного застосування потенціометричного титрування при використанні неводних розчинників. Воно дозволяє аналізувати багатоконпонентні системи, які у водному розчині визначити не можливе, провести аналіз речовин, що нерозчинні або розкладаються у воді. Потенціометричне титрування легко може бути автоматизоване.

Серед недоліків методу можна відмітити не завжди швидке встановлення потенціалу після додавання титранту та необхідність у багатьох випадках проводити при титруванні велику кількість відліків.

У потенціометричному аналізі основними вимірювальними приладами є потенціометри різних типів. Вони призначені для виміру ЕРС електродної системи. Оскільки ЕРС залежить від концентрації (активності) відповідних іонів в розчині, багато потенціометрів дозволяють безпосередньо вимірювати також величину рХ – від'ємний десятичний логарифм концентрації іона Х. Такий потенціометр в комплекті з відповідним іон-селективним електродом носить назву *іономер*. Якщо потенціометр і електродна система призначена для вимірювання лише іонів водню, прилад називається *pH-метром* (рис. 1.5).

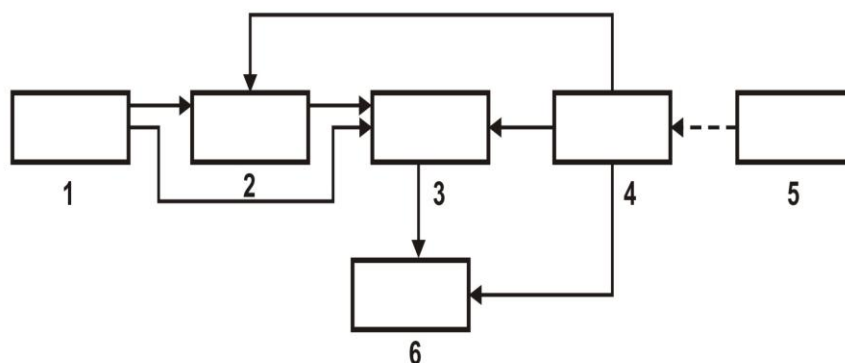


Рис. 1.5. Блок-схема рН-метра: 1 – гніздо для підключення електродної системи; 2 – вхідний посилювач; 3 – блок вимірювання; 4 – блок живлення; 5 – блок мережевого живлення; 6 – аналого-цифровий перетворювач і індикатор

РН-МЕТР РН-1014

Оснащується електродом для вимірювання рН м'яса. Можливе використання приладу для ветеринарно-санітарної експертизи.

Особливості:

- автоматична температурна компенсація показань;
- в пам'яті приладу зберігаються значення рН стандартних буферних розчинів;
- три незалежних режими роботи – рН-метр, термометр, мВ-метр;
- простота калібровки;
- корекція не лінійності електродної характеристики;
- зберігання результатів калібровки;
- можливість підключення електродів різних типів.



1.3. ОПТИЧНІ МЕТОДИ АНАЛІЗУ

Електромагнітне випромінювання оптичного діапазону – оптичне (світлове) випромінювання – термін поєднує видиме світло, інфрачервоне та ультрафіолетове випромінювання.

До оптичного діапазону відносяться електромагнітні хвилі з довжиною від 100 до 10000 нм, яке розділяють на три області :

- ультрафіолетову (УФ) 100–380 нм;
- видиму 380–760 нм;
- інфрачервону (ІЧ) 760–10000 нм.

Світло, як і інші електромагнітні хвилі характеризується *частотою, довжиною хвилі, поляризацією та інтенсивністю (визначається амплітудою хвилі)*. У вакуумі світло розповсюджується зі сталою швидкістю (~300 000 км/с). Швидкість поширення світла в речовині залежить від властивостей речовини і загалом менша від швидкості світла у вакуумі.

Світло, як електромагнітне випромінювання, має природу частки та хвилі одночасно. Випромінювання і поглинання світла відбувається квантами чи фотонами, енергія яких залежить від частоти:

$$E=h\cdot\nu=h\cdot c/\lambda,$$

де E – енергія кванта, ν – частота випромінювання, c – швидкість поширення електромагнітної хвилі у вакуумі, h – стала Планка ($6,62 \cdot 10^{-34}$ Дж/с), λ – довжина хвилі.

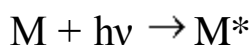
Випромінювання, яке має тільки одну довжину хвилі називається *монохроматичним*, а яке охоплює більший інтервал – *поліхроматичним*. Властивості світла, від яких залежить сприйняття кольору, обумовлені довжиною хвилі чи частотою. Кожний колір в однорідному середовищі відповідає певній довжині хвилі та частоті. При переході в інше середовище довжина хвилі може змінюватись, а частота – ні. Відповідність між характеристиками монохроматичного світла та кольорами подано в табл. 1.2.

Потік світлової енергії, потрапляючи на речовину, частково відбивається та проходить через шар поглинаючої речовини. При проходженні випромінювання через речовину відбувається селективне його поглинання із певними частотами.

Таблиця 1.2. – Відповідність частот електромагнітного випромінювання та кольорів

Колір	Діапазон довжин хвиль, нм	Діапазон частот, ТГц	Діапазон енергії фотонів, еВ
Фіолетовий	380–440	790–680	2,82–3,26
Синій	440–485	680–620	2,56–2,82
Блакитний	485–500	620–600	2,48–2,56
Зелений	500–565	600–530	2,19–2,48
Жовтий	565–590	530–510	2,10–2,19
Помаранчевий	590–625	510–480	1,98–2,10
Червоний	625–740	480–405	1,68–1,98

Поглинання електромагнітного випромінювання речовиною (М) можна представити наступним чином:

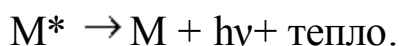


M^* - атом чи молекула у збудженому стані.

Час перебування в цьому стані дуже малий (10^{-9} – 10^{-10} с), а повернення до основного стану частіше всього супроводжується виділенням тепла:



Можливий розпад M^* з утворенням нових речовин – фотохімічна реакція. Крім того, повернення до основного стану супроводжується виділенням фотона – флуоресценція.



Оскільки час життя M^* дуже малий то концентрація цих часток в будь-який момент часу при нормальних умовах незначна, а кількість тепла, що виділяється, невідчутна. Тому опромінення системи в процесі випромінювання супроводжується мінімальними її пошкодженнями, що є перевагою абсорбційних методів.

При переході світла із одного середовища в інше змінюється швидкість його розповсюдження, що призводить до заломлення. Поряд із заломленням на межі двох середовищ світло може також

відбиватись. Заломлення та відбиття світла використовується в різноманітних оптичних приладах: призмах, лінзах, дзеркалах.

Закон Бугера-Ламберта-Бера. Потік світлової енергії, проходячи крізь речовину, послаблюється. При цьому інтенсивність початкового випромінювання I_0 зменшується до значення I . Відношення цих інтенсивностей називають *пропусканням* або *коефіцієнтом пропускання*.

$$T = I/I_0,$$

де I_0 інтенсивність падаючого світлового потоку, I – інтенсивність потоку світла, яке пройшло через речовину.

Пропускання виражають, як правило, у відсотках. Для абсолютно прозорих розчинів $T = 100\%$, для абсолютно непрозорих $T = 0$. Коефіцієнт пропускання пов'язаний із оптичною густиною співвідношенням:

$$T = 10^{-A} \quad \text{або} \quad A = -\lg T = -\lg I/I_0$$

Зниження інтенсивності залежить від концентрації речовини, що поглинає, та довжини шляху, який цей потік проходить. Зниження інтенсивності випромінювання при його проходженні через розчин підчиняється *закону Бугера-Ламберта-Бера*.

Згідно із цим законом:

$$\frac{I}{I_0} = 10^{-\varepsilon \cdot l \cdot c}$$

або

$$-\lg T = A = \varepsilon \cdot l \cdot c,$$

де A – оптична густина світопоглинання (екстинція);

l – оптичний шлях (см), який дорівнює товщині зразка (кювети, в якій поміщують розчин);

c – молярна концентрація розчину речовини (моль/дм³);

ε – молярний коефіцієнт поглинання речовини, що поглинає світло, при певній довжині хвилі падаючого світла.

Фізичний зміст молярного коефіцієнта поглинання дорівнює значенню A речовини з концентрацією 1 моль/дм³ при довжині оптичного шляху 1 см. Молярний коефіцієнт поглинання – індивіду-

альна характеристика речовини, він залежить від природи речовини та довжини хвилі і не залежить від концентрації та довжини кювети. Максимально можливе значення ϵ складає $\sim 10^5 \text{ дм}^3 \cdot \text{см}^{-1} \cdot \text{моль}^{-1}$.

У науковій літературі часто зустрічаються різні назви та позначення одних і тих же величин (табл. 1.3).

Таблиця 1.3. – Основні величини, які використовуються в абсорбційній спектроскопії

Величини і позначення	Визначення	Розмірність	Інша назва і позначення
Пропускання, T	I/I_0	безрозмірна	прозорість, T
Оптична густина, A	$\lg I_0/I$	безрозмірна	поглинання, D екстинкція, E
Молярний коефіцієнт поглинання, ϵ	A/c	$\text{дм}^3/\text{см} \cdot \text{моль}$	молярний коефіцієнт екстинкції, k
Товщина шару (довжина кювети), l	-	см	v, d

Закон Бугера-Ламберта-Бера лежить в основі визначення концентрації речовини за величиною їх екстинції. Однак не завжди спостерігається лінійна залежність між екстинцією A і молярною концентрацією c . Відхилення від основного закону світлопоглинання обумовлені двома причинами: немонохроматичністю потоку енергії і станом досліджуваної речовини.

Класифікація оптичних методів. До оптичних методів аналізу відносять фізико-хімічні методи, засновані на взаємодії електромагнітного випромінювання з речовиною. Ця взаємодія приводить до різних енергетичних переходів, які реєструються експериментально у вигляді поглинання випромінювання, віддзеркалення і розсіяння електромагнітного випромінювання.

У залежності від характеру взаємодії речовини з електромагнітним випромінюванням оптичні методи розділяють на :

- *абсорбційні* (засновані на вимірюванні поглинання речовиною світлового випромінювання). До них відносять колориметрію, фотоколориметрію, спектрофотометрію, атомно-адсорбційні методи;

- *емісійні* (засновані на вимірюванні інтенсивності світла, випромінюваного речовиною). До них відносяться флуориметрія, емісійний спектральний аналіз.

Методи, які пов'язані із взаємодією світлового випромінювання з суспензіями, поділяють на:

- *турбодиметрію* (заснована на вимірюванні інтенсивності світла, яке поглинається незабарвленою суспензією, вимірювання проводять прямо в пучку світла);

- *нефелометрію* (заснована на вимірюванні інтенсивності світла, яке відбивається або розсіюється забарвленою або незабарвленою суспензією, вимірювання проводять перпендикулярно до падаючого світла).

Методи, засновані на явищі поляризації молекул під дією світлового випромінювання ділять на :

- *рефрактометрію* (заснована на вимірюванні показника заломлення світла);

- *поляриметрію* (заснована на вимірюванні кута обертання площини поляризації поляризованого променя світла, що пройшов через оптично активне середовище).

Оптичні методи аналізу обумовлюють використання сучасних приладів різної складності, що дає ряд переваг у порівнянні з класичними хімічними методами: швидкість, простоту методики, використання невеликої кількості речовини для аналізу, можливість аналізувати сполуки будь-якої природи, проведення експрес аналізу багато компонентних сумішей. Крім того вони підвищують чутливість, точність і відтворюваність результатів.

1.3.1. Спектрофотометричні методи аналізу

До молекулярних абсорбційних методів відноситься фотометричний аналіз, який заснований на вимірюванні поглинання світла речовиною. Він включає саме *спектрофотометрію* (метод з використанням монохроматичного світла як у видимій, так і ультрафіолетовій та інфрачервоній частинах оптичного спектру) та *фотоелектроколориметрію* (метод, заснований на вимірюванні інтенсивності вузької смуги поліхроматичного світла у видимій частині оптичного спектру, яку виділяють, зокрема, світофільтрами).

Кожна речовина поглинає світло з певними (характерним лише для неї) довжинами хвиль, тобто довжина хвилі поглинутого світла

індивідуальна для кожної речовини і на цьому заснований якісний аналіз. Максимум поглинання світла в певній спектральній області є важливою оптичною характеристикою речовини, а весь спектр поглинання характеризує його якісну індивідуальність.

У забарвлених речовинах максимум поглинання світла частіше знаходиться у видимій частині спектру, проте він може бути і в ультрафіолетовій та ближній інфрачервоної області.

Вимірювання поглинання світла, яке проходить крізь досліджуваний розчин унаслідок адсорбції його досліджуваною речовиною здійснюють на спеціальних спектральних апаратах, у яких пробу речовини вміщують між джерелом світла та фотоелементом, що реєструє світло.

Фотоколориметрія. При фотоколориметричних методах аналіз здійснюється за поглинанням поліхроматичного світла за допомогою фотоелементів. Прилади для фотоколориметрії – фотоколориметри або фотоелектроколориметри. В фотоколориметрах є можливість часткової монохроматизації спектру світлофільтрами (див. далі). За їх допомогою обирають ділянку оптичного спектру в тій області довжин хвиль, де поглинання світла для даного розчину мінімальна. Світлофільтри обирають так, щоб максимум поглинання розчину відповідав максимуму пропускання світлофільтра (табл. 1.4).

Обчислення в фотометрії ґрунтуються на використанні формули:

$$C_x = \frac{C_{cm} \times D_x}{D_{cm}}$$

де C_x – вміст іону в розчині; C_{cm} – вміст іону в стандартному розчині; D_x – оптична густина аналізованого розчину; D_{cm} – оптична густина стандартного розчину.

Таблиця 1.4. – Колір розчину і відповідні їм світлофільтри

Колір розчину	Область максимального поглинання променів розчином, нм	Колір світлофільтра
Жовто-зелений	400-450	Фіолетовий
Жовтий	450-480	Синій
Оранжевий	480-490	Зелено-синій
Червоний	490-500	Синьо-зелений
Пурпурний	500-560	Зелений
Фіолетовий	560-575	Жовто-зелений
Синій	575-590	Жовтий
Зелено-синій	590-625	Оранжевий
Синьо-зелений	625-700	Червоний

Спектрофотометрія. Блок-схема найпростішого однопроменевого спектрофотометра наведена на рис. 1.6. Розглянемо більш детально його будову.

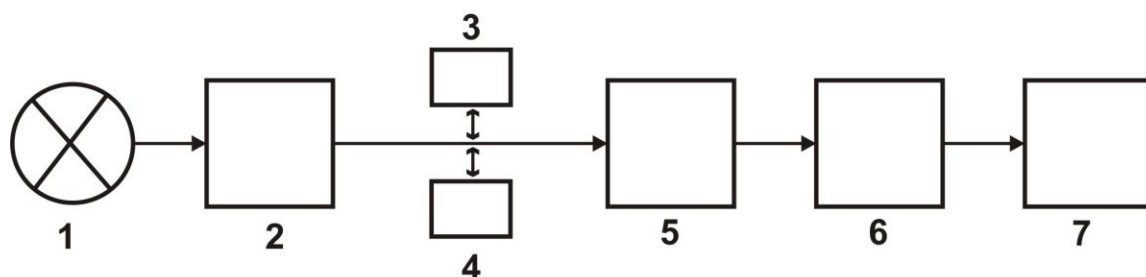


Рис. 1.6. Блок-схема однопроменевого спектрофотометра: 1 – джерело випромінювання, 2 – світлофільтр або монохроматор, 3, 4 – блок з експериментальною (вимірювальною) і порівняльною (контрольною) кюветами; 5 – приймач випромінювання (детектор), 6 – помножувач; 7 – реєструючий пристрій

У спектрофотометрах джерелом випромінювання, як правило, є газорозрядні джерела світла ультрафіолетового і видимого діапазонів. *Ртутні лампи* використовують для одержання лінійного спектра в ультрафіолетовій, видимій та ближній інфрачервоній областях. Для *лампи розжарювання* максимум спектра випромінювання лежить в ближній інфрачервоній області, але

значна частина енергії випромінюється і у видимій та УФ-області оптичного спектра (до 300 нм). *Водневі лампи* мають спектральну область випромінювання в діапазоні 165–500 нм (з найбільшою енергією випромінювання при довжинах хвиль менше 300 нм). Недоліком цих ламп є їх мала потужність. Тому більш ефективними є *дейтерієві лампи*, особливо в області спектру 250–290 нм. *Газорозрядні лампи* надвисокого тиску заповнені інертним газом (як правило ксеноном) при електричному розряді дають майже рівномірний спектр.

До оптичних елементів спектральних приладів, зокрема спектрофотометрів, відносяться світофільтри або монохроматори. *Світофільтри* – це оптичні пристрої, які змінюють спектральний склад світла або енергію світлових хвиль.

Типи світлофільтрів:

адсорбційні – послаблюють світло за рахунок поглинання світлового потоку речовиною фільтра;

дисперсійні – послаблюють світло за рахунок зміни показника заломлення речовини фільтра;

інтерференційні – дія яких заснована на явищі інтерференції паралельного променя, котрий відбивається двома дзеркалами, які розміщені на відстані довжини хвилі.

Монохроматори – оптичні системи, які виділяють вузькі ділянки частот чи довжин хвиль оптичного спектра. Монохроматори характеризує: *ширина смуги* – діапазон довжин хвиль, в якому інтенсивність світла, яке пройшло через монохроматор, більше половини інтенсивності світла при довжині хвилі максимального піка; *ширина щілини* – діапазон довжин хвиль, які потрапляють на монохроматор (вхідна щілина) і які виходять з нього і попадають на зразок (вихідна щілина).

Потрібно проводити дослідження при мінімально вузьких щілинах. В серійних спектрофотометрах використовують призматичні монохроматори та з дифракційною ґраткою або їх комбінацію. Для підвищення роздільної здатності спектрофотометра звичайно в монохроматорах спочатку виділяють певний діапазон спектра за допомогою призми, а потім його розкладають дифракційною ґраткою, що дозволяє отримати монохроматичне світло.

Роздільна здатність спектрофотометра суттєво підвищується при використанні подвійного монохроматора: тобто якщо в одному приладі розміщують два послідовно з'єднаних монохроматора, у

яких вихідна щілина першого служить вхідною щілиною другого. Це дає змогу суттєво послабити розсіяне світло.

Кювети – посудини, які виготовляють з оптично прозорого матеріалу, і в які заливають розчин речовини. Для роботи у видимій ділянці спектра використовують скляні кювети, у ближній УФ-області – кварцові. Для безперервного аналізу розчинів використовують проточні кювети. Як правило, для роботи використовуються кювети з оптичним шляхом 1 см (поперечний переріз являє собою квадрат з довжиною боку 1 см). Існують і інші кювети з оптичним шляхом 100 мм, 20, 5, 2 і 1 мм.

Приймач випромінювання (детектор) – пристрій, який перетворює світлову енергію в електричні сигнали. Для подальшого перетворення та підсилення сигналу використовують помножувачі постійного та змінного струму. Після підсилення сигнал потрапляє на реєструючий пристрій.

У двопроменевих спектрофотометрах (рис. 1.7) промінь від джерела випромінювання за допомогою системи дзеркал спрямовується або у кювету із зразком, або у кювету порівняння. Різниця в світлових потоках розраховується автоматично і відповідає значенню поглинання досліджуваної речовини. Багатопроменеві реєструючі спектрофотометри фіксують зміни поглинання одночасно при двох (чи більше) довжинах хвиль.

При проведенні вимірювань необхідно враховувати, що найменша похибка вимірювання оптичної густини спостерігається при числовому значенні оптичної густини близько 0,4. При оптичній густині більше 0,8 необхідно використовувати кювети з меншою довжиною поглинаючого шару або розводити досліджуваний розчин. При оптичній густині менше 0,1 – необхідно використовувати кювети з більшою довжиною.

При обчисленні в спектрофотометрії використовують метод *градуювального графіка*. Готують серію розведень стандартного розчину ($C_{ст}$), вимірюють їх оптичну густину ($A_{ст}$), будують графік в координатах $A_{ст} - C_{ст}$. Потім вимірюють оптичну густину аналізованого розчину і по графіку визначають його концентрацію.

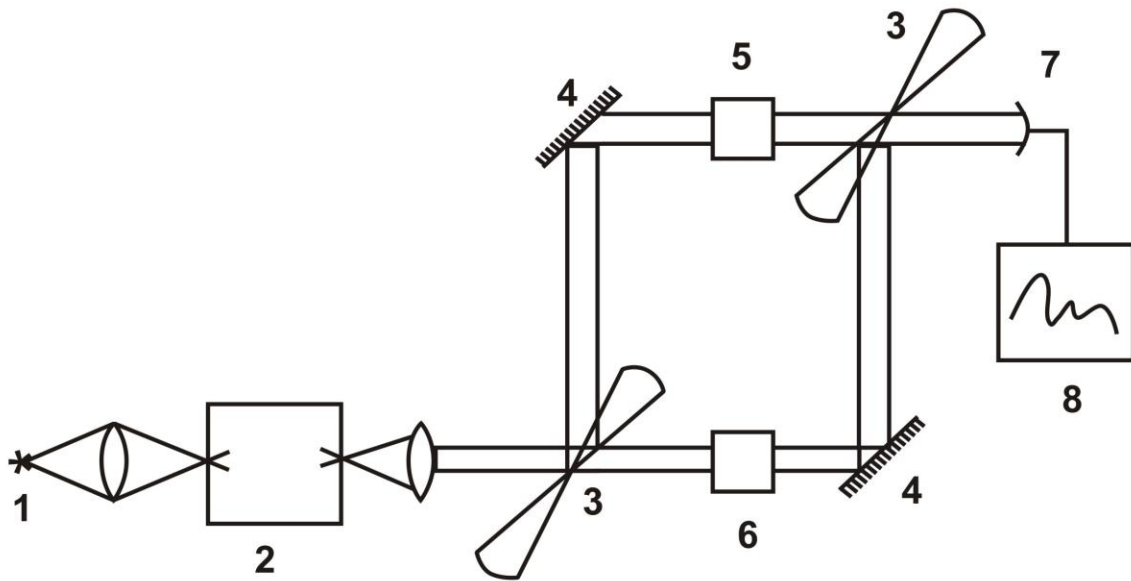


Рис. 1.7. Схема двопроменевого спектрофотометра

П р и м і т к а: світло від джерела випромінювання (1) проходить через монохроматор (2) і розділяється на два пучки обертовим секторним дзеркалом (3); отримані світлові пучки повертаються нерухомими дзеркалами (4), проходять через еталонний і робочий зразки (5 і 6) і, знову, об'єднавшись в один пучок іншим обертовим дзеркалом, потрапляють на фотоприймач (7). Струм фотоелемента підсилюється і отриманий електричний сигнал надходить на реєструючий пристрій (8), який реєструє залежність пропускання або оптичної густини від хвильового числа.

1.3.2. Атомна спектроскопія

Атомно-спектроскопічні методи – це методи аналізу, які засновані на вимірюванні енергетичного стану атомів речовин. Вони відрізняються за способом отримання та реєстрації сигналу, а загальним є необхідність попередньої атомізації проб. Атоми речовин, які випаровуються в полум'ї, випромінюють чи поглинають світло певної довжини хвилі. За інтенсивності смуг у спектрі можна визначити кількість окремих хімічних елементів у зразку.

Атомно-абсорбційна спектроскопія заснована на поглинанні атомами випромінювання від зовнішнього джерела.

Атомно-емісійна спектроскопія заснована на випусканні випромінювання атомами, збудженими за використання різних зовнішніх джерел (дуга, іскра, полум'я, плазма).

Атомно-флуоресцентна спектроскопія метод кількісного елементного аналізу по атомних спектрах флуоресценції. Пробу аналізованої речовини перетворюють на атомну пару і опромінують для збудження флуоресценції таким випромінюванням, яку поглинає атоми лише елемента, що визначається (довжина хвилі випромінювання відповідає енергії електронних переходів цих атомів). Частина збуджених атомів випромінює світло (аналітичний сигнал), що реєструється спектрофотометрами. Зазвичай використовують резонансну флуоресценцію (довжини хвиль поглиненого і випромінюючого світла однакові). Для атомізації розчинів застосовують полум'я, індуктивно-зв'язану плазму або електротермічні атомізатори (графітові трубки, нитки, стрижні, що нагріваються електричним струмом).

Атомно-абсорбційна (полум'яна) спектрометрія. Метод кількісного елементного аналізу по атомних спектрах поглинання (абсорбції) в полум'ї. Атомні пари проби опромінують в діапазоні 190–850 нм. У результаті поглинання квантів світла атоми переходять у збуджені енергетичні стани. Цим переходам в атомних спектрах відповідають резонансні лінії, які характерні для даного елемента.

Відповідно до закону Бугера-Ламберта-Бера, мірою концентрації елемента служить оптична густина

$$A = \lg (I_0 / I),$$

де I_0 і I – інтенсивності випромінювання від джерела відповідно до і після проходження через поглинаючий шар.

Випромінювання потрапляє на вхідну щілину монохроматора, встановленого таким чином, що виділяється із спектру лише резонансна лінія визначуваного елемента, інтенсивність якої вимірюється фотоелектричним способом. Переведення аналізованого об'єкта в атомізований стан і формування поглинаючого шару пару зазвичай здійснюється в полум'ї. Найбільш часто використовують полум'я сумішей ацетилену з повітрям (2000 °С) і ацетилену з N_2O (2700 °С).

Блок-схема атомно-абсорбційного спектрометра представлена на рис. 1.8.

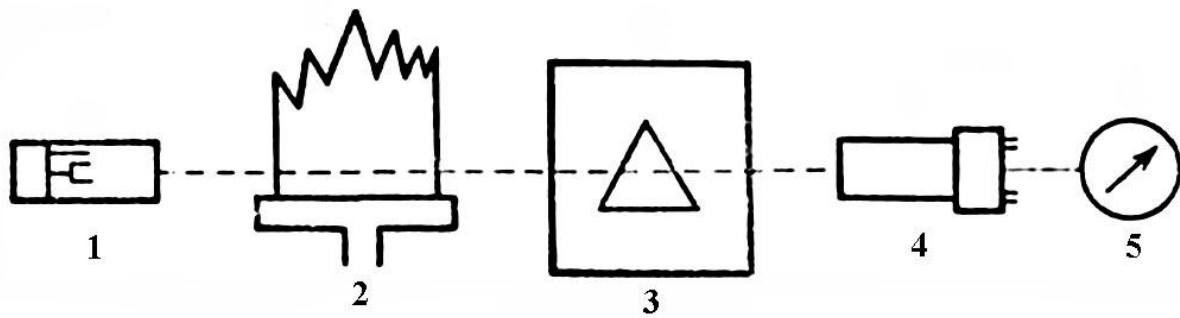


Рис. 1.8. Принципова схема полум'яного атомно-абсорбційного спектрометра. 1 – джерело випромінювання; 2 – полум'я; 3 – монохроматор; 4 – фотопомножувач; 5 – реєструючий прилад

Атомно-емісійна спектроскопія

Атомно-емісійний спектральний аналіз (АЕСА) – це метод елементного аналізу речовини, заснований на вивченні спектрів випускання вільних атомів та іонів у газовій фазі в області довжин хвиль 150–800 нм. Перехід у газову фазу здійснюється за використання різних джерел (дуга, іскра, полум'я, плазма).

Пробу досліджуваної речовини вводять в джерело випромінювання, де відбуваються її випаровування, дисоціація молекул і збудження атомів (іонів). Останні випускають характерне випромінювання, яке надходить в реєструючий пристрій спектрального приладу.

При якісному АЕСА спектри проб порівнюють зі спектрами відомих елементів, наведених у відповідних атласах і таблицях спектральних ліній, і таким чином встановлюють елементний склад аналізованого речовини. При кількісному аналізі визначають кількість (концентрацію) елементу в аналізованій речовині за залежністю величини аналітичного сигналу (щільність почорніння або оптичний щільність аналітичної лінії на фотопластинці; світловий потік на фотоелектричний приймач) цього елементу від його вмісту в пробі.

Збудження атомів відбувається при переході одного або кількох електронів на більш віддалений енергетичний рівень. У не збудженому стані атом має найменшу енергію E_0 . У збудженому (нестійкому) стані атом може перебувати дуже короткий час ($\approx 10^{-7}$ – 10^{-8} с) і завжди прагне зайняти нормальний стан. При цьому атом віддає надлишкову енергію у вигляді випромінювання фотона.

Спектральна лінія – випромінювання якоюсь однієї довжини хвилі, що відповідає певному енергетичному переходу збудженого атома. Загальне число атомів прямо пропорційне концентрації (c) елемента в пробі. Таким чином, *інтенсивність емісійної спектральної лінії* може бути використана як аналітичний сигнал для визначення концентрації елемента:

$$I = a * c,$$

де a – коефіцієнт, що залежить від умов процесу.

Чутливість і точність АЕСА залежать головним чином від фізичних характеристик джерел збудження спектрів – температури, концентрації електронів, часу перебування атомів в зоні збудження спектрів, стабільності режиму джерела і т. д.

Атомно-емісійна спектроскопія з індуктивно-зв'язаною плазмою. Суть такого методу полягає в тому, що при збудженні та іонізації з подальшим переходом в стабільний стан елементи випускають квант світла з певною довжиною хвилі. Відповідно, визначаючи довжину хвилі, можна провести якісний аналіз, а визначаючи інтенсивність випускання – кількісний.

Основними вузлами приладу для проведення даного аналізу є: система подачі проби, розпилювач, вузол атомізації проби (кварцовий плазмовий пальник), оптична камера та детектор. Джерелом атомізації і збудження в цьому методі служить *індуктивно-зв'язана плазма*.

Плазмовий пальник (рис. 1.9) складається з трьох концентричних кварцових трубок, які безперервно продуваються аргоном. Верхня частина пальники поміщена всередину котушки індуктивності високочастотного генератора (зазвичай 27,12 або 40,68 МГц). Високочастотна аргонна плазма ініціюється з допомогою іскрового розряду. При цьому аргон частково іонізується, в ньому виникають вільні носії заряду. Потім в газі ініціюється високочастотний струм, що викликає подальшу лавиноподібну іонізацію газу. Зважаючи на малий опір плазми вона швидко нагрівається. У центральний канал пальники у вигляді аерозолі надходить розчин проби. У плазмі відбувається висушування проби, дисоціація на атоми, іонізація і термічне збудження.

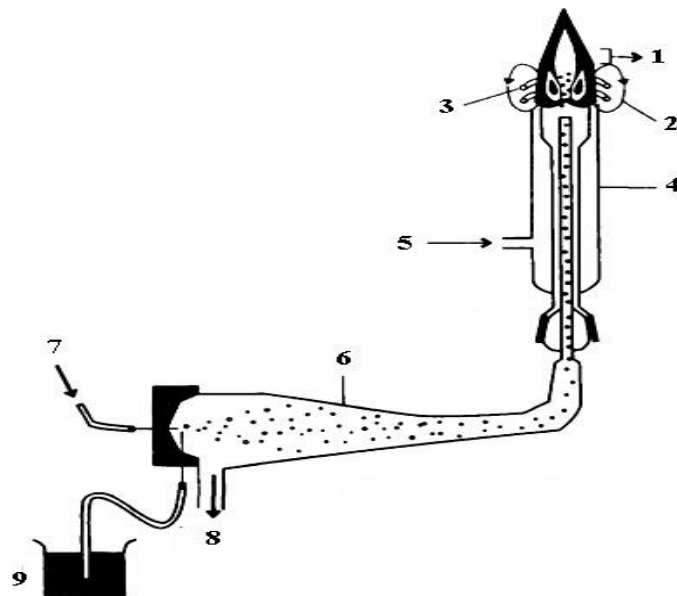


Рис. 1.9. Пристрій плазмового пальника

П р и м і т к а: 1 – зона спостереження плазми; 2 – магнітне поле; 3 – високочастотна котушка; 4 – плазмовий пальник; 5 – плазмоутворюючий газ (Ar); 6 – розпилювач; 7 – розпилюючий газ (Ar); 8 – конденсат; 9 – розчин проби.

Перевагою методу є можливість плавно регулювати умови атомізації і збудження, тобто можливо підібрати умови, що забезпечують одночасне визначення безлічі елементів. Недоліком методу є дуже велика витрата аргону. Також потрібно аргон чистотою не менше 99,99 %.

Подальша обробка пучка світла полягає в наступному: через вхідну щілину він надходить в оптичну камеру, де проходить фокусуєчі дзеркала, потрапляє на монохроматор. Світло, потрапляючи на монохроматор, розкладається на монохроматичні пучки, які далі проходячи через спеціальну систему лінз потрапляють на детектор. Робочий діапазон – 170–800 нм.

Пробопідготовка та аналіз проб. Всі проби повинні бути переведені в розчин. Для цього наважку проби масою 0,1–0,5 г (в залежності від природи проби, цільових елементів і їх передбачуваного змісту навішування може відрізнятись) розкладають азотною кислотою при нагріванні або в мікрохвильовій печі. Одержаний розчин при необхідності фільтрується, щоб видалити зважені частки, наявність яких негативно позначиться як на якості аналізу, так і на стані механізмів і деталей приладу.

Після описаних процедур проба розбавляється, щоб знизити концентрацію солей і залишки кислоти. По-перше, це необхідно для того, щоб не було зашкалювання, а також для того, щоб уникнути перекривання спектрів випромінювання елементів. По-друге – для того щоб не так швидко руйнувати систему подачі проби і пальник, оскільки нітратна кислота це досить агресивне середовище. Найчастіше рекомендується аналізувати розчини з концентрацією HNO_3 (10^{-2} М) і нижче.

Аналіз однієї проби зазвичай займає трохи більше хвилини, після чого аналітик отримує спектри всіх виявлених елементів. Витрата – $5\text{--}6\text{ см}^3$ проби на один аналіз.

Мас-спектрометрія. *Мас-спектрометрія* – метод визначення хімічного складу і молекулярної структури речовини, що базується на реєстрації у спектру мас іонів, утворених внаслідок іонізації атомів і (або) молекул проби. Іонізацію здійснюють пучком електронів або іонів, лазерним випромінюванням тощо. Іони розділяють після прискорення в магнітному полі за величиною відношення маси до заряду (m/e). Число хімічних елементів, що одночасно визначаються у природних об'єктах – до 40; одночасно з елементним складом (з точністю до 1 % при наявності стандартних зразків). Абсолютна границя виявлення: $10^{-10}\text{--}10^{-19}$ г.

Істотна відмінність мас-спектрометрії від інших аналітичних фізико-хімічних методів полягає в тому, що оптичні чи деякі інші методи детектують випромінювання (поглинання) енергії молекулами або атомами, а мас-спектрометрія безпосередньо детектує самі частки речовини. Мас-спектрометрія належить до найінформативніших методів і відрізняється високими аналітичними характеристиками, дозволяє провести аналіз твердих, рідких і газоподібних речовин.

Іони бувають однозарядні та багатозарядні. Більшість невеликих молекул при іонізації набувають лише один позитивного або негативного заряду. Атоми здатні набувати більш за один позитивний заряд і лише один негативний. Білки, нуклеїнові кислоти і інші полімери здатні набувати множинних позитивних і негативних зарядів.

Перше, що треба зробити для того, щоб отримати маси-спектр – перетворити нейтральні молекули і атоми, складові будь-якої органічної або неорганічної речовини, в заряджені частки – іони. Цей процес називається іонізацією і по-різному здійснюється для

органічних і неорганічних речовин. Другою необхідною умовою є переведення іонів в газову фазу у вакуумній частині мас-спектрометра. Глибокий вакуум забезпечує безперешкодний рух іонів усередині мас-спектрометра, а при його відсутності іони розсіюються і рекомбінують (перетворюються назад в незаряджені частки). Отримані при іонізації іони за допомогою електричного поля переносяться в мас-аналізатор. Там починається другий етап мас-спектрометричного аналізу – сортування іонів по масах (точніше у відношенні маси до заряду або m/e).

Мас-спектрометр – це вакуумний прилад, що використовує фізичні закони руху заряджених часток в електро-магнітних полях та необхідний для розділення іонів досліджуваної речовини по величинам m/e . Мас-спектральні прилади складаються з системи введення проби (система напуску), іонного джерела, розділюючого пристрою (мас-аналізатора), детектора (приймача іонів), вакуумних насосів, що забезпечують глибокий вакуум у всій вакуумній системі приладу, та системи управління і обробки даних (рис. 1.10).

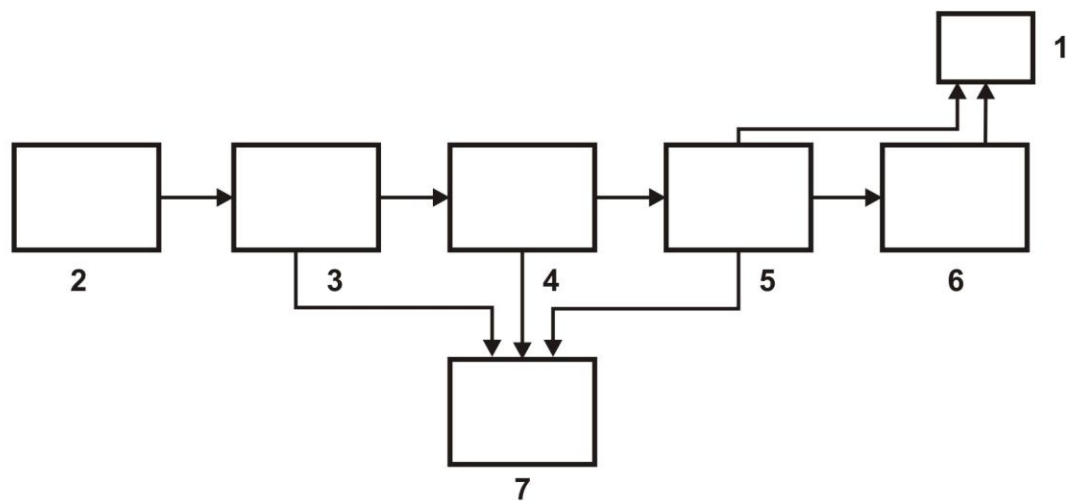


Рис. 1.10. Блок-схема мас-спектрометра

П р и м і т к а: 1 – система управ-ління; 2 – введення проби; 3 – іонне джерело; 4 – мас-аналізатор; 5 – детектор; 6 – система обробки даних; 7 – система відкачки.

Інтенсивність (амплітуду піків) у мас-спектрі, яка відповідає кількості відповідного іону, виражають, як правило, у відсотках до інтенсивності основного піка (вісь ординат на мас-спектрі). При кількісному визначенні проводять відповідні перерахунки. Мас-

спектри різних сполук зібрані в каталоги. Сучасні мас-спектрометри налічують у своїх каталогах $5 \cdot 10^5$ і більше сполук. Мас-спектр досліджуваної речовини порівнюється з даними каталогу і таким чином встановлюється її структура.

1.3.3. Рефрактометричний метод аналізу

Рефрактометрія – оптичний метод аналізу, заснований на вимірюванні показника заломлення світла (n) речовиною, яку визначають.

Середовище, в якому швидкість розповсюдження світла менша, є оптично щільнішим. При переході променя світла з середовища оптично менш щільного в середовище з більшою оптичною щільністю кут падіння променя більший за кут заломлення.

Абсолютний показник заломлення – відношення швидкості проходження світла у вакуумі до швидкості проходження світла в речовині, що досліджується.

Відносний показник заломлення – відношення швидкості проходження світла в повітрі до швидкості проходження світла в речовині або відношення синуса кута падіння до синуса кута заломлення:

$$n = v_1/v_2 = \sin \alpha/\sin \beta,$$

де v_1 – швидкість проходження світла в повітрі; v_2 – швидкість проходження світла в речовині; α – кут падіння; β – кут заломлення.

Показник заломлення залежить від довжини хвилі світла, температури, агрегатного стану, а також від концентрації речовини і природи розчинника.

Прилади, що використовують для визначення показника заломлення, називають рефрактометрами. Зазвичай вимірювання показника заломлення виконують на рефрактометрах типу Аббе (рис. 1.11, а), дія яких ґрунтується на визначенні кута повного внутрішнього відбиття при проходженні світлом межі між двома середовищами з різними показниками заломлення. Діапазон вимірювання від 1,3 до 1,7, а точність визначення $\pm 2 \cdot 10^{-4}$.

Менш поширені на практиці рефрактометри типу Пульфриха (рис. 1.11, б), дія яких побудована на вимірюванні кута заломлення монохроматичного світла, що забезпечує високу точність визна-

чення показника заломлення $\pm 2 \cdot 10^{-5}$, але потребує значної кількості досліджуваного розчину і монохроматора світла.

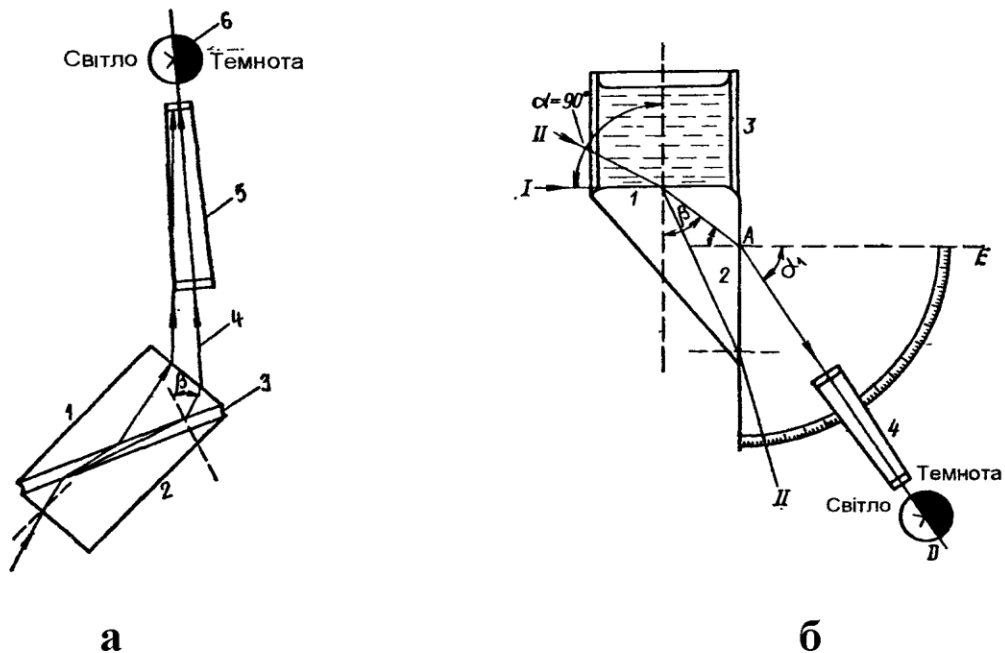


Рис. 1.11. Схема рефрактометра типа Аббе (а): 1 – вимірювальна призма; 2 – освітлювальна призма; 3 – шар рідини; 4 – межові промені; 5 – зорова труба; 6 – поле зору; та схема рефрактометра типу Пульфриха (б): 1,2 – вхідна і вихідна вимірювальна призма відповідно; 3 – кювета для досліджуваної рідини; 4 – зорова трубка

Визначити концентрацію розчинів речовин рефрактометричним методом можна двома способами: *розрахунковим та графічним*. При розрахунковому способі використовують формулу, що відображає залежність між концентрацією розчину та його показником заломлення:

$$n = n_0 + FC \rightarrow C = (n - n_0)/F,$$

де n – показник заломлення розчину; n_0 – показник заломлення розчинника; F – рефрактометричний фактор; C – концентрація розчину (%).

Рефрактометричний фактор (F) демонструє зміну показника заломлення при зміні концентрації розчину на 1 %. Його встановлюють експериментально шляхом визначення показника залом-

лення для стандартних зразків, склад яких відомий, або розраховують за таблицями показників заломлення.

Табличні значення показників заломлення наводять при довжині хвилі $\lambda_D = 589,3$ нм (жовта лінія в спектрі натрію) і температурі 20°C . При збереженні постійними довжини хвилі світла та умов проведення досліджень, від яких залежить показник заломлення, його значення будуть визначатись тільки природою середовища, які контактують.

При використанні графічного способу визначення концентрації розчину речовини будують калібрувальний графік у координатах $n-C$, вимірюють показник заломлення розчину і за графіком знаходять відповідну концентрацію.



Рефрактометричний метод використовують для ідентифікації речовини; для кількісного визначення одно-, дво- та багатоконпонентних сумішей.

Рефрактометр ИРФ 454 Б2М – найбільш зручний та перевірений на практиці у використанні прилад, який призначений для визначення показників заломлення неагресив-

них прозорих рідин та розчинів.

1.4. ХРОМАТОГРАФІЧНІ МЕТОДИ АНАЛІЗУ

Хроматографія – процес, заснований на багаторазовому повто-ренні актів сорбції та десорбції речовини при її переміщенні в потоці рухомої фази вздовж нерухомого сорбенту. Розподіл складних сумішей хроматографічним методом засновано на різній сорбції компонентів суміші. При протіканні цього процесу так звана рухома фаза (елюент), що містить аналізовану пробу, переміщується через нерухому фазу. Зазвичай нерухома фаза являє собою речовину з розвиненою поверхнею, а рухлива – потік газу або рідини, що фільтрується через шар сорбенту. При цьому відбувається багаторазове повторення актів сорбції – десорбції, що є характерною особливістю хроматографічного процесу і зумовлює ефективність хроматографічного розділення.

Якісний хроматографічний аналіз, тобто ідентифікація речовини по його хроматограмі, може бути виконаний при порівнянні хроматографічних характеристик, найчастіше це *утриманого об'єму* (тобто об'єму рухомої фази, пропущеної через колонку від початку введення суміші до появи даного компонента на виході з колонки), які знаходять при певних умовах для компонентів аналізованої суміші та для еталона.

Кількісний хроматографічний аналіз зазвичай проводять на хроматографі. Метод заснований на вимірюванні різних параметрів хроматографічного піка (висоти, ширини, площі і утримуваного об'єму), які залежать від концентрації речовин, що визначаються.

У кількісній газовій хроматографії застосовують методи *абсолютного градування і внутрішньої нормалізації, або нормування*. Використовується також метод *внутрішнього стандарту*. При абсолютному градуванні експериментально визначають залежність висоти або площі піка від концентрації речовини і будують градувальні графіки або розраховують відповідні коефіцієнти. Далі визначають ті ж характеристики піків в аналізованій суміші, і за градувальним графіком знаходять концентрацію аналізованого речовини. Цей простий і точний метод є основним при визначенні мікродомішок.

При використанні методу *внутрішньої нормалізації* беруть суму будь-яких параметрів піків, наприклад суму висот всіх піків або суму їх площ, за 100 %. Тоді відношення висоти окремого піка до суми висот або відношення площі одного піку до суми площ при

множенні на 100 буде характеризувати масову частку (%) компонента в суміші. При такому підході необхідно, щоб залежність величини вимірюваного параметра від концентрації була однаковою для всіх компонентів суміші.

1.4.1 Класифікації хроматографічних методів

Існують різні види класифікації хроматографічних методів:

1. За агрегатним станом фаз (найголовніше в цій класифікації агрегатний стан рухомої фази):

- газOVO-рідинна хроматографія;
- газOVO-твердофазна (газоадсорбційна) хроматографія;
- рідинно-рідинна хроматографія;
- рідинно-твердофазна (рідинноадсорбційна) хроматографія;
- рідинно-гелева хроматографія;

2. За механізмами розділення (тобто характером взаємодії між сорбентом та сорбатом):

• *Адсорбційна хроматографія* – розділення основане на відмінності в адсорбційній здатності речовин, що розділяються, твердим адсорбентом;

• *Розподільна хроматографія* – розділення основане на відмінності в розчинності речовин, що розділяються, в нерухомій фазі (газова хроматографія) та на відмінності в розчинності речовин, що розділяються, в рухомій та нерухомій рідких фазах;

• *Іонообмінна хроматографія* – розділення основане на відмінності в здатності речовин, що розділяються, до іонного обміну;

• *Гель-фільтрація або ексклюзивна хроматографія* (гель-проникна, гель-фільтраційна хроматографія) – різновид хроматографії, в ході якої молекули речовин розділяються за розміром за рахунок їх різної здатності проникати в пори нерухомої фази. При цьому першими виходять з колонки найбільш великі молекули (більшої молекулярної маси), здатні проникати в мінімальне число пор стаціонарної фази. Останніми виходять речовини з малими розмірами молекул, які здатні вільно проникати в пори. На відміну від адсорбційної хроматографії, при гель-фільтрації стаціонарна фаза залишається хімічно інертною і не взаємодіє з речовинами, які розділяються;

- *Осадова хроматографія* – розділення засновано на утворенні різних по розчинності осадів речовин, які розділяються, із сорбентом;

- *Адсорбційно-комплексоутворююча хроматографія* – розділення засновано на утворенні координаційних сполук різної міцності у фазі чи на поверхні адсорбента;

- *Афінна хроматографія* (різновид лігандної). В основі останньої лежить реакція взаємодії речовин, що розділяються, з лігандом, який зв'язаний з інертним носієм. У разі афінної хроматографії розділяються біологічно активні речовини (білки, ферменти), що вступають з лігандом (теж, як правило, органічним) в специфічні біохімічні взаємодії. Наприклад: антитіло-антиген, гормон-рецептор тощо. Саме висока специфічність подібної взаємодії обумовлює високу ефективність афінної хроматографії і її широке поширення;

3. За метою проведення:

- *Аналітична хроматографія*;

- *Препаративна хроматографія*;

- *Промислова хроматографія*;

4. За характером техніки, що застосовується:

- *Хроматографія на колонці* – розділення речовин проводиться в спеціальних колонках;

- *Паперова хроматографія* – поділ речовин проводиться на спеціальному папері;

- *Тонкошарова хроматографія* – поділ речовин проводиться в тонкому шарі сорбенту.

У хроматографії на колонці та тонкошаровій хроматографії можна використовувати будь-який з наведених вище механізмів поділу, а паперовій хроматографії найчастіше застосовують розподільний і іонообмінний механізми.

5. За способом відносного переміщення фаз:

- *Елюентна хроматографія*. Суміш, що аналізується вводять в потік елюента у вигляді імпульсу. У колонці суміш розділяється на окремі компоненти, між якими знаходяться зони рухомої фази;

- *Фронтальна хроматографія* Суміш подають в колонку, при цьому в розчині на виході із колонки визначають концентрацію кожного компоненту та будують графік в координатах концентрація речовини – об'єм розчину, який пройшов через колонку. Цю залежність називають хроматограмою чи вихідною кривою;

• *Витіснювальна хроматографія*. В колонку, після подачі суміші для розділення, вводять спеціальну речовину-витіснювач, яка утримується сильніше за будь-який із компонентів суміші. Утворюються зони речовин, які розділюються.

Розглянемо більш детально окремі хроматографічні методи.

1.4.2 Тонкошарова хроматографія

Метод *тонкошарової хроматографії (ТШХ)* розроблено Н.А. Ізмайловим і М.С. Шрайбер у 1938 р. У методі ТШХ нерухома тверда фаза тонким шаром наноситься на скляну, металеву або пластмасову пластинку. У 2–3 см від краю пластинки на стартову лінію наносять пробу речовини, яка аналізується, і край пластинки занурюють в розчинник, який діє як рухлива фаза. Під дією капілярних сил розчинник рухається уподовж шару сорбенту та з різною швидкістю переносить компоненти суміші, що приводить до їх розділення. Дифузія в тонкому шарі відбувається в поздовжньому та поперечному напрямках, тому процес необхідно розглядати як двомірний.

Сорбційні властивості системи в ТШХ характеризуються *хроматографічною рухливістю*, тобто величиною R_f , яка розраховується із результатів експерименту згідно із рівнянням:

$$R_f = X_i / X_f,$$

де X_i – відстань від стартової лінії до центра зони i -го компонента;

X_f – відстань від стартової лінії, яку пройшов розчинник.

Підкладки для сорбенту (пластинки) зазвичай виготовляють із скла, алюмінієвої фольги або поліетерної плівки. В якості сорбенту в ТШХ застосовують силікагелі, оксид алюмінію, крохмаль, целюлозу. Вибір розчинника залежить від природи сорбенту і властивостей речовин, які аналізуються. Часто застосовують суміші розчинників із двох або трьох компонентів. Після закінчення хроматографування непроточним методом зони на хроматограмі проявляють хімічним або фізичним способом. При хімічному способі пластинку обприскують розчином реактиву, що взаємодіє з компонентами суміші. При фізичних способах прояву використовується здатність деяких речовин до флуорес-

ценції під дією ультрафіолетового випромінювання, часто при додаванні флуоресцентного індикатора, що взаємодіє з компонентами суміші. Після прояву хроматограми приступають до ідентифікації речовин і подальшого аналізу.

Якісний аналіз у ТШХ. Найбільш загальний підхід до якісного аналізу заснований на значеннях R_f . Хроматографічна рухливість є чутливою характеристикою речовини, проте вона істотно залежить від умов визначення. При дотриманні стандартних умов отримуються повторювані значення R_f , які можна використувати в аналітичних цілях при порівнянні з табличними, якщо вони отримані за тих же умов досліду.

Найнадійнішим є метод свідків, коли на стартову лінію поряд із пробєю наносяться індивідуальні речовини, які відповідають компонентам суміші. Вплив різних чинників на всі речовини будуть однаковими, тому збіг R_f компонента проби і одного зі свідків дає підставу для ототожнення речовин з врахуванням можливих відхілень. Розбіжність R_f інтерпретується однозначніше: воно вказує на відсутність в пробі відповідного компонента. На практиці стандартна речовина (свідок) у тому ж розчиннику наноситься на стартову лінію разом з аналізованою пробєю та проводиться хроматографування за однакових умов.

Кількісний аналіз у ТШХ. Кількісні визначення можуть бути зроблені безпосередньо на пластинці, або після видалення речовини з пластинки. При безпосередньому визначенні на пластинці, вимірюють площу плями (наприклад, за допомогою міліметрової кальки) та по заздалегідь побудованому градуєвальному графіку знаходять кількість речовини.

Найбільш точним вважається метод, в якому речовина після розділення віддаляється з пластинки і аналізується спектрофотометрично або іншим методом. Видалення речовини з пластинки зазвичай здійснюють механічним шляхом, хоча інколи застосовують вимивання відповідним розчинником.

1.4.3. Іонообмінна хроматографія

Іонообмінна хроматографія заснована на зворотному стехіометричному обміні іонів, що знаходяться в розчині, на іони, які входять до складу іонообмінника. Синтетичні іонообмінники, які використовуються на даний час, володіють рядом важливих

переваг: вони мають високу обмінну ємкість, стійкі до дії кислот та лугів, не руйнуються у присутності багатьох окиснювачів і відновників тощо. Зазвичай синтетичним іонообмінником є високо полімерна сполука, наприклад поперечно-зшитий полістирол, що містить різні функціональні групи, які і визначають найбільш характерні властивості смол.

Типи іонообмінних смол. У залежності від знака функціональних груп іонообмінні смоли являються *катіонітами* чи *аніонітами*. Катіоніти містять функціональні кислотні групи ($-\text{SO}_3^-$; $-\text{COO}^-$; $-\text{PO}_3^-$; $-\text{N}(\text{CH}_2\text{CO}_2^-)_2$). Функціональними групами аніонітів являються четвертинні $-\text{NR}_3^+$, третинні $-\text{NR}_2\text{H}^+$ чи первинні $-\text{NH}_3^+$ амонієві, пиридинові чи інші основи. Важливою характеристикою іонообмінника є його *обмінна ємкість*. Обмінну ємкість іоніту чисельно можна виразити кількістю молей еквіваленту протиіону на одиницю маси або об'єму смоли.

Методи іонообмінної хроматографії використовують переважно для розділення іонів. Проста методика іонообмінного розділення обумовлена поглинанням компонентів суміші іонітом і послідовному елююванні кожного компонента відповідним розчинником. Кількісні визначення компонентів після розділення можуть бути виконані будь-яким відповідним методом. Методами іонообмінної хроматографії визначають головним чином катіони лужних і лужноземельних металів.

1.4.4. Газова хроматографія

Газова хроматографія – це метод розділення летких компонентів, при якому рухливою фазою служить інертний газ (газ-носій), що протікає через нерухому фазу з великою поверхнею. Типова схема газового хроматографу представлена на рис. 1.12. У якості рухомої фази використовують водень, гелій, азот, аргон, вуглекислий газ. Газ-носій не реагує з нерухомою фазою і речовинами, що розділяються. Розрізняють газиво-твердофазну та газиво-рідинну хроматографію. У першому випадку нерухомою фазою є твердий носій (силікагель, вугілля, оксид алюмінію), в другому – рідина, нанесена на поверхню інертного носія. Розділення засноване на відмінностях в летючості і розчинності (або адсорбованості) компонентів суміші, що розділяється.

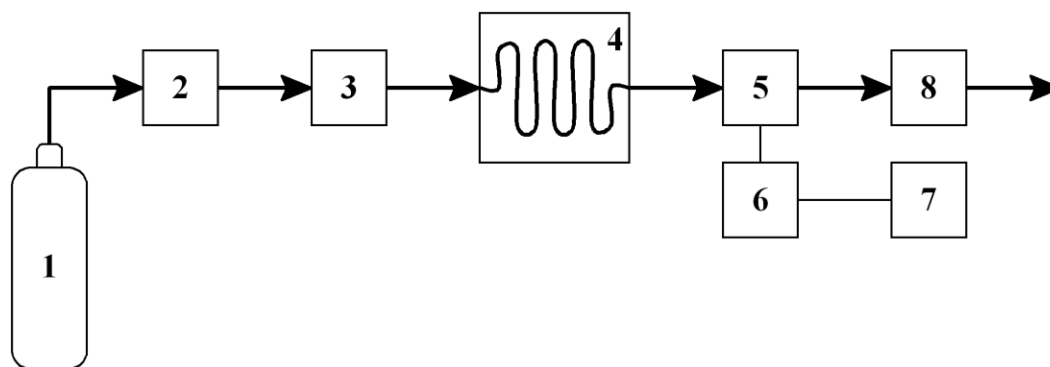


Рис. 1.12. Типова блок-схема газового хроматографу

П р и м і т к а: 1 – джерело газу-носія (рухомої фази); 2 – регулятор витрати газу-носія; 3 – пристрій введення приладу; 4 – хроматографічна колонка; 5 – детектор; 6 – електронний посилювач; 7 – реєструючий пристрій; 8 – прилад вимірювання витрат.

Цей метод можна використовувати для аналізу газоподібних, рідких і твердих речовин з молекулярною масою менше 400, які повинні задовольняти певним вимогам, головні з яких – термостабільність, летючість, інертність, легкість отримання. Цим вимогам повною мірою задовольняють, як правило, органічні речовини, тому газову хроматографію широко використовують як серійний метод аналізу органічних сполук.

Джерело газу-носія – це балон із газом, який знаходиться під великим тиском (до 150 атм). Частіше всього використовують гелій, рідше азот, ще рідше водень та інші гази.

Призначення *регулятора витрати* – контроль витрати газу в системі, а також підтримка необхідного тиску газу на вході в систему. Зазвичай для цього використовуються редуктор або дросель.

Пристрій введення проби. Призначений для подачі проби аналізованої суміші в хроматографічну колонку. Проба вводиться за допомогою мікрошприца шляхом проколювання еластичної прокладки. Об'єм проби, що вводиться, декілька мікролітрів.

Хроматографічні колонки. Під колонкою мається на увазі посуд, довжина якого значно більше діаметру. Внутрішній діаметр колонок – 2–15 мм, а довжина – 1–20 м. Матеріалом для виготовлення колонок служить скло, неіржавіюча сталь, мідь, інколи фторопласт. Останнім часом найбільшого поширення набули капілярні колонки виготовлені з плавленого кварцу, з нанесеною усередині нерухомою фазою. Довжина подібних колонок може досягати

сотень і навіть тисяч метрів, хоча частіше використовуються колонки завдовжки 30–50 м. Україй важливе щільне наповнення колонок нерухомою фазою, а також забезпечення постійної температури колонки протягом всього процесу.

Носії нерухомих рідинних фаз. Тверді носії для диспергування нерухомої рідкої фази у вигляді однорідної тонкої плівки мають бути механічно міцними з помірною питомою поверхнею (близько $20 \text{ м}^2/\text{г}$), невеликим і однаковим розміром часток, а також бути досить інертними, щоб адсорбція на поверхні розділу твердої і газоподібної фаз була мінімальною. Найслабкіша адсорбція спостерігається на носіях з силанізованого хромосорбата, скляних гранул і флуоропака (фторвуглеводний полімер). Крім того, тверді носії не повинні реагувати на підвищення температури і повинні легко змочуватися рідкою фазою.

Детектор – це пристрій, призначений для виявлення в потоці газу-носія аналізованих речовин по якій-небудь фізико-хімічній властивості. Відгук здійснюється за рахунок перетворення властивостей в електричний сигнал. Детектори підрозділяються на інтегральні та диференціальні. Інтегральний детектор реєструє зміни в часі сумарної кількості компонентів, що виходять з колонки. Всі газохроматографічні детектори, що серійно випускаються, є диференціальними. Сигнал таких детекторів пропорційний миттєвій зміні значення якої-небудь властивості газового потоку, а її аналоговий запис має вигляд піку. Хроматограма, яка отримана з використанням такого детектору, представляє ряд піків, причому кількість кожного компонента пропорційна площі відповідного піку.

В процесі детектування хімічна природа молекули аналізованої речовини може змінюватися або ні. Якщо природа молекули змінюється (процес руйнування молекули), то вона може бути зареєстрована лише разово. Якщо ж природа молекули не змінюється, то така молекула може бути зареєстрована детектором багато разів. Детектори, в яких можлива багаторазова реєстрація молекул, називаються концентраційними, оскільки їх сигнал пропорційний концентрації речовини в газі-носієві. Прикладом концентраційного детектора є детектор по теплопровідності (ДТП), в якому процес відведення теплоти від чутливих елементів не руйнує молекул аналізованих речовин. Детектори, в яких можлива лише одноразова реєстрація молекул, називаються потоковими, оскільки їх сигнал пропорційний потоку речовини. Як типовий приклад поточкового

детектора можна привести полум'яно-іонізаційний детектор (ПД), в якому відбувається згорання органічних речовин.

Виходячи з мети аналізу і умов його проведення, слід вибрати такий детектор, характеристики якого відповідають їм найбільшою мірою. Критерії оцінки детекторів загальноприйняті для всіх систем детектування; до них відносяться: чутливість; концентрація, що мінімально детектується (межа виявлення); фоновий сигнал; рівень шуму; швидкість дрейфу нульової лінії; діапазон лінійності детектора; ефективний об'єм і час відгуку (швидкодія); селективність.

Характеристика деяких детекторів, які використовуються у газовій хроматографії, наведена нижче.

Детектор електронного захвату (ДЕЗ) застосовується для визначення сполук, що володіють великою спорідненістю до електронів. Ці речовини захоплюють вільні теплові електрони в камері з радіоактивним джерелом з утворенням стабільних іонів. Він успішно застосовується для визначення малих концентрацій галоген-, азот- та кисневмісних речовин. Система детектування по захвату електронів включає: іонізаційну камеру (комірка детектора) і джерело поляризуючої напруги (блок живлення). У комірці детектора газ-носії під дією β -випромінювання джерела ^{63}Ni іонізується з утворенням позитивних іонів і вільних електронів.

У основі роботи *полум'яно-іонізаційного детектора (ПД)* покладена залежність електричної провідності іонізованого газу від його складу. Сигналом детектора є зміна іонного струму, яка викликана введенням в детектор аналізованої речовини. Газ-носії в суміші з аналізованою сумішшю і воднем подається у форсунку пальника, де відбувається іонізація. Одночасно пальник виконує функцію одного з електродів, а неіржавіюча пластинка, згорнута в циліндр та укріплена на невеликій відстані над полум'ям, утворює другий. Детектор використовується, в основному, для визначення в газовій суміші органічних сполук.

Термоіонний детектор (ТД) – це один з найбільш чутливих і селективних детекторів до фосфорорганічних речовин. Крім того, набули поширення варіанти термоіонного детектора, які проявляють високу чутливість і селективність до азот- і галогенвмісних речовин. Конструкції детекторів розрізняються головним чином за способом розміщення і нагрівання солі лужного металу, а також геометрією детектора.

Полум'яно-фотометричний детектор (ПФД) є селективним у відношенні до фосфор- та сірковмісних речовин. Принцип дії заснований на вимірі свічення водневого полум'я при згоранні в ньому фосфор- і сірковмісних сполук. Конструктивно ПФД є поєднанням ПД з оптичною схемою виміру світлового потоку. Світловий потік спочатку проходить інтерференційний фільтр, який поглинає фонове випромінювання полум'я, після чого поступає на чутливий елемент фотопомножувача. Отриманий таким чином фотострум прямує на електрометричний підсилювач і далі – на реєструючий прилад.

Принцип роботи *фотоіонізаційного детектору* (ДФІ) полягає в наступному: фотони від УФ-лампи потрапляють в іонізаційну камеру, через яку безперервно проходить газ-носій, вибраний так, щоб його потенціал іонізації був значно вищий за енергію фотонів. В цьому випадку газ-носій не іонізується, тоді як попадання в камеру аналізованої речовини викликає появу фотоіонізаційного струму, пропорційного концентрації цієї речовини. Детектуються всі сполуки, у тому числі і неорганічні, для яких потенціал іонізації менше енергії фотонів. Різні УФ-лампи можуть забезпечити різну селективність ДФІ до різних сполук.

У *атомно-емісійному детекторі* проба переводиться в атомарний стан, а атоми, що утворилися, переходять в збуджений стан. Для цього необхідна значна енергія, яка є в плазмі, що індукується мікрохвильовим випромінюванням. Перехід збуджених атомів в стан з нижчою енергією супроводжується випромінюванням світла. Довжина хвилі випромінювання вимірюється спектрофотометром.

Детектор по теплопровідності (ДТП) або *катарометр* є універсальним недеструкуючим детектором. У основу роботи ДТП покладено процес передачі тепла від нагрітого чутливого елемента до холоднішого корпусу детектора за рахунок теплопровідності газового потоку. Із зміною складу газового потоку змінюється його теплопровідність, тобто кількість тепла, що відводиться від чутливого елемента. Це, у свою чергу, приводить до зміни температури, а, отже, і електричного опору чутливого елемента. У вимірювальній схемі ДТП виникає сигнал у вигляді різниці потенціалів (напруги), величина якого пропорційна концентрації речовини, що аналізується в газі-носії.

Інфрачервоні детектори (ІЧД). Інфрачервона спектроскопія широко застосовується в хімічному аналізі і у поєднанні з газовою хроматографією. Методом ІЧ-спектроскопії з перетворенням Фур'є аналізують сполуки з високою швидкістю і чутливістю. Отриманий при цьому ІЧ-спектр поглинання можна розглядати як індивідуальну характеристику сполуки і використовувати для її ідентифікації.

Газоворідинна хроматографія (ГРХ). Це один із найсучасніших хроматографічних методів багатоконпонентного аналізу. Його відмінні риси – експресивність, висока точність, чутливість, можливість автоматизації. Метод дозволяє вирішити багато аналітичних проблем. Кількісний аналіз ГРХ можна розглядати як самостійний аналітичний метод, ефективніший при розділенні речовин, що відносяться до одного класу.

1.4.5. Рідинна хроматографія

У загальному випадку до *рідинної хроматографії* відносять всі хроматографічні методи, в яких рухливою фазою є рідина. Сфера використання рідинної хроматографії охоплює вимірювання лівової частки всіх відомих хімічних речовин і мікробіологічних субстанцій. Якщо методи газової хроматографії обмежуються молекулярними масами речовин, які при підвищеній температурі можна перевести в парову фазу і подати через випарник в колонку, то для вирішення конкретного хроматографічного завдання методами рідинної хроматографії необхідно лише ретельно підібрати склад рухливої фази, відповідний фізичним і хімічним властивостям сорбата, сорбента, можливостями детектуючого приладу та техніко-експлуатаційним властивостям хроматографічної системи.

Рідинно-рідинна хроматографія. Вона по суті близька до газово-рідинної. На твердий носій також наноситься плівка рідкої фази, і через колонку, наповнену таким сорбентом, пропускають рідкий розчин. Цей вигляд хроматографії називають рідинно-рідинною розподільною хроматографією. Рідину, яку нанесено на носій, називають *нерухомою рідкою фазою*, а розчинник, що пересувається через носій – *рухомою рідкою фазою*. Рідинно-рідинна хроматографія проводиться в колонці чи на папері.

Розділення суміші речовин в рідинно-рідинній хроматографії ґрунтуються на відмінності коефіцієнтів розподілу речовини між

розчинниками, що не змішуються. Коефіцієнт розподілу речовини визначається як:

$$K_{п/н} = c_{п} / c_{н} ,$$

де $c_{п}$ та $c_{н}$ – концентрація речовини в рухомій та нерухомій фазах.

Пошук фаз, що не змішуються, забезпечують розділення, зазвичай виробляється емпірично на основі експериментальних даних.

Хоча в якості рухомої і нерухома фази вибираються розчинники, що не змішуються між собою, все ж в багатьох системах спостерігається деяка взаємна розчинність. Щоб запобігти цьому рухому фазу заздалегідь насичують нерухомою. Для збереження незмінного складу фаз застосовують також метод хімічного закріплення нерухомої фази на сорбенті. При цьому використовують взаємодію розчинника з групами OH^- на поверхні носія. Носій нерухомої фази повинен володіти досить розвиненою поверхнею, бути хімічно інертним, міцно утримувати на своїй поверхні рідку фазу і не розчинятися у розчинниках, які використовуються.

Рідинно-хроматографічні методи поєднують розділення компонентів суміші із прямим детектуванням речовин за допомогою оптичних детекторів, які працюють в ультрафіолетовій, видимій, інфрачервоній областях, рефрактометричними, емісійними, флуориметричними, електрохімічними та іншими детекторами. Вибирати детектор необхідно виходячи з мети аналізу і умов його проведення.

Діодноматричний детектор – універсальний детектор спектрофотометрії. Він може працювати як в одно/багатохвильовому (висока чутливість – кількісний аналіз), так і в спектральному (ідентифікація за бібліотеками електронних спектрів – якісний аналіз) режимах. Програмне забезпечення сучасних хроматографів дозволяє аналізувати “чистоту” піків, тобто визначати чи відповідає хроматографічний пік чистій речовині або суміші декількох речовин, вибирати ширину оптичної щілини в діапазоні від 1 до 16 нм (аналіз тонкої структури спектру чи висока чутливість). Детектор сполучений з іншими блоками в локальну мережу. Нові спектрофотометричні детектори забезпечені знімними картами пам’яті, що унеможлиблює втрати отримуваних даних.

Флуориметричний детектор. Принцип дії флуориметричного детектору заснований на вимірі флуоресцентного випромінювання поглиненого світла. Поглинання зазвичай проводять в УФ-області спектру при довжині хвилі максимального поглинання для даної групи речовин, а випромінювання вимірюють на виході фільтру, що не пропускає промені збудження.

У зв'язку з тим, що детектування ведеться від нульової інтенсивності флуоресценції, даний тип детектора чутливіший в порівнянні з детекторами поглинання. Для речовин, які сильно флуоресціюють, межа детектування досягає 10^{-12} г. Висока чутливість є одним з головних його переваг. За допомогою флуориметричного детектора з високою чутливістю можна детектувати амінокислоти, аміни, вітаміни та стероїди. Цей детектор можна також застосовувати для кількісного визначення мікро-домішок речовин і якісного визначення ароматичних вуглеводнів, біологічно активних речовин, метаболітів тощо.

Значне збільшення чутливості флуориметричного детектору можливе при використанні монохроматичного лазера та гнучких оптичних світлодіодів для введення світла безпосередньо в проточну комірку малих розмірів.

Високоефективна рідинна хроматографія (ВЕРХ, англ. HPLC, High performance liquid chromatography). Це один з ефективних методів розділення складних сумішей речовин. Основою хроматографічного розділення є участь компонентів суміші, що розділяється, в складній системі Ван-дер-Ваальсових взаємодій (переважно міжмолекулярних) на межі розділу фаз. ВЕРХ входить до групи методів, які, зважаючи на складність досліджуваних об'єктів, включають попереднє розділення вихідної складної суміші на відносно прості. Отримані прості суміші аналізуються потім звичайними фізико-хімічними методами або за використання рідинної хроматографії.

Використання флуориметричного детектору у ВЕРХ дає можливість підвищити селективність детектування багатьох речовин. Флуоресцентне детектування з одночасною зміною рН рухливої фази після колонки дає можливість збільшити флуоресценцію деяких речовин і робить детектування більш специфічним. Селективність детектування може бути збільшена шляхом ретельного вибору довжини хвилі детектування. Одночасне сканування довжини хвиль збудження і емісії дозволяє встановити чистоту

речовини, що реєструється одним піком, провести його ідентифікацію.

Особливістю ВЕРХ є використання високого тиску і дрібнозернистих сорбентів (зазвичай 3–5 мкм, навіть до 1,8 мкм). За механізмом розділення речовин, що аналізуються, ВЕРХ ділиться на адсорбційну, розподільну, іонообмінну, лігандообмінну тощо. Проте, в практичній роботі розділення часто протікає не за одним, а за декількома механізмами одночасно.

1.4.6. Хроматомас-спектрометрія

Органічні речовини в більшості випадків є багатоконпонентними сумішами індивідуальних компонентів. Наприклад, показано, що запах смаженої курки складають 400 компонентів (тобто, 400 індивідуальних органічних сполук). Завдання аналітики полягає в тому, щоб визначити ці компоненти (ідентифікувати їх та провести кількісний аналіз). Для цього ідеальним є поєднання хроматографії з мас-спектрометрією. Газова хроматографія підходить для поєднання з іонним джерелом мас-спектрометра та іонізації електронним ударом або хімічною іонізацією, оскільки в колонці хроматографа сполука вже знаходиться в газовій фазі. Прилади, в яких мас-спектрометричний детектор комбінується з газовим хроматографом, називаються *хроматомас-спектрометрами*.

Певну частину органічних сполук неможливо розділити на компоненти за допомогою газової хроматографії, але можливо за допомогою рідинної хроматографії. Для поєднання рідинної хроматографії з мас-спектрометрією сьогодні використовують джерела іонізації в електроспреї (ESI) та хімічної іонізації при атмосферному тиску (APCI), а комбінацію рідинних хроматографів із мас-спектрометрами називають РХ/МС (англ. LC/MS). Найпотужніші системи для органічного аналізу, побудовані на основі надпровідного магніту і працюють за принципом іонно-циклотронного резонансу.

Контрольні питання

1. Які основні правила роботи з кислотами та лугами, токсичними органічними речовинами?
2. Що необхідно враховувати при роботі з легкозаймистими речовинами?
3. Що являє собою перша допомога при травмах та отруєннях?
4. Охарактеризуйте основні типи титрування.
5. Що таке «відносна густина» та як вона визначається?
6. Які існують способи вираження концентрації розчинів?
7. Що таке «молярні розчини»?
8. Як розраховується титр розчину за його нормальністю?
9. Які хімічні реакції покладено в основу титрометричного аналізу?
10. У чому полягає суть реакції нейтралізації?
11. Яку масу сухого натрію гідроксиду необхідно зважити для приготування 150 см³ 2 н. розчину лугу?
12. На титрування 10 см³ розчину натрію гідроксиду пішло 15 см³ 0,1 н. розчину сульфатної кислоти. Чому дорівнює концентрація розчину NaOH?
13. Який індикатор можна використовувати при титруванні NaOH розчином HCl за відсутності розчиненого CO₂?
14. Назвіть робочі розчини в оксидиметрії.
15. Дайте характеристику методам осадження.
16. На чому ґрунтується комплексометричний метод аналізу?
17. Вкажіть переваги та недоліки електрохімічних методів аналізу.
18. На чому засновані потенціометричні методи аналізу?
19. Яка залежність виражається рівнянням Нернста?
20. Які функції виконують індикаторні електроди, а які – електроди порівняння? Вкажіть вимоги, які до них пред'являються.
21. У чому суть потенціометричного визначення рН розчину? Які індикаторні електроди можуть бути використані для визначення рН?
22. Як влаштований скляний електрод? Вкажіть переваги та недоліки скляного електроду.
23. Які основні типи іоноселективних електродів? Як вони влаштовані? Які мають характеристики?

24. Вкажіть переваги, недоліки і сфери застосування методу прямої потенціометрії.
25. Які закономірності лежить в основі кондуктометричного аналізу?
26. Які одиниці використовуються в кондуктометричному аналізі?
27. Як практично визначають концентрацію методом прямої кондуктометрії? Чому використовується графічний метод?
28. Які види кондуктометрії використовуються в хімічному аналізі?
29. Який метод кількісного аналізу називається полярографією?
30. Який індикаторний електрод використовують в полярографії, охарактеризуйте його?
31. Які можливості полярографії при аналізі окремих речовин та їх сумішей?
32. Які оптичні методи відносяться до молекулярних абсорбційних методів?
33. Який закон зв'язує кількісне значення світлопоглинання із концентрацією поглинаючої речовини?
34. Назвіть основні вузли спектрофотометра.
35. Дайте визначення терміну «екстинція».
36. Вкажіть діапазон довжин хвиль для УФ т видимої області спектра.
37. В яких координатах будують градувальник графік у фотометричних методах аналізу?
38. На яких явищах базується полум'яна спектрометрія?
39. Яка природа і походження атомних емісійних спектрів? Чому атомні спектри мають лінійчатий характер?
40. Які властивості атомів і іонів лежить в основі методу полум'яної спектрофотометрії?
41. На якому явищі базується рефрактометричний метод аналізу речовин?
42. На чому заснований атомно-абсорбційний аналіз: а) на реєстрації поглинення світла атомами речовини; б) на реєстрації світла, яке поглинули молекули речовини; в) на реєстрації світла, яке випромінюють збуджені молекули?
43. Які показники вимірюють за використання методу атомної абсорбції?

44. Які джерела збудження атомів використовують для атомно-абсорбційного визначення речовин?

45. Які горючі суміші використовуються для отримання полум'я в атомно-абсорбційному аналізі?

46. Перерахуйте основні вузли атомно-абсорбційного спектрофотометру.

47. На яких явищах базується емісійний спектрофотометричний аналіз?

48. У чому полягає істотна відмінність мас-спектрометрії від інших оптичних методів?

49. В чому суть хроматографічного розділення за методом: а) іонообмінної хроматографії; б) газорідинної хроматографії; в) розподільної рідинно-рідинної хроматографії; г) тонкошарової хроматографії?

50. Які сфери застосування, переваги і недоліки адсорбційної хроматографії?

51. Які вимоги пред'являються до адсорбентів і розчинників?

52. Які способи застосовують для визначення ефективності хроматографічних розділень?

53. Які сфери застосування, переваги і недоліки методів газової хроматографії?

54. Які вимоги пред'являються до рідкої фази в газово-рідинній хроматографії? Які речовини використовують як рідку фазу, як твердий носій?

55. Дайте визначення наступних понять: а) висота хроматографічного піку; б) ширина хроматографічного піку; в) утримуваний об'єм.

56. У чому суть методів кількісного аналізу: а) абсолютного калібрування; б) внутрішньої нормалізації (нормування); в) внутрішнього стандарту?

57. У чому суть іонообмінної хроматографії?

58. Які сфери застосування, переваги і недоліки а) тонкошарової хроматографії; б) осадової хроматографії; в) іонообмінної хроматографії?

59. Що покладено в основу хроматографічного розділення методом високоефективної рідинної хроматографії?

РЕКОМЕНДОВАНА ЛІТЕРАТУРА

1. Аналітичні методи досліджень. Спектроскопічні методи аналізу: теоретичні основи і методики: навч. посібник для підготовки студентів вищих навчальних закладів / Д. О. Мельничук, С. Д. Мельничук, В. М. Войціцький [та ін.]: за ред. Д. О. Мельничука. – К.: ЦП «Компринт», 2016. – 289 с.

2. Аналітичні методи досліджень. Хроматографічні та електрофоретичні методи аналізу: теоретичні основи і методики: навч. посібник для підготовки студентів вищих навчальних закладів / В. М. Войціцький, С. В. Хижняк, В. А. Грищенко [та ін.]. – К.: ЦП «Компринт», 2017. – 268 с.

3. AFLAPREP[®] Application of immunoaffinity columns for sample clean-up prior to HPLC analysis for aflatoxins (AFLAPREP[®] Застосування імуноафінних колонок для очистки зразків для визначення вмісту афлатоксинів методом високоефективної рідинної хроматографії).

4. Агасян П. К. Кулонометрический метод анализа / П. К. Агасян, Хамракулов Т.К.. – М., 1984. – 176 с.

5. Агасян П. К. Основы электрохимических методов анализа. Потенциометрический метод / П. К. Агасян, Е. Р. Николаева – М., 1986. – 176 с.

6. Айвазов Б. В. Основы газовой хроматографии / Б. В. Айвазов. – М.: «Высшая школа», 1990. – 215 с.

7. Аналитическая химия. Проблемы и подходы. В 2 кн. / Под ред. Р. Кельнера, Ж.-М. Мерме, М. Отто, М. Видмера. – М.: Мир, 2004. – 320 с.

8. Гайдукевич О. М. Аналітична хімія / О. М. Гайдукевич, В. В. Болотов та ін. – Харків «Основа», 2000. – С. 358–368.

9. Голицын В. М. Неденатурирующий электрофорез. Фракционирование фотосинтетических пигмент-белковых комплексов и белков плазмы крови / В. М. Голицын // Биохимия. – 1999. – Т. 64. – С. 64–70.

10. Дубініна А. А. Токсичні речовини у харчових продуктах та методи їх визначення: Підруч. / А. А. Дубініна, Л. П. Малюк, Г. А. Селютына [та ін.]. – К.: «Видавничий дім «Професіонал», 2007. – 384 с.

11. Золотов Ю. А. Основы аналитической химии. В 2 кн. Учеб. для вузов / Ю. А. Золотов, Я. Н. Дорохова, Фадеева [и др.]: под ред. Ю. А. Золотова – М.: Высшая школа, 2002. – 351 с.

12. IRIS спектрометр с индуктивно-связанной плазмой, руководство по эксплуатации спектрометра.

13. Коренман Я. И. Практикум по аналитической химии. Хроматографические методы анализа: Учебное пособие / Я. И. Коренман. – Воронеж, 2000. – 336 с.

14. Кучеренко Н. Е. Современные методы биохимических исследований / Н. Е. Кучеренко, Ю. Д. Бабенюк, В. М. Войцицкий. – К.: Фитосоциоцентр, 2001. – 424 с.

15. Харитонов Ю.Я. Аналітична хімія. Кн. 2. / Ю. Я. Харитонов. – М.: Вища школа, 2003. – 345 с.

16. Чмиленко Ф. О. Методи атомної спектроскопії: атомно-абсорбційний спектральний аналіз / Ф. О. Чмиленко, Т. М. Деркач. – Дн-ск: РВВ ДНУ, 2002. – 120 с.

ЧАСТИНА II

МЕТОДИКИ ПРОВЕДЕННЯ АНАЛІЗУ РЕЧОВИН БІОХІМІЧНИМИ МЕТОДАМИ

Практична робота 2.1. Техніка безпеки в лабораторії

Виконання вимірювальних робіт в хіміко-аналітичній лабораторії пов'язано з рядом небезпечних та шкідливих виробничих чинників. Основою безпечної роботи є дотримання правил безпеки і протипожежних заходів.

Лабораторії обов'язково повинні задовольняти санітарно-гігієнічним вимогам. Стіни лабораторії повинні бути обкладені кахлем або зафарбовані олійною фарбою, а підлога – застелена лінолеумом або викладена кахельною плиткою. Лабораторія повинна мати витяжну вентиляцію, протипожежне обладнання (пінний або вуглекислий вогнегасники, за необхідності ящик з піском), засоби індивідуального захисту (гумові рукавички, захисні окуляри, за необхідності респіратори тощо), аптечку для надання першої допомоги при різних травмах та отруєннях. Працювати в лабораторії можна тільки в халаті з бавовняної тканини.

В лабораторії робочим місцем є лабораторний стіл, який повинний бути покритий кахельною плиткою або кислототривким пластиком. Обладнання розміщується також на вкритих пожежостійкими матеріалами лабораторних столах. Реактиви та препарати, які необхідні для виконання роботи, слід розміщувати на робочому місці тільки в необхідній кількості та безпосередньо перед виконанням роботи.

Крім основних приміщень в лабораторії повинні бути допоміжні – пробопідготовки, мийна, апаратна, підсобна тощо. Кожне з них повинно бути обладнано згідно санітарно-гігієнічних правил.

В кожній лабораторії повинні бути перелік інструкцій з охорони праці та пожежної безпеки, який затверджений особою за наказом керівника установи. Виконавець робіт повинен пройти інструктаж з техніки безпеки праці і протипожежних заходів. До робіт в хіміко-аналітичній лабораторії допускаються особи, яким на момент виконання робіт виповнилося 18 років.

Роботу з рідкими, отруйними або з різким запахом речовинами слід проводити тільки у витяжній шафі. Затягувати їдкі рідини в скляну піпетку потрібно тільки за допомогою гумової груші або

спеціальних пристроїв і не в якому разі не робити це ротом. Найкраще це робити за допомогою автоматичних дозаторів. Категорично забороняється пробувати на смак будь-які речовини, а також використовувати в роботі такі, що зберігаються у посуді без підпису.

Забороняється на робочому місці вживати їжу та напої, пити воду з хімічного посуду, палити, користуватися косметикою.

Робота з легкозаймистими речовинами. Вогненебезпечні речовини (етери, спирти, бензол, ацетон та ін.) необхідно зберігати в окремому приміщенні. Забороняється нагрівати бані з вогненебезпечними рідинами, на відкритому вогні (запалені пальники), а також на джерелах тепла з нерегульованим тепловим потоком.

При випадковому розлитті легкозаймистих рідин необхідно терміново вжити заходи для ліквідації аварійної ситуації. При виникненні в приміщенні локальної пожежі вогонь слід швидко накрити шматком азбестової тканини, а також скористатися вогнегасником. Якщо рідини, що спалахнули розтеклися (етери, бензин, тощо), то їх гасять піском, а водорозчинні речовини, що загорілися (спирти, ацетон, тощо) – водою. Людину, на якій зайнявся одяг, необхідно швидко і щільно загорнути у протипожежну кошму, щоби загасити полум'я.

При гасінні полум'я пінними вогнегасниками необхідно попередньо вимкнути електричний струм у всіх приміщеннях за допомогою загального рубильника. Всі приміщення лабораторії повинні бути обладнані спеціальними датчиками на випадок пожежі з виведенням сигналу на пульт чергового по лабораторії або пожежної частини.

Правила електробезпеки. Апаратура в лабораторіях підключена, як правило, до мережі змінного струму з електричною напругою 220 або 380 В та є небезпечною при порушенні правил електробезпеки. Електроприлади обов'язково повинні мати окреме від допоміжних комунікацій (водопровідні та газові труби, батареї опалення та ін.) заземлення.

Лабораторна апаратура та її допоміжні блоки розміщуються в сухому просторі приміщенні на спеціально обладнаних лабораторних столах. Відносна вологість повітря в лабораторії повинна бути 60–70 %. Пари кислот, аміаку та інших агресивних летких речовин повинні бути відсутні. При ураженні електричним струмом потерпілого до його оголених частин тіла забороняється торкатися

голими руками (без гумових рукавичок) до вимкнення електричного струму за допомогою загального рубильника.

Правила роботи з балонами, які містять стислий газ, та вакуумними приладами. При виконанні ряду робіт в хіміко-аналітичній лабораторії використовують гази, які знаходяться під тиском. Це можуть бути інертні гази (наприклад, аргон, азот, гелій, вуглецю діоксид) або вибухонебезпечні, які здатні до горіння (водень, кисень). Гази знаходяться, як правило, в балонах під тиском до 250 атм. В залежності від вмісту газу балони пофарбовані у певний колір.

Гази відбирають з балонів за допомогою редукторів, які пофарбовані у колір відповідний до кольору балону. Відбір газів без відповідного редуктору категорично забороняється.

При використанні стисненого газу (в деяких випадках скрапленого) насамперед необхідно ретельно перевірити справний стан балону та редуктору і те, що термін придатності балону ще не закінчився. При закінченні терміну чергової придатності балону, а також пошкодженні корпусу балону або редуктора ними користуватися заборонено.

Балони з газом треба оберегти від поштовхів, механічних пошкоджень та нагріву. Їх вміщують у металеві ящики, які знаходяться поза приміщенням, а газ підводять в лабораторію спеціальними трубопроводами, який монтують згідно певних правил. Установку балонів, підключення редукторів роблять спеціально навчені працівники.

Після закінчення роботи вентиль балона закривають, випускають газ з редуктора, послаблюють регулюючий гвинт. Категорично забороняється залишати балон з газом без нагляду з незакритим вентиляем.

В разі виявлення в приміщенні запаху газу, необхідно негайно перевірити закриття вентиля балону, приміщення провітрити, утворюючи в ньому протяг. Якщо відчувається запах газу, який може спалахнути, то ні в якому разі не можна запалювати вогонь або вмикати (вимикати) електричний струм. При роботі з вакуумними пристроями, в яких використовуються водострумні або масляні насоси (вакуум-ексикатори, вакуумне фільтрування тощо) вакуумний посуд обов'язково слід загорнути в ганчірку або використати спеціальну захисну сітку. Очі слід захистити окулярами,

щитком або маскою з органічного скла, які знімають тільки після охолодження приладу і випускання в нього повітря.

Правила роботи з кислотами та лугами, токсичним органічними речовинами. Небезпечним є необережне поводження з кислотами та лугами. Навіть слабкі кислоти (наприклад, оцтова) при високих концентраціях здатні спричинити хімічні опіки. Тому всі роботи з кислотами та лугами необхідно проводити у витяжній шафі, при цьому надягнути захисні окуляри чи маску і гумові рукавички, а при переливанні рідких кислот або розчинів лугів з великої ємності в малу, слід надягнути гумовий фартух і використовувати сифон або спеціальний штатив з нахилом. Для розведення кислоти вливають тоненьким струмом у воду при постійному перемішуванні і таким чином не допускають перегріву. Нейтралізацію кислот або лугів необхідно проводити тільки після їх розведення.

Деякі органічні сполуки – галогенові похідні вуглеводневих сполук (хлорбензол, чотирихлористий вуглець та ін.), аліфатичні аміни, ароматичні (наприклад, анілін), ароматичні вуглеводні (бензол, толуол, діоксан та ін.) – токсичні. З цими речовинами слід поводитися дуже обережно, запобігати потраплянню в очі та на шкіру і не вдихати їхні пари. Пари бензилхлориду і бензальдегіду, а також деяких інших речовин викликають подразливу дію на слизові оболонки очей і верхніх дихальних шляхів. Етиленгліколь та деякі інші речовини можуть всмоктуватися крізь шкіру і є особливо небезпечними при пероральному надходженні в організм.

Правила роботи зі скляним посудом. На стадії попередньої підготовки проб, їх зберіганні та перенесенні широко використовується хімічний скляний посуд. З скла виготовлюється також ряд обладнання, зокрема хроматографічні колонки, різноманітні трубки для подачі рідин.

При неправильному поводженні з хімічним скляним посудом та обладнанням з скла або кварцу можливі нещасні випадки. Розчинення кислот, лугів ангідридів та деяких солей супроводжується різким збільшенням температури внаслідок екзотермічного процесу. Тому в цьому випадку необхідно використовувати тільки термостійкий скляний посуд, який має відповідне маркування.

Скляні пробірки з розчином слід нагрівати з використанням спеціальних утримувачів поступово, безперервно їх обертають. Не можна нагрівати рідини в закупореному посуді. Забороняється

нахилятися над посудом з рідиною при її нагріванні. Обвуглювання проб виконують в кварцовому або порцеляновому хімічному посуді.

Скляний посуд великих розмірів і скляні прилади переносять тільки обома руками. Великі (більш 5 дм³) скляні сулії з рідиною необхідно переносити вдвох у спеціальних кошиках або ящиках з ручками. Забороняється піднімати скляні сулії за шийку.

Перша допомога при травмах та отруєннях. Опіки в лабораторії можуть бути спричинені вогнем, парою, гарячими або розжареними речовинами, кислотами, лугами, а також речовинами, які мають дуже низьку температуру (рідкий азот, кисень, вуглекислота та ін.).

При термічних опіках не можна змочувати обпечене місце водою, проривати утворені пухирці і перев'язувати опік бинтом. Необхідно на обпечене місце при незначних опіках покласти складений в декілька разів бинт або марлю, змочені 3 % розчином калію перманганату. При складних опіках слід накласти стерильну пов'язку і звернутися до лікаря.

При потраплянні кислоти на шкіру (соляної, азотної, сірчаної) уражене місце необхідно промити спочатку великою кількістю проточної води, потім змочити 5 % розчином натрію гідрокарбонату або 10 % розчином вуглекислого амонію і знову ретельно промити водою. При опіках лугами після промивання великою кількістю проточної води шкіру обробляють 3 % розчином оцтової кислоти і знову ретельно промивають водою.

В разі ураження слизової оболонки рота (або очей) кислотою необхідно прополоскати (промити) великою кількістю проточної води, а потім прополоскати (промити) 5 % розчином натрію гідрокарбонату. При опіках цих слизових оболонок лугами необхідно теж прополоскати (промити) ретельно проточною водою, а потім 3 % розчином оцтової кислоти або 2 % розчином борної кислоти і знову ретельно водою.

При порізах зупиняють кровотечу, очищують поверхню шкіри навколо рани від бруду і обробляють край рани антисептиком (наприклад, розчином йоду). При виникненні кровотечі рану омивають безпосередньо 3 % розчином гідрогену пероксиду, а потім накладають стерильну серветку і щільно забинтовують. У разі суттєвіших уражень і сильної кровотечі слід накласти стискаючу пов'язку (джгут) вище рани, накрити рану стерильним перев'язу-

вальним матеріалом, вкласти записку про дату і час накладання джгута і викликати лікаря.

В разі отруєння газом потерпілого необхідно негайно вивести на свіже повітря, напоїти великою кількістю молока, надати спокій і викликати лікаря.

При електричних травмах потерпілому до прибуття лікаря забезпечують повний спокій і надходження свіжого повітря.

Практична робота 2.2. Зважування та центрифугування

Зважування речовин. Лабораторні терези розрізняють за призначенням, конструкцією, діапазоном зважування та іншими характеристикам. Розрізняють два різних метода зважування: метод порівняння з мірою і метод безпосередньої оцінки ваги.

У методі порівняння з мірою вагу речовини, яку зважують (наважку), приймають рівною вазі гирьок (важок) або вираховують як суму значень ваги гирьок і показу вагової шкали терез.

У методі безпосередньої оцінки ваги речовини, яку зважують, проводять її визначення по підрахунку вагового пристрою терез без використання гирьок.

Класифікація та характеристика терез

Лабораторні терези характеризуються рядом параметрів, головні з яких:

1. *Гранично допустиме навантаження* – це діапазон, в якому похибка показання терез знаходиться у встановлених межах.

2. *Допустима похибка показання* – це гранична різниця між дійсною вагою речовини, що зважується, і показанням терез. Значення похибки характеризує правильність результатів зважування в стандартних умовах.

3. *Допустима варіація (непостійність) показань* – це гранично допустима різниця показань терез при неодноразовому зважуванні однієї і тієї речовини в стандартних умовах з використанням одних і тих же гирьок. Значення варіації характеризує відтворюваність результатів зважування і, в значній мірі, точність зважування.

4. *Чутливість* – це граничне відношення прирощення відхилення указника терез до прирощення величини, яка вимірюється. Вона визначається числом ділень шкали, на яке відхиляється стрілка терез, коли на одну з чашок терез кладуть певну вагу,

наприклад 1 мг. Виражають чутливість терез в поділках їх вагової шкали, наприклад, на міліграм або зворотною величиною.

5. *Ціна ділення* – це значення ділення пристроїв підрахунку. Вона погоджується з допустимою похибкою або варіацією показання терез.

6. *Швидкодія* – це можлива продуктивність роботи на терезах, тобто можливе число зважувань в одиницю часу.

По призначенню лабораторні терези поділяються на технічні (загально лабораторні), аналітичні і спеціальні. В табл. 2.1 наведені основні характеристики (гранично допустиме навантаження і ціна ділення) основних груп по призначенню терез.

Таблиця 2.1. – Основні характеристики різних за призначенням терез

Терези	Гранично допустиме навантаження	Ціна ділення
Технічні	1–5 кг	1–5 мг
Макроаналітичні	100–200 г	0,05–0,1 мг
Мікроаналітичні	менше 20 г	10^{-2} – 10^{-4} мг
Ультрамикроаналітичні	менше 1 г	10^{-5} – 10^{-7} мг

Спеціальні терези слугують для визначення величин, які залежать від маси (вагові вологометри, терези для виміру магнітної сприйнятливості та ін.).

За значенням *середньої похибки зважування* терези поділяються на 4 класи: перший клас – $1 \cdot 10^{-4}$ %, другий – $5 \cdot 10^{-4}$ %, третій – $1 \cdot 10^{-3}$ % і четвертий клас – $1 \cdot 10^{-2}$ %. Технічні терези відносяться до 3- і 4-го класу, а аналітичні – до 1- і 2-го класу. Гирьки (важки) також діляться на такі ж 4 класи за значення середньої похибки, при чому теж 1- і 2-го класу призначені для аналітичних терез, а 3- і 4-го класу – для технічних терез.

До цих пір в лабораторіях використовуються механічні терези, основні елементи конструкції, яких наведено нижче.

За характером переміщення рухомої системи терези розділяються на безважильні і важильні.

У *безважильних терезах* рухома система переміщується поворотно-поступово вертикально, тому гирьки для урівноваження ваги речовини, що зважується, не використовують.

У *важильних терезах* відбувається поворот рухомої системи навколо нерухомої вісі. Такі терези бувають з вбудованими

гирьками і без них. Важильні терези розрізняються по типу опори важильного ричага і підвісок. Найбільш розповсюдженою опорою є «подушка», по якій гострою гранню перекочуються призми. Терези з такими опорами отримали назву *призмених*. Вони діляться на рівноплечі, двохпризмені (одночашечні) і квадрантні.

Рівноплечні терези – це такі, в яких відстані від прикладення сил до точки опори рівні. Одна з їх різновидностей – це рівноплечі коромислові терези (рис. 2.1).

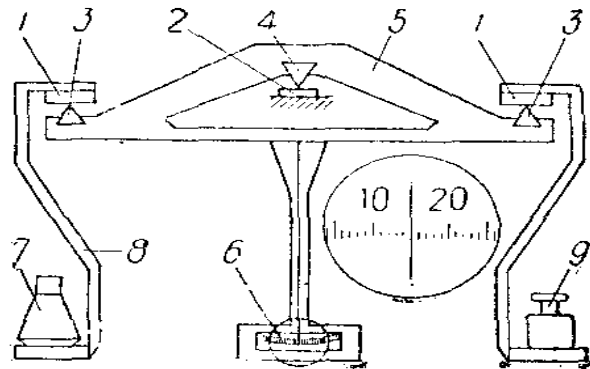


Рис. 2.1. Схема рівноплечих коромислових терез

П р и м і т к а: 1, 2 – «подушка»; 3 – наважкоприймальна призма; 4 – опорна призма; 5 – важиль; 6 – мікроскала; 7 – наважка; 8 – підвіска; 9 – гирьки.

Загальний вигляд рівноплечих технічних коромислових терез наведений на рис. 2.2.

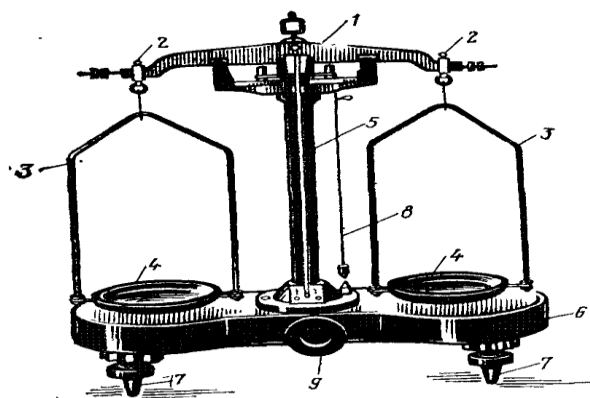


Рис. 2.2. Рівноплечні технічні коромислові терези

П р и м і т к а: 1 – коромисло; 2 – «сережки з призмами»; 3 – підвіска; 4 – чашки; 5 – стрілка; 6 – підставка; 7 – ніжки регулювання; 8 – противіс; 9 – аритир (пристрій для роз'єднування приз і переведення їх в неробочий стан).

Двохпризмені одночашечні терези. У висхідному положенні всі вбудовані гирьки навантажені на підвіску і ричаг урівноважений противагою (рис. 2.3). Після розміщення на грузоприймній чашці наважки з рейки знімають таке число гирьок, щоб їх сумарна вага відповідала приблизно вазі наважки. Різниця між вагою наважки і сумою знятих гирьок визначається по показникам пристрою відрахування.

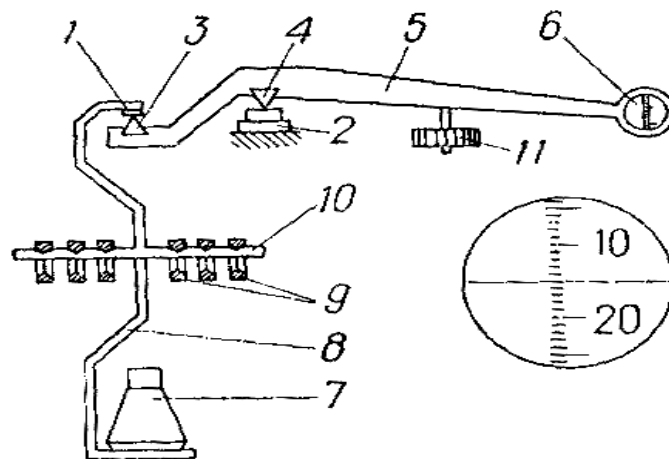


Рис. 2.3. Схема двопризмених терез

П р и м і т к а: 1,2 – «подушки»; 3 – наважкоприймальна призма; 4 – опора призми; 5 – важель; 6 – мікروشкала; 7 – наважка; 8 – підвіска; 9 – гирьки; 10 – рейка; 11 – противага.

Різновидність двохпризменних терез – це *квадрантні* (лат. *quadrantis* – четверта частина) *терези*, які мають верхню грузопід'ємну чашку. Їх схема наведена на рис. 2.4.

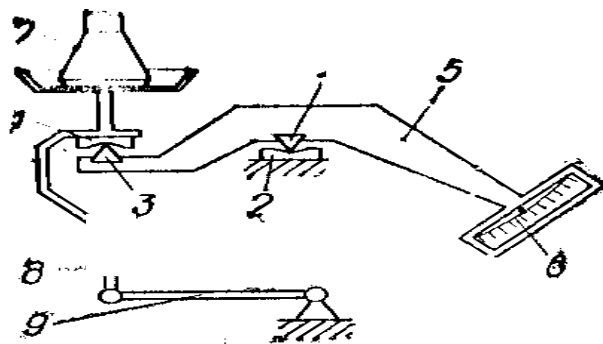


Рис 2.4. Схема квадратних терез

П р и м і т к а: 1,2 – «подушки», 3 – наважкоприймальна призма, 4 – опора призми; 5 – важель; 6 – мікروشкала; 7 – наважка; 8 – підвіска; 9 – «струнка».

Загальний вигляд технічних квадрантних терез наведений на рис. 2.5.

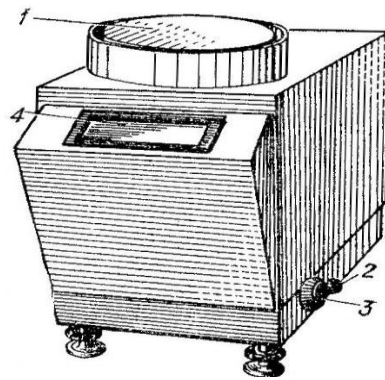


Рис. 2.5. Квадрантні терези

П р и м і т к а: 1 – чашка; 2 – аретир (пристрій для переведення терез в неробочий стан); 3 – ручка пристрою накладання гирьок; 4 – цифровий показчик і освітлення шкали.

У сучасних призмених терезах існують заспокоювачі коливання стрілки, які мають назву *демпфери* (нім. *dämpfer* – глушник). В демпферних терезах за нульову точку і точку рівноваги приймають ділення шкали, проти якого зупиняється стрілка. У терез, які не мають демпферів, ці точки визначають при послідовних декількох качаннях стрілки по середньому значенню.

Для зважування речовин в невеликій кількості використовують *торсійні* (фр. *torsion* – скручування) *терези* (рис. 2.6), які відносяться до терез важильного типу з опорами на пружньодеформуючих елементах (пружинах). Це циферблатні терези, в яких під вагою наважки деформується спіральна пружина.

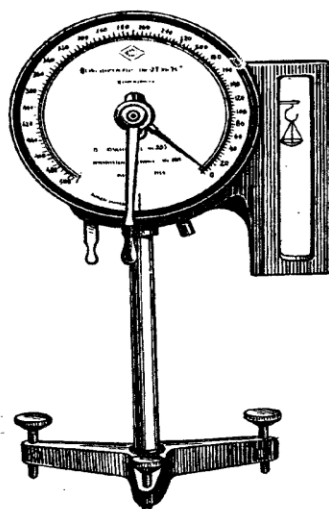


Рис. 2.6. Торсійні терези

Торсійні терези випускають з різною межею зважування – від 10 до 500 мг. Відповідно абсолютна похибка показання – від 0,01 до 1 мг. До такого типу терез відносяться пружильні важильні *ультрамикро-терези*.

Вже відмічалось, що для зважування відносно малих кількостей речовин з великою точністю використовуються *аналітичні терези*. Вони бувають різноманітних типів (періодичного коливання, рівноплечі, двопрізмені тощо). На рис. 2.7 наведені загальний вигляд рівноплечих і двопрізмених аналітичних терез.

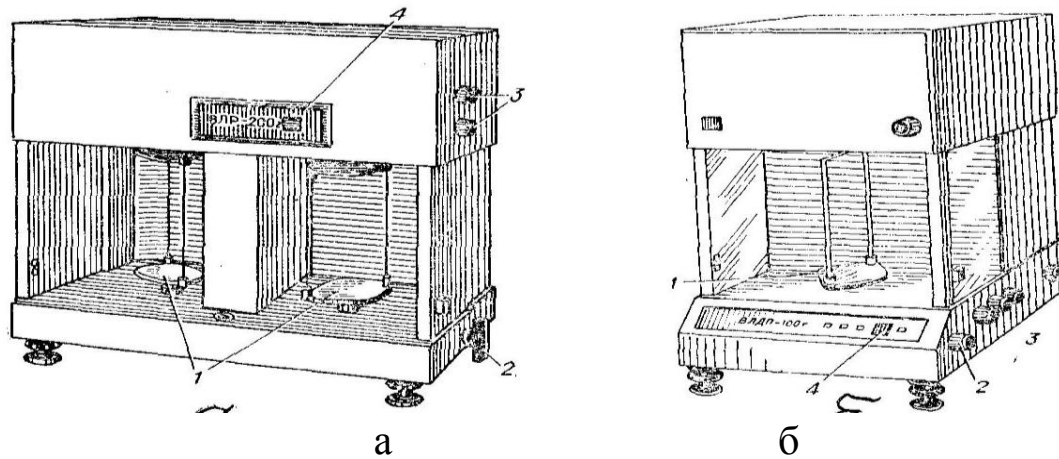


Рис. 2.7. Лабораторні рівноплечі (а) і двопрізмені (б) аналітичні терези

П р и м і т к а: 1 – чашка, 2 – аретир у випадку (а) і ручка для встановлення нуля (б); 3 – ручки пристрою накладання гирьок; 4 – цифровий показчик і освітлення шкала.

На рис. 2.8 наведений загальний вигляд та деякі пристрої аналітичних терез з демпферами.

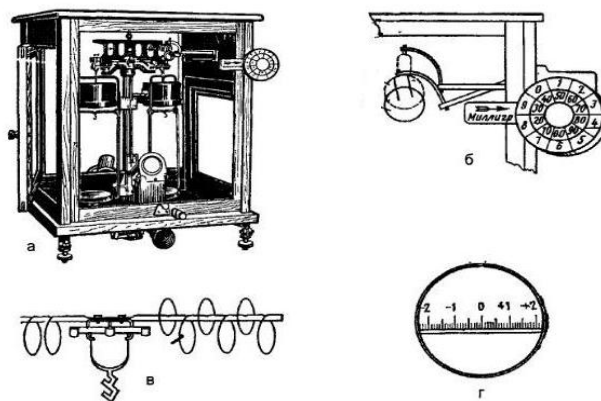


Рис. 2.8. Аналітичні демпферні терези

П р и м і т к а: а – загальний вигляд; б – пристрій для навантаження кільцевих міліграмових гирьок; в – права «серга» з металу-

вою планкою (рейтером); г – мікروشкала на екрані вайтографа (оптичного пристрою).

Стрілка демпферних терез зв'язана з оптичним пристроєм (вайтографом), який дозволяє проводити відрахунки по шкалі, що світиться.

Крім простих механічних аналітичних терез існують також *електронні терези*, які забезпечують широкий діапазон і високий ступінь точності зважування (рис. 2.9). Вони зараз широко використовуються в хімічних аналітичних лабораторіях.



Рис. 2.9. Типові електронні аналітичні терези

Поряд із наведеними вище терезами нині широко використовуються інші їх модифікації (рис. 2.10), які компактні, зручні в експлуатації, а головне – високоточні.



Рис. 2.10. Загальний вигляд деяких сучасних електронних аналітичних терез

Незалежно від конструктивних і функціональних особливостей всі електронні терези містять обов'язково дві головні системи – мікропроцесорну і зважування. Комп'ютерне програмування елек-тронних терез насамперед забезпечує: автоматичне внутрішнє калібрування, яке відслідковує зміну температури, можливість зважування в різних системах одиниць (мг, мкг, каратах, тощо); наявність універсального інтерфейса, що дає можливість підключення до любого зовнішнього пристрою; можливість зчитування штрихкодів та інші.

Аналітичні терези встановлюють на спеціальних столах з масивною кришкою для усунення можливої вібрації.

Загальні правила користування аналітичними терезами та можливі похибки зважування

Правила користування аналітичними терезами. Користування аналітичними терезами підпадає під ряд загальних правил:

1. Навантаження на чашки терезів не повинно перевищувати найбільшого навантаження для даного типу терез. Наважку поміщають на середину чашки, її зважують в скляній посудині (бюксі, на склі годинника тощо). Беруть наважку пінцетом з неметалевими наконечниками або обережно переносять подібним шпателем.

2. Наважка і гирьки повинні мати ту ж температуру, що і терези. Тому перед зважуванням гирьки необхідно витримати поряд з терезами 20–30 хв.

3. Додавляти або зменшувати кількість наважки необхідно тільки поза шкафчиком терез. Якщо речовина наважки просипана на чашку терез або дно шкафчика, то необхідно негайно її змести пензликом.

4. Гирьки (важки) необхідно поміщати в центр чашки. Брати гирьки необхідно пінцетом з пластмасовими (кістяними) наконечниками.

5. Коли гирьки кладуть на чашку терез або знімають з неї, терези повинні бути аритировані (роз'єднані призми і терези переведені в неробочий стан).

6. Перед кожним зважуванням необхідно перевіряти, а якщо треба, то і встановлювати, нульову точку терез. Під час спостереження дверцята шкафчика терез повинні бути закритими.

7. Урівноваження наважки починають з великих гирьок, а потім переходять до більш малих. Необхідно користуватися найменшим числом гирьок, наприклад, брати гирьку 2 г, а не дві по 1 г. Не слід класти гирьку одна на одну. Великі по вазі гирьки треба класти в центр чашки, щоб вона не коливалася.

Похибки зважування. Похибки при точному аналітичному зважуванні можуть відбуватися по різним причинам: від нерівноплечності терез; від зважування в повітрі, а не в пустоті (вакуумі); від зміни ваги тіл в процесі зважування внаслідок коливання температури, вологості, тиску повітря тощо; від неточних значень ваги гирьок; від інструментальних похибок та ін.

Похибки від нерівноплечності терез можна враховувати коли проводиться відносне зважування на одних і тих же терезах. Але у випадку абсолютного зважування необхідно використовувати методи зважування, які виключають таку похибку, наприклад, метод заміщення.

Метод заміщення по Барду враховування помилок зважування заключається в наступному. Наважку поміщають, наприклад, на праву чашку терез і врівноважують певною речовиною (наприклад, тарним грузом) на лівій чашці. Визначають положення рівноваги E_1 . Потім з правої чашки знімають наважку, при цьому з лівої не знімають урівноважену тару, а на праву чашку накладають гирьки в такій кількості, щоб отримати можливість підрахунку по шкалі, і визначають положення рівноваги E_2 . Результат виміру (P) дорівнює вазі накладених гирьок і ще підрахунку по шкалі та визначається по формулі:

$$P=(E_1 - E_2) S, \text{ де}$$

S -чутливість терез.

Метод заміщення по Менделєєву враховування помилок зважування заключається в тому, що на одну з чашок поміщають гирьки в кількості за вагою, яка відповідає граничному навантаженню терез, і урівноважують терези іншими гирьками. Наважку поміщають на чашку з гирьками і знімають таку їх кількість по вазі, щоб терези прийшли в положення висхідної рівноваги. Значення ваги наважки визначають як суму ваги знятих з чашки гирьок і показань по шкалі терез.

Похибки, які викликані зважуванням в повітрі, а не в пустоті (вакуумні). Відомо, що кожне тіло, яке занурене в рідину або газ, втрачає у своїй вазі стільки, скільки важить рідина або газ, які цим тілом витискується. Таким чином, всі тіла в повітрі важать менше, ніж в пустоті (вакуумі). Якщо б гирьки втрачали у своїй вазі при зважуванні у повітрі, стільки як і наважка, то отриманий результат зважування наважки був би правильним. Але гирьки виготовляють з нержавіючої сталі (густина $\rho = 8,0 \text{ г/см}^3$) або з латуні ($\rho = 8,4 \text{ г/см}^3$), а міліграмові важки – з алюмінію ($\rho = 2,7 \text{ г/см}^3$). Якщо густина наважки меша густини гирьок, то наважка витискує менше повітря ніж гирьки і, таким чином, у повітрі така наважка важить менше, ніж в пустоті (вакуумі). Величина такої похибки не перевищує 0,04–0,05 %.

Похибки, які викликані зміною ваги тіл в процесі зважування відбуваються внаслідок поглинання або втрати вологи, випаровування летких речовин, неакуратності дослідника тощо. Ці похибки можуть бути усунуті зважуванням речовин по різниці в атмосфері і в герметично закритому посуді малого об'єму.

Похибки ваги гирьок можуть бути викликані вихідною їх неправи-льною вагою при атестації (відбувається дуже рідко), а також корозією їх матеріалу, забрудненням тощо. Ці похибки можна усунути при порівнянні ваги гирьок, що використовуються, з вагою еталонних гирьок.

Практична робота 2.3. Центрифугування речовин

Один з методів розділення неоднорідних систем (рідких або рідких з твердими частинками) – це використання процесу *седиментації* (лат. *sedimentum* – осідання), тобто осадження під дією центробіжної сили. Якщо седиментацію проводять в спеціальних апаратах, які називаються *центрифугами* (лат. *centrum* – центр та *fuga* – втеча), то такий процес називають *центрифугуванням*.

Основна частина центрифуг – це *ротор*, який обертається з великою швидкістю. Їх виготовляють з титанових або алюмінієвих сплавів. Вони у вигляді насадки закріплюються на валі, який зав'язаний з електродвигуном. Ротори бувають кутові та горизонтальні з підвісними стаканами. *Кутові ротори* (рис. 2.11) виготовляються у вигляді суцільних конусів з комірками для центрифужних пробірок, які розтошовані в роторі під кутом 20–30° до вісі обертання. В них

речовини швидко проходять коротку відстань від стінки центрифужної пробірки, сповзають вниз і утворюють на дні пробірки осад.

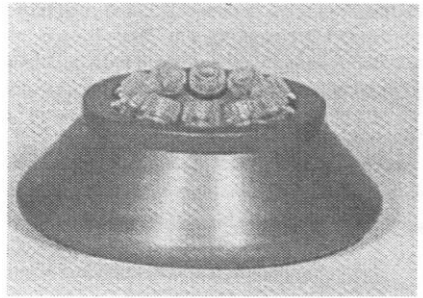


Рис. 2.11. Кутовий ротор

У роторах з вільно підвишеними стаканами (рис. 2.12), які становлять металеві гільзи, пробірки встановлюються вертикально, а при обертанні ротора вони переходять у горизонтальне положення, в якому кут нахилу до вісі обертання становить 90° . Такі ротори називаються ще *бакет-роторами*.

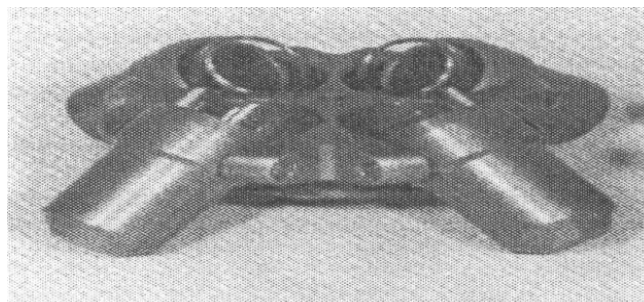


Рис. 2.12. Ротор з вільно підвішеними стаканами (бакет-ротор)

Для формування градієнта густини в середовищі, що центрифугується, використовують також *ротори з вертикально стоячими пробірками*. Розділення речовин за допомогою центрифугування оснований на різниці в швидкості седиментації цих речовин у відцентрованому полі, яка обумовлена різною густиною, формою або розмірами макромолекулярних часток речовини.

Швидкість седиментації залежить від *центробіжного прискорення* G , яке прямопропорційне квадрату кутової швидкості ротора (w , рад./с) і відстані макромолекул речовини від вісі обертання (R , см):

$$G = w^2 R.$$

Оскільки один оберт ротора складає 2π радіан, кутову швидкість ротора за хвилину (w об/хв) можна визначити за формулою:

$$w = \frac{2\pi n}{60},$$

де π – іраціональне число ($\pi = 3,14\dots$);

n – число обертів ротора за секунду;

60 – число секунд в 1 хвилині.

Тоді, центробіжне прискорення буде дорівнювати:

$$G = \frac{4\pi^2 n^2 R}{3600}.$$

Відношення величини центробіжного прискорення (G) до прискорення сили тяжіння ($g = 980$ см/с) називається *відносним центробіжним прискоренням* (ВЦП) і визначається наступним чином:

$$\text{ВЦП} = \frac{w^2 R}{g} = \frac{4\pi^2 n^2 R}{3600 \cdot g} = \frac{4\pi^2 n^2 R}{3600 \cdot 980}.$$

Величина G в залежності від розмірів ротора і швидкості його обертання на практиці визначається за спеціальними номограмами (рис. 2.13) шляхом сполучення прямою лінією значення радіуса та швидкості обертання ротора (крайні шкали). Точка перетину цієї прямої з середньою шкалою дає величину G .

Для визначення форми, розмірів та ступеню гідратації макромолекул використовується *коефіцієнт седиментації* (S), який визначають як відношення величини швидкості обертання ротора (V) до центробіжного прискорення ($w^2 R$):

$$S = \frac{V}{w^2 R}.$$

Коефіцієнт седиментації залежить від концентрації речовин, швидкості центрифугування та іонної сили розчинника, які пов'я-

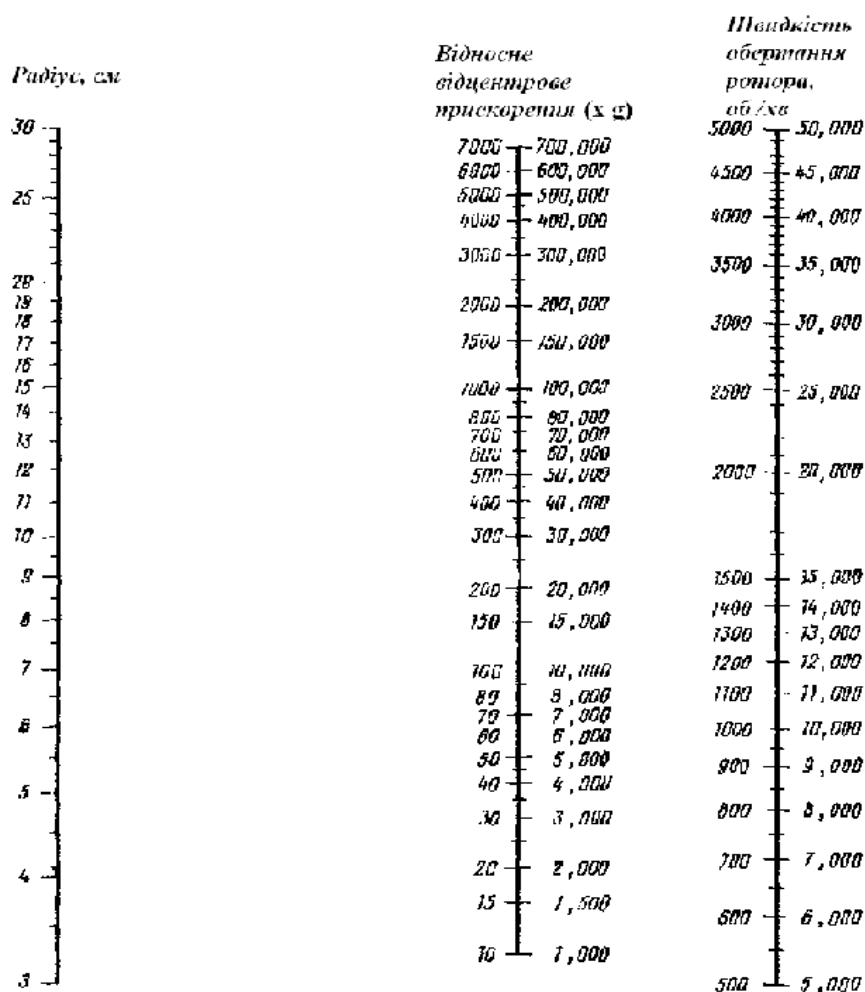


Рис. 2.13. Номограма для розрахунку центробіжного прискорення

зані з наявністю у молекулах електричних зарядів, залежністю форми молекул від складу розчинника та її зміни під час руху тощо.

Для кількісного визначення макромолекул речовини за розмірами та густиною методом центрифугування користуються *константою седиментації*. Вона визначається за коефіцієнтом седиментації при центрифугуванні в стандартному середовищі, яким може бути дистильована вода при 20 °С, в'язкість і густина якої є сталі і відомі. Стандартним середовищем можуть бути інші рідини, для яких відомі їх в'язкість і густина та визначений коефіцієнт седиментації.

Константу седиментації макромолекул знаходять шляхом визначення швидкості осадження їх в момент, коли вони перебувають на зазначеній відстані від вісі ротора, який обертається з певною кутовою швидкістю. При цьому необхідно попередньо

визначити густину речовини, щільність і в'язкість середовища саме в тому місці, де розташовані макромолекули речовини.

Одиницею виміру константи седиментації є Сверберг (S):

$$1S = 10^{-13} \text{с.}$$

Типи центрифуг різноманітні як за будовою, так і наявністю певних пристроїв, зокрема системи охолодження, створення розрідження (для попередження нагріву ротора при обертанні), системи електронного управління (швидкості та часу центрифугування, підтримки певної температури в робочій камері, пуску і зупинки центрифуги) тощо.

За однією з класифікацій розрізняють центрифуги *загального призначення* (центробіжне прискорення до 6 000 g, дозволяють центрифугувати відносно великі об'єми), *швидкісні центрифуги* (центробіжне прискорення до 89 000 g), *препаративні центрифуги* (центробіжне прискорення до 500 000 g), і *аналітичні центрифуги* (центробіжне прискорення від 500 000 g і більше). Але основна їх відмінність – це величина *фактора розділення* (F_r), який дорівнює відношенню прискорення центробіжного поля, яке розвивається в центрифугі, до прискорення сили тяжіння (гравітаційної сталої g), тобто чисельно це величина ВЦП (див. вище). Фактор розділення свідчить, у скільки разів центробіжне прискорення, яке розвивається в конкретній центрифугі, більше, прискорення сили тяжіння. Він пропорційний числу обертів ротора центрифуги в квадраті (n^2) і найбільшому внутрішньому радіусу ротора (R). Розділяюча здатність центрифуги зростає пропорційно фактору розділення.

Фактор розділення типових центрифуг для хімічних аналітичних досліджень варіює, як правило, в межах від 1 600 до 30 000, а частота обертання ротора – від 1 000 до 350 000 об/хв.

Для порівняння центрифуг за розділяючою здатністю інколи використовують здобуток фактора розділення (F_r) на площу робочої поверхні ротора (S_p), який називається *індексом продуктивності центрифуги* (ІПЦ):

$$\text{ІПЦ} = F_r \cdot S_p.$$

За величиною фактора розділення центрифуги розділяються на звичайні (з фактором розділення менше 3 500), супер- і ультрацен-

трифуги (з фактором розділення більше 3 500). Звичайні центрифуги використовуються, як правило, для розділення низькодисперсних (відносно великі розміри частинок – діаметр більше 10–50 мкм) суспензій різної концентрації.

Загальний вигляд настільної звичайної центрифуги наведений на рис. 2.14а.



Рис. 2.14. Загальний вигляд настільної звичайної центрифуги (а) і ультрацентрифуги (б)

Суперцентрифуги використовуються в основному для розділення емульсій і високодисперсних суспензій (величина частинок менше 10 мкм). Для розділення високодисперсних систем і високомолекулярних сполук використовуються *ультрацентрифуги* з фактором розділення більше 100 000. Загальний вигляд ультрацентрифуги наведений на рис. 2.14, б.

Припаративні ультрацентрифуги використовуються для виділення речовин з розчинів, які в звичайних умовах знаходяться в колоїдному стані або у вигляді нерозділених суспензій (білки, полісахариди, нуклеїнові кислоти та ін.).

Основні види **препаративного ультрацентрифугування**: диференціальне, зонально-швидкісне і рівноважне.

В основі *диференціального (роздільного) центрифугування* лежить почергове, роздільне осадження частинок макромолекул. Воно базується на різниці швидкості седиментації частинок в суміші, які відрізняються одна від одної розмірами та щільністю. Це досягається шляхом ступінчатого збільшення центробіжного прискорення. В результаті первісного центрифугування отримують фракцію (осад) важких частинок, яку суспендують в розчині та знову центрифугують при більшому, ніж попередньому, центробіжному прискоренні. Цю процедуру повторюють декілька разів до отримання в осаді необхідних

частинок (макромолекул). В свою чергу, центрифугування надосадкової рідини при більших швидкостях або протягом тривалого часу приводить до осадження частинок (макромолекул), які мали середні або малі розміри і не випадали в осад при первинному (або наступному за ним) центрифугуванні (рис. 2.15).

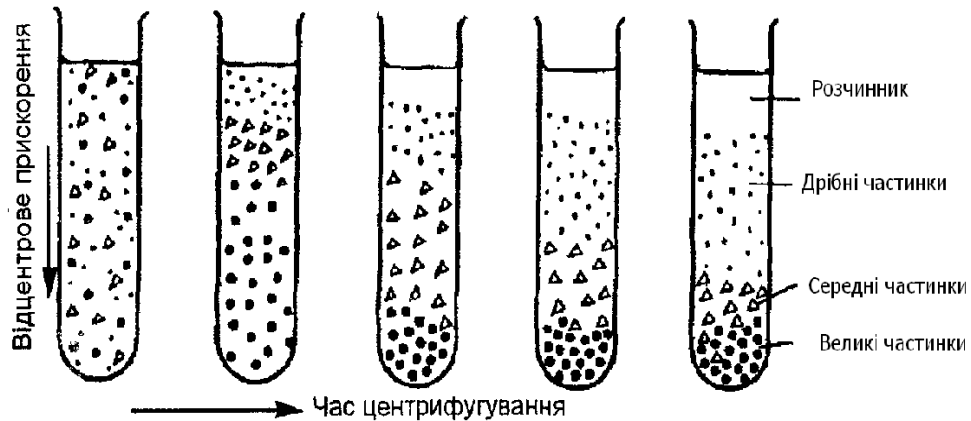


Рис. 2.15. Послідовність операцій при диференційному (роздільному) центрифугуванні

Загально-швидкісне центрифугування полягає в тому, що частинки (макромолекули), щільність яких значно більша за густину середовища, розділяються за швидкістю седиментації. При цьому осад не утворюється, а частинки (макромолекули) різних розмірів зосереджуються в дискретних шарах (смугах) – відбувається зональне розмежування. Для того, щоби шари смуги під час центрифугування не змішувалися і були вузькими, створюють градієнт густини середовища вздовж радіуса обертання в напрямку від центра до периферії.

Вибір того чи іншого градієнта визначається конкретними задачами центрифугування. Для його створення використовують розчини різної концентрації (густини) сахарози, гліцерину, метризаміду, фіколу та ін. Найчастіше використовується сахароза з фіксованим рН, оскільки вона не взаємодіє з більшістю хімічних речовин і дає можливість застосовувати спектроскопічні методи аналізу. Залежність густини і в'язкості сахарози від її концентрації наведена в табл. 2.2.

Гліцерин посилює стабільність білків, у тому числі ферментів; метризалін (похідне трийодбензонної кислоти) не впливає на ступінь гідратації біополімерів, тобто забезпечує їх стійкість; розчини фіколу мають значну, порівняно з сахарозою, в'язкість.

Таблиця 2.2. – Властивості розчинів сахарози

Концентрація		Густина, г/см ³		В'язкість, 10 ⁻² П	
вагова	об'ємна	0 °С	20 °С	0 °С	20 °С
2,49	2,5	1,010	1,008	1,90	1,06
4,92	5,0	1,020	1,017	2,04	1,13
12,01	12,6	1,050	1,047	4,45	1,43
23,15	25,4	1,100	1,095	19,8	2,45
43,11	51,5	1,200	1,193	19,8	7,95

Профіль градієнта густини розчину створюють як правило, ступінчато і лінійно. При створенні ступінчастого градієнта декілька розчинів з послідовною зменшеною концентрацією (густиною) вносять в центрифужну пробірку за допомогою піпетки. Створення лінійного градієнта проводять плавним чином за допомогою спеціальних пристроїв.

Після закінчення центрифугування зони (смуги) в пробірці фракціонують, як правило, шляхом відсмоктування (починаючи з дна пробірки) шприцом з опущеною в шар (смугу) голкою або спеціальним пристроєм. Отримані окремі фракції аналізують необхідними методами, які використовуються в аналітичному аналізі, зокрема спектрометричними.

Рівноважне (ізопікнічне) центрифугування базується на створенні такого градієнта, щоби густина розчину на дні пробірки була більшою, ніж у найщільніших його місцях, а в меніску (зверху пробірки) – найменша ніж самих малих частинок (макромолекул) суміші, яка розділяється. В цих умовах частинки (макромолекул) мігрують вздовж градієнта рідини доти, поки не досягнуть положення, в якому густина середовища зрівнюється з їхньою щільністю. Таким чином, частинки (макромолекули) з різною щільністю будуть розташовані в різних ділянках градієнта у вигляді окремих шарів (смуг).

Для створення градієнта густини в рівноважному (ізопікнічному) методі центрифугування використовують, як правило, солі важких металів (зокрема, CsCl або Cs₂SO₄), трихлорацетат (CCl₃COOH₅), калію або натрію хлориди (KCl або NaCl), метризамід тощо. Вибір солі визначається, в першу чергу, співвідношенням густини (концентрації) розчинів та щільності в них досліджуваної речовини.

Аналітичне центрифугування використовується для розділення емульсій та тонкодисперсних суспензій, вивчення седиментаційних властивостей речовин, визначення молекулярної маси речовин тощо.

Аналітичні центрифуги, як вже відмічалось, можуть розвивати швидкість до 70 000 об/хв, при цьому створювати центробіжне прискорення до 500 000g. Ротор в них, як правило, має еліпсоподібну форму і насаджується на вал електродвигуна за допомогою спеціальної струни, що дозволяє змінювати швидкість його обертання.

Визначення молекулярних мас макромолекул проводять, як правило, трьома методами аналітичного ультрацентрифугування:

1. *Визначення молекулярної маси по швидкості седиментації.* В основі цього методу лежить переміщення макромолекул, які були спочатку рівномірно розподілені по всьому об'єму, по радіусу від центра обертання. Між областю розчинника, яка звільняється від макромолекул, а також тією його частинкою, що їх містить, утворюється чітка межа розподілу. Ця межа при центрифугуванні переміщується, що дає можливість визначити швидкість седиментації макромолекул, за якою визначається за рівняння Сведберга молекулярна маса (M) макромолекул:

$$M = \frac{STR}{P(1 - V_p)}$$

де S – коефіцієнт седиментації макромолекули; R – газова стала; T – абсолютна температура; P – коефіцієнт дифузії макромолекули; V – парціальний питомий об'єм (об'єм, який займає 1 г розчинених макро-молекул); ρ – густина розчинника .

2. *Метод седиментаційної рівноваги* базується на тому, що при відносно невеликих швидкостях центрифугування (7 000–8 000 об/хв) можна досягнути такого стану, що макромолекули не осаджуються, а під дією центробіжних сил з одного боку і дифузних з іншого боку досягається рівноваги, тобто макромолекули перестають переміщуватися. Молекулярну масу макромолекул розраховують по утвореному градієнту концентрації наступним чином:

$$M = \frac{2RT \ln(C_2 - C_1)}{w^2 (1 - V_p) \cdot (R_2^2 - R_1^2)}$$

де R – газова стала; T – абсолютна температура; V – парціальний питомий об’єм; ρ – густина розчинника; C_1 і C_2 – концентрація макромолекул на відстані R_1 і R_2 від вісі обертання ротора; w – кутова швидкість.

3. *Метод наближення до седиментаційної рівноваги* базується на тому, що молекулярна маса макромолекул визначається в стані наближеної рівноваги. Спочатку при ультрацентрифугуванні макромолекули розподіляють по всьому об’єму пробірки рівномірно, а потім по мірі центрифугування макромолекули осідають і густина розчинна зверху пробірки (меніска) поступово зменшується. Зміну густини реєструють, і з її урахування визначають молекулярну масу макромолекул наступним чином:

$$M_M = \frac{RT}{(1-V\rho)} \cdot \frac{(dc/dr)_M}{w^2 C_M R_M}; \quad M_D = \frac{RT}{(1-V\rho)} \cdot \frac{(dc/dr)_D}{w^2 C_D R_D},$$

де M_M і M_D – величина молекулярної маси, яка визначена за розділенням концентрації макромолекул в меніску та дні пробірки, відповідно; R – газова стала; T – абсолютна температура; V – парціальний питомий об’єм; ρ – густина розчинника; dc/dr – градієнт концентрації макромолекул; R_M і R_D – відстань до меніска і дна пробірки, відповідно; C_M і C_D – концентрація макромолекул в меніску і на дні пробірки, відповідно.

Визначення молекулярної маси макромолекул може бути застосовано для оцінки чистоти цих макромолекул.

Лабораторна робота 2.1. Визначення кислотного числа титриметричним методом з візуальною індикацією

Кислотне число – фізична величина, яка дорівнює масі калію гідроксиду в мг, що необхідна для нейтралізування суми вільних жирних кислот та інших супутніх триацилгліцеролам речовин, які нейтралізуються лугом, що міститься в 1 г олії.

Суть методу полягає в розчиненні певної маси жиру чи олії в суміші розчинників із подальшим титруванням вільних жирних кислот водним чи спиртовим розчином калію або натрію гідроксиду.

Матеріал для дослідження: жири тваринні і рослинні та олії.

Устаткування, реактиви, лабораторний посуд і матеріали:
ваги лабораторні 2-го класу точності з межею зважування 200 г; баня водяна; колби конічні на 100 і 250 см³; циліндри вимірювальні на 50 см³; бюретки на 2 см³, 5, 25 см³; діетиловий етер; спирт етиловий; фенолфталеїн, спиртовий розчин з масовою часткою 1 %; 0,1 н. спиртовий розчин калію гідроксиду.

Хід роботи:

Дослідну пробу ретельно перемішують та необхідну кількість (г), опираючись на дані табл. 2.3, вміщують у суху конічну колбу 250 см³.

Таблиця 2.3. – Параметри зважування

Очікуване КЧ, мг КОН/г	Розмір наважки, г	Допустима похибка зважування, г
0,1–1,0	20	0,05
1–4	10	0,02
4–15	2,5	0,01
15–30	0,5	0,001
>30	0,1	0,0002

Додають 50 см³ нейтралізованої суміші розчинників (суміш діетилового етеру і етилового спирту в співвідношенні 2:1) та ретельно перемішують (для забарвлених олій кількість розчинників можна збільшувати до 150 см³).

Отриманий розчин при постійному перемішуванні швидко титрують 0,1 н. розчином калію гідроксиду до отримання слабко-рожевого забарвлення, яке стійке протягом 15–30 с. При кислотному числі олії більше 6 мг КОН/г беруть наважку олії не більше 1–2 г та розчиняють її в 40 см³ нейтралізованої суміші розчинників.

У разі кислотного числа менш 2 мг КОН/г титрування проводять з мікробюретки. Метод використовується в діапазоні від 0,1 до 30 мг КОН/г проби.

Проведення розрахунків:

Кислотне число (X), мг КОН/г, розраховують за формулою:

$$X = \frac{5,611 \times K \times V}{m},$$

m – маса проби, г;

V – об'єм 0,1 н. розчину калію гідроксиду, який пішов на титрування проби, см³;

K – поправка до титру 0,1 н. розчину калію гідроксиду ($K=1$);

5,611 – коефіцієнт, що дорівнює значенню розрахункової олії КОН в 1 см³ 0,1 н. розчину КОН.

За кінцевий результат беруть середнє арифметичне двох паралельних визначень. Визначення проводять до другого знаку після коми (табл. 2.4).

Розбіжність між результатами двох паралельних визначень не повинна перевищувати такого значення: $\alpha = 0,06 + 0,01 \cdot X \cdot (X - \text{середнє арифметичне результатів двох паралельних визначень, мг КОН/г})$.

Таблиця 2.4. Параметри кислотності рослинних олій

Вид проби	Кислотність, мг КОН/г проби
Оливкова олія	1,1
Соняшникова олія	0,01–2,4
Соева олія	0,1–1,1

Для характеристики кислотності рослинних олій, крім кислотного числа, дуже часто розраховують відсотковий вміст вільної олеїнової кислоти за формулою:

$$O = \text{к.ч.} \cdot 0,53 \quad \text{к.ч.} - \text{кислотне число, мг}$$

Примітка. Спиртово-етерна суміш може бути замінена на спиртово-хлороформну (1:1). При цьому для аналізу слід використовувати водний 0,1 н. розчин калію гідроксиду.

Лабораторна робота 2.2. Визначення йодного числа (метод Кауфмана)

Йодне число є найважливішим хімічним показником. Цей показник дозволяє судити про міру ненасиченості жирних кислот, що входять до складу жиру. Чим вище вміст ненасичених жирних кислот, тим вище значення йодного числа.

Йодне число жиру – умовна величина, що є кількістю грамів йоду, еквівалентна кількості галогену, що приєднався до 100 г дослідного жиру, виражена у відсотках йоду.

Метод заснований на обробленні дослідної проби для насичення подвійних зв'язків розчинником та розчином галогеновмісних сполук (розчин Кауфмана). Під час подальшого оброблення калію йодидом йод, що виділяється, титрують розчином натрію тіосульфату. Метод визначення кислотного числа в рослинних оліях в діапазоні від 10 до 200 г I₂/100г.

Матеріал для дослідження: жири тваринні, рослинні та олії.

Устаткування, реактиви, лабораторний посуд і матеріали: ваги лабораторні 2-го класу точності з найбільшою межею зважування 200 г; колби конічні на 500 см³; піпетки на 10 см³; склянка низька з носиком на 250 см³; бюретка на 50 см³; піпетки на 10, 20 см³; колби мірні на 100 см³; циліндри мірні на 50, 100 см³; крапельниці 1–50 згідно ГОСТ 25336; воронки лабораторні; натрій сірководневокислий 5-водний, водний розчин концентрації 0,1 моль/дм³; метанол; кальцію оксид; натрій бромистий; бром згідно з ГОСТ 4109, х.ч.; калію йодид, безбарвний розчин 10 %; натрій вуглекислий безводний; йод, згідно ГОСТ 4159, ч.д.а.; хлороформ: крохмаль розчинений, водний розчин з масовою часткою 1 %; папір фільтрувальний.

Хід роботи

Пробу ретельно перемішують, якщо потрібно профільтровують. У конічну колбу з пришліфованою пробкою вносять пробу, масу якої визначають згідно з табл. 2.5 залежно від передбачуваного значення йодного числа. Проби зважують на лабораторних вагах 2-го класу із записом результату до четвертого десяткового знаку.

Таблиця 2.5. Значення йодного числа

Передбачуване значення йодного числа, г I ₂ /100г	Маса дослідної проби, г
Від 5 до 20 включно.	1,0
Понад 20 » 50 »	0,6
» 50 » 100 »	0,3
» 100 » 150 »	0,2
» 150 » 200 »	0,15
» 200	0,10

Наважку в колбі розчиняють у 10 см^3 хлороформу. З бюретки доливають 20 см^3 розчину Кауфмана. Колбу з реакційною сумішшю закривають пробкою, обережно перемішують вміст обертами і ставлять у темне місце за температури близько $(20 \pm 5)^\circ \text{C}$ для настоювання. Час настоювання встановлюють залежно від передбачуваної величини йодного числа:

Для олій та жирів з йодним числом менше ніж 100 – 1 год;

Для олій та жирів з йодним числом більше ніж 100 – 1,5 год.

Після закінчення зазначеного часу до колбу доливають піпеткою від 10 до 15 см^3 розчину калію йодиду і від 50 до 60 см^3 дистильованої води.

Йод, що виділився, титрують розчином натрію тіосульфату ($0,1 \text{ моль/дм}^3$) до одержання соломино-жовтої забарвленості. Після цього додають від 1 до 2 см^3 водного розчину крохмалю з масовою часткою 1 % і продовжують титрувати до повного зникнення синьої забарвленості. Одночасно в тих самих умовах ставлять контрольне випробування (без наважки проби).

Проведення розрахунків:

Йодне число (X) у відсотках йоду, розраховують за формулою:

$$X = \frac{(V1 - V2) \times 0,01269 \times K \times 100}{m}$$

m – маса олії або жиру, г;

$0,01269$ – маса йоду в г, яка еквівалентна 1 мл розчину натрію тіосульфату $C(1/2 \text{ Na}_2\text{S}_2\text{O}_3) = 0,1 \text{ моль/дм}^3$;

K – поправка до масової концентрації розчину натрію тіосульфату $C(\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3) = 0,1 \text{ моль/дм}^3$;

$V1$ – об'єм розчину натрію тіосульфату $C(1/2 \text{ Na}_2\text{S}_2\text{O}_3) = 0,1 \text{ моль/дм}^3$, що витрачено на титрування в контрольному досліді, см^3 ;

$V2$ – об'єм розчину натрію тіосульфату $C(1/2 \text{ Na}_2\text{S}_2\text{O}_3) = 0,1 \text{ моль/дм}^3$, що витрачено на титрування в основному досліді, см^3 .

За кінцевий результат беруть середнє арифметичне двох паралельних визначень. Розбіжність між паралельними визначеннями не повинна перевищувати 1 % від величини йодного числа.

Вид проби	Йодне число, % йоду
Яловичий жир	32–47
Баранячий жир	31–46
Свинячий жир	45–66
Пальмова олія	51–57
Оливкова олія	79–92
Кукурудзяна олія	117–123
Соняшникова олія	119–144
Соева олія	120–140
Олеїнова кислота	89,96
Лінолева кислота	181,2
Ліноленова кислота	273,8

Примітка. Розчин Кауфмана отримують при розчиненні у ви-тяжній шафі наважки натрію броміду (140 г) в 1 см³ метилового спирту із подальшим утриманням 24 год при періодичному помішу-ванні та фільтрацією через паперовий фільтр. Потім, до прозорого розчину додають 5,1 см³ бром у струшують та через 10–15 хв розчин готовий до використання.

Лабораторна робота 2.3. Потенціометричне визначення іонів калію в розчині

1. Приготування стандартних розчинів і побудова градуо-вального графіка

У мірну колбу місткістю 100 см³ поміщають попередньо розра-ховану наважку калію хлориду (точна наважка) із розрахунку, щоб отримати 0,1 моль/дм³ калію хлориду. До наважки додають 50–70 см³ розчинника, розчиняють при перемішуванні та доводять об'єм розчину розчинником до мітки.

У другу мірну колбу місткістю 100 см³ поміщають із першої колби аліквоту об'ємом 10 см³ та доводять об'єм колби розчин-ником до мітки. Отриманий розчин містить 10⁻² моль/дм³ калію хлориду. Аналогічно розведенням аліквоти 10 см³ з другої у третю колбу отримують розчином з концентрацією 10⁻³ моль/дм³ калію хлориду; з третьої в четверту – 10⁻⁴ моль/дм³; з четвертої в п'яту – 10⁻⁵ моль/дм³.

Стандартні розчини по чергово, починаючи з нижчої концен-трації, поміщають в хімічний стакан і проводять вимірювання ЕРС,

застосовуючи в якості індикаторного електроду калій-селективний електрод, а як електрод порівняння – насичений хлорсрібний.

За отриманими даними будують графік в координатах $EPC - \lg C_K$.

2. Приготування і вимірювання досліджуваного розчину

Розраховують масу наважки препарату, виходячи з міркувань, що вміст калію повинен бути в досліджуваному розчині в межах концентрацій $10^{-1} - 10^{-5}$ моль/дм³. Точну наважку досліджуваної проби переносять в мірну колбу і розчиняють у розчиннику, який попередньо застосовувався, доводять об'єм колби до мітки і перемішують. Вимірюють EPC_X досліджуваного розчину.

Проведення розрахунків:

За виміряними значеннями EPC_X і побудованим градувальним графіком розраховують молярну концентрацію іонів калію спочатку у вимірюваному розчині, а потім, враховуючи розведення і масу наважки, розраховують вміст калію в грамах на грам препарату.

Лабораторна робота 2.4. Потенціометричне визначення рН розчинів

У мірну хімічну склянку ємністю 50 см³ поміщають 15–25 см³ досліджуваного розчину, занурюють електроди і вимірюють значення рН або потенціалу системи. При вимірюванні рН розчинів як індикаторний застосовують скляний електрод, а як електрод порівняння – хлорсрібний. Обов'язково контролюється температура розчину.

Порівнюють вимірні значення рН розчину згідно з представленими в табл. 2.6.

Таблиця 2.6. – Значення величини рН досліджуваних розчинів

Назва препарату	Межі значень рН	Вимірні значення рН
Глюкоза, розчин 5, 10, 25, 40 %	3,0–4,0	
Натрію хлорид (ізотонічний)	5,0–7,0	
Магнію сульфат 20, 25 %	6,2–8,0	
Кальцію глюконат 10 %	6,0–7,5	
Кальцію хлорид 10 %	5,5–7,0	

Лабораторна робота 2.5. Визначення вітаміну А і каротиноїдів

Метод заснований на лужному гідролізі та екстракції вітаміну А і каротиноїдів із подрібненої тканини за допомогою слабо летучих розчинників та наступному спектрофотометричному вимірі поглинання світла розчином до і після руйнування вітаміну А ультрафіолетовими променями при довжині хвилі 328 і 460 нм для каротиноїдів.

Матеріал для дослідження: печінка, пташині яйця.

Устаткування, реактиви, лабораторний посуд і матеріали: спектрофотометр; ультрафіолетова лампа ПРК-4; центрифуга; водяна баня; вентилятор настільний; пробірки зі скла пірекс, що пропускають ультрафіолетові промені, 55x8 мм; центрифужні пробірки; піпетки градуйовані на 1 см³, 5, 10 см³; скляні палички; 96 % спирт етиловий, ксилол або про-ксилол, октан, калію гідроксид, 1 н. розчин калію гідроксиду на 96-% етиловому спирті.

Приготування розчинів:

1) До 1 об'єму 11 н. розчину калію гідроксиду (11 н. розчин калію гідроксиду: 617,16 мг калію гідроксиду доводять дистильованою водою в колбі на 1 дм³) додати 10 об'ємів етилового спирту. Розчин готується в день проведення аналізів.

2) Ксилоло-октанова суміш (1:1). Готують у день проведення аналізів.

Хід роботи:

Для дослідження використовують свіжу печінку або ту, що зберігалася в замороженому стані. Пробу печінки ретельно розтирають у порцеляновій ступці, потім зважують 0,5 г отриманої гомогенної маси (у такий же спосіб готують для аналізу пробу жовтка, тільки жовток у кількості 1 г відважують безпосередньо в центрифужну пробірку).

Наважку печінки кількісно переносять у центрифужну пробірку і доливають 2 см³ 1 н. спиртового розчину калію гідроксиду. Перемішують скляною паличкою до утворення однорідної суміші і ставлять для гідролізу на водяну баню при температурі 60 °С на 30 хв. Після цього пробірки охолоджують у холодній воді протягом 5–10 хв і додають у кожну 8 см³ ксилоло-октанової суміші. Пробірки закривають пробками і сильно струшують протягом 2 хв, після чого центрифугують 5 хв при 1500 об/хв. Верхній шар центрифугу-

гату переносять піпеткою в кварцову кювету спектрофотометра і колориметрують: каротиноїди визначають при довжині хвилі 460 нм. Вітамін А шляхом дворазового виміру, до і після опромінення проб ультрафіолетовими променями, при довжині хвилі 328 нм. Для цього досліджувані проби переносять з кювет у пробірки зі скла пірекс і опромінують 45–60 хв лампою ПРК-4 на відстані 15–19 см. Для того щоб пробірки не нагрівалися, під час опромінення їх охолоджують за допомогою настільного вентилятора. Концентрацію вітаміну А визначають за різницею екстинцій при спектрофотометруванні до і після опромінення.

Проведення розрахунків:

$$X = 4,8 \cdot E \cdot 2 \cdot n,$$

- X – вміст каротиноїдів, мкг/г;
- 4,8 – коефіцієнт для каротину;
- E – оптична щільність проби при 460 нм;
- 2 – коефіцієнт перерахунку на 1 г печінки;
- n – розведення (кількість мл ксилоло-октанової суміші).

Визначення змісту вітаміну А виконують за формулою:

$$X = 6,37 \cdot (E_1 - E_2) \cdot 2 \cdot n, \quad \text{де}$$

- X – кількість вітаміну А, мкг/г;
- 6,37 – коефіцієнт для вітаміну А;
- E_1 – оптична щільність розчину вітаміну А до опромінення при 328 нм;
- E_2 – оптична щільність розчину вітаміну А після опромінення при 328 нм;
- 2 – коефіцієнт перерахунку на 1 г печінки;
- n – розведення (кількість мл ксилоло-октанової суміші).

Примітка: При високому вмісті вітаміну А в печінці потрібно проводити додаткове розведення, що враховують у формулі розрахунку.

Лабораторна робота 2.6. Визначення вмісту хімічних елементів методом атомно-емісійної спектроскопії

Суть роботи полягає у визначенні вмісту хімічних елементів (Al, B, Ba, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, Ni, Pb, Sr, Zn, Se, As) методом атомно-емісійної спектроскопії з індуктивно-зв'язаною плазмою.

Матеріал для дослідження: м'ясо.

Устаткування, реактиви, лабораторний посуд і матеріали: атомно-емісійний спектроскоп з індуктивно-зв'язаною плазмою; пробірки пластикові місткістю 10 см³; колби мірні скляні місткістю 100 см³; дозатори автоматичні одноканальні: дозатор з регульованим об'ємом від 1 до 10 см³, дозатор з регульованим об'ємом від 1 до 5 см³, дозатор з регульованим об'ємом від 0,1 до 1 см³; склянки хімічні 50 см³; кислота нітратна 69 %; гідрогену пероксид 30 %; вода деіонізована; багатоелементні стандартні розчини фірми MERK.

Хід роботи:

Наважку масою 2 г поміщають в тефлоновий стакан мікрохвильової печі. Додають 7 см³ концентрованої азотної кислоти та 2 см³ гідрогену пероксиду. Залишають на дві години. Герметично закривають і ставлять у мікрохвильову піч для кислотного розкладання, згідно інструкції. Відкривають тефлонові стакани та переносять пробу у пластикову пробірку місткістю 10 см³. Додають 0,4 см³ розчину скандію (50мг/дм³) і доводять до мітки деіонізованою водою. Проби розводять у 5 разів.

Приготування стандартних розчинів:

1) 1 см³ багатоелементного стандартного розчину (M32/10ch) фірми Merck з концентрацією 1000 мг/дм³ доводять до 10 см³ (кінцева концентрація 100 мг/дм³);

2) у три скляні мірні колби місткістю 100 см³ додають по 4 см³ розчину скандію (50мг/дм³); у колбу № 1 до мітки доводять 5 % розчином нітратної кислоти – це нульовий стандарт; у колбу № 2 вносять 1 см³ багатоелементного розчину (концентрація 100 мг/дм³) і доводять до мітки 5 % розчином нітратної кислоти – це стандартний розчин 1 мг/дм³; у колбу № 3 вносять 5 см³ багатоелементного розчину (концентрація 100 мг/дм³) і доводять до мітки 5 % розчином нітратної кислоти – це стандартний розчин 5 мг/дм³;

Перед початком вимірювання треба проаналізувати багатоелементний стандартний розчин з найбільшим вмістом елементів як невідому пробу. Переконаються, що відхилення визначеного вмісту від істинних значень не перевищують $\pm 5\%$ (чи нижчих заданих меж). Вимірювання починають з промивання системи неробочим розчином з реагентом та промивають її після кожної проби. Щоб перевірити міжелементні та фонові чинники корекції, аналізують контрольну пробу для засобу вимірювання перед початком, наприкінці та періодично під час аналізування проб. Результати аналізу мають бути в межах двох стандартних відхилень середнього значення. У іншому випадку припиняють аналіз, усувають проблему та перекалібровують прилад.

Хід роботи:

1. Відкривають потік газу (*аргон – об'ємна частка аргону, \min % 99,999*) та продувають прилад 30–60 хв згідно з інструкцією на прилад.

2. Запускають на комп'ютері програму TIVA. На приладі встановлюють правильні робочі параметри, як указано в інструкції.

3. Підпалювання плазми і стабілізація її 10–15 хв.

4. Вводять багатоелементний розчин і розташовують МАСКИ елементів (місця).

5. Виводять калібрувальні стандартні розчини 0 мг/дм³; 1, 5 мг/дм³.

6. Вводять калібрувальний стандартний розчин (1 мг/дм³) як пробу для перевірки відтворюваності.

7. Проводять аналіз зразків.

Систему промивають деіонізованою водою після кожного контрольного зразка та промивають її після кожної проби. Через кожні 10 проб аналізують стандарт з відомою концентрацією елементів. Результати представляють в міліграмах на кілограм (мг/кг), або грам на кілограм (г/кг).

Лабораторна робота 2.7. Визначення показника заломлення

Показник заломлення характеризує чистоту, ненасиченість, ступінь окислення жирів. Показник заломлення зростає за наявності оксигруп, збільшенні молекулярної маси і кількості неграничних

жирних кислот, що входять до складу жиру. Зміна температури приводить до зміни щільності речовини.

З підвищенням температури на 1 °С щільність знижується в середньому на 0,00037. Отже, показник заломлення зменшується. Для жирів показник заломлення визначають при температурі 20 °С або шляхом розрахунку приводять до 20 °С.

По величині показника заломлення можна судити про природу жиру, його чистоту і ступені окислення. У окисленому жирі показник заломлення вище в порівнянні з показником заломлення свіжого жиру внаслідок збільшення молекулярної маси (унаслідок утворення оксигруп тощо).

Матеріал для дослідження: жири тваринні і олії рослинні.

Устаткування, реактиви, лабораторний посуд і матеріали: рефрактометр для вимірювання показника заломлення від 1,3000 до 1,7000; термометр; етер етиловий лауринової кислоти для рефрактометрії, з відомим показником заломлення; гексан або петролейний етер.

Хід роботи:

Показник заломлення визначають на зневодненому та профільтрованому жирі. Тверду пробу переносять в склянку, переносять у водяну баню, що налаштована на температуру, за якої буде виконуватися вимірювання, та витримують доти, поки проба повністю не стабілізується.

Перевіряють калібровальну криву рефрактометра за допомогою вимірювання показника скляної пластинки у відповідності до інструкції виробника чи вимірюючи показник заломлення етилового етеру лауринової кислоти.

Пробу дослідного жиру ретельно перемішують та профільтровують. Перед визначенням показника заломлення поверхні призм рефрактометра протирають м'якою тканиною з бавовни, яка оброблена гексаном чи петролейним етером. Рефрактометр готують до використання згідно інструкції, яка додана до приладу. Перевірку рефрактометра та корекцію нуля проводять згідно з інструкцією.

Відповідно до інструкції визначають показник заломлення дослідного зразка при 20 °С, 40, 50, 60 і 80 °С, залежності від того, за якої температури проба рідка. Вимірювання проводять три рази. Поверхню призми одразу після вимірювання витирають тканиною,

а потім ватою, яка оброблена гексаном чи петролейним етером і дають висохнути.

Проведення розрахунків:

Якщо різниця між фактичною температурою (t), за якої проводилося вимірювання, і раніше заданої (t_1) менше $3\text{ }^\circ\text{C}$, показник заломлення розраховується за формулою:

$$n_D^t = n^t + (t - t_1) \times F$$

n^t – показник заломлення при температурі досліджу;

t – температура досліджу, $^\circ\text{C}$;

t_1 – завдана температура (20, 40, 50, 60, 80), $^\circ\text{C}$;

F – коефіцієнт, що має значення:

0,00035 – за $t = 20^\circ\text{C}$,

0,00036 – за $t = 40\text{ }^\circ\text{C}$, 50, 60 $^\circ\text{C}$,

0,00037 – за $t = 80^\circ\text{C}$.

Якщо різниця між фактичною температурою (t), за якої проводилося вимірювання, і раніше заданої (t_1) дорівнює чи перевищує $3\text{ }^\circ\text{C}$, тоді виконують нове визначення.

За кінцевий результат беруть середнє арифметичне трьох паралельних визначень. Визначення проводять до четвертого знаку після коми. Різниця між двома паралельними визначеннями не повинна перевищувати 0,0002.

Лабораторна робота 2.8. Визначення жирнокислотного складу тваринних жирів

Однією з основних ідентифікаційних характеристик жирів є їх жирнокислотний склад. Саме по ньому можна виявити фальсифікацію жирів і маргаринової продукції. Жирнокислотний склад визначається методом газової хроматографії. За допомогою цього методу визначають якісний і кількісний жирнокислотний склад, кількість транс-ізомерів.

Метод базується на перетворенні триацилгліцеролів жирних кислот в метилові етери жирних кислот та газохроматографічному аналізі метилових етерів. Метод використовується в діапазоні 0,1–100 %.

Матеріал для дослідження: жири тваринні і олії рослинні.

Устаткування, реактиви, лабораторний посуд і матеріали: газовий хроматограф з полум'яно-іонізаційним детектором і програмним забезпеченням температури; високополярна капілярна колонка, наприклад *SPTM – 2560, 100m x 0.25mm ID, 0.20µm film (Supelco)*; мікрошприц МШ-10 на 10 мкдм³; аналітичні ваги, з точністю до 0,001 г; генератор водню; колба конічна на 100 см³; зворотний холодильник; воронка лабораторна; піпетки мірні на 10 см³; віали з темного скла на 4 см³; гексан; натрій хлористий, насичений розчин; натрію сульфат, зневоднений; натрію гідроксид, метиловий розчин 0,5 н.; бору трифторид, метиловий розчин; ізооктан; стандартна суміш метилових етерів жирних кислот, наприклад *Supelco TM 37 Comprone FAME Mix, 100mg Neat*; гелій газоподібний стиснений 99,999%.

УВАГА! Метод, який описано, передбачає використання потенційно небезпечних реактивів. Треба дотримуватися звичайних заходів техніки безпеки щодо захисту очей і захисту від хімічних опіків. Бору трифторид отруйний.

Хід роботи:

Дослідну пробу (100–250 мг) ретельно перемішують та вміщують у колбу 50 см³. Додають 4 см³ метанольного розчину натрію гідроксиду. Зворотний холодильник приєднують до колби і кип'ятять зі зворотним холодильником до зникнення крапельок жиру, обережно помішуючи вміст колби з інтервалом від 30 с до 1 хв, щоб запобігти формуванню кільця з натрію гідроксиду на стінках колби. Ця процедура, звичайно, потребує від 10 хв, але іноді до 1 год. Додають 5 см³ метанольного розчину бору трифториду через верхню частину холодильника. Продовжують кип'ятіння протягом від 30 до 60 хв. Додають у киплячу суміш через верхню частину холодильника від 1 до 3 см³ гексану (ізооктану). Знімають колбу з джерела тепла та від'єднують зворотний холодильник.

НЕГАЙНО, не даючи колбі охолонути, додають 20 см³ розчину натрію хлориду. Колбу закривають корковою пробкою і інтенсивно струшують протягом 15 с. Додають ще насиченого розчину натрію хлориду, щоб довести рівень суміші до горловини колби. Дають двом фазам можливість розділитися. Від 1 до 2 см³ верхнього гексанового шару переносять у флакон місткістю 4 см³ і додають невелику кількість зневодненого натрію сульфату для повного видалення слідів води.

Проводять аналіз метилових етерів жирних кислот методом газової хроматографії.

Хід роботи:

Включають газовий хроматограф в електромережу. Встановлюють параметри аналізу в приладі згідно інструкції на колонку і параметрам описаних в методиці. Дають приладу вийти на режим і прогрітися 30 хв.

Проводять холостий дослід з *n*-гептаном або гексаном. В холостому досліді не повинно бути знайдено ніяких піків, крім розчинника. Це випробування повторюють після кожних десяти проб.

Перед проведенням аналізу метилових етерів жирних кислот дослідного зразку, проводять хроматографічний аналіз стандартної суміші метилових етерів жирних кислот (*Supelco TM 37 Comprone FAME Mix, 100mg Neat*). Ця процедура необхідна для того, щоб перевірити чутливість та ефективність розділення хроматографічної колонки, а також для проведення ідентифікування отриманих хроматографічних піків компонентів проби.

Потім проводять аналіз метилових етерів жирних кислот досліджуваного зразка. Для цього використовуючи мікрошприц, відбирають 1 мкдм³ розчину метилових етерів жирних кислот і вводять у колонку газового хроматографа. Проходить хроматографічний аналіз. Після проведення аналізу прилад записує хроматограму поділу компонентів. З графіка визначають піки метилових етерів. Ідентифікацію проводять за допомогою стандартних зразків метилових етерів жирних кислот.

Проведення розрахунків

Використовують метод внутрішньої нормалізації, тобто вважають, що сума площин усіх піків компонентів проби ($\sum Si$), які представлені на хроматограмі, становить 100 %. Площа піків компонентів (*S*) в квадратних міліметрах розраховується за формулою:

$$S = h_i \times a_i$$

h_i – висота піку, мм;

a_i – ширина, яка виміряна на половині висоти, мм.

Масову частку жирної кислоти у відсотках розраховують за формулою:

$$X = \frac{S \cdot 100}{\sum Si}$$

S – площа піку метилового етеру жирної кислоти, мм²,
 $\sum Si$ – сума площин усіх піків на хроматограмі, мм².

Розрахунки проводять до другого десяткового знаку з наступним округленням результату до першого десяткового знаку. За результат аналізу приймають середнє арифметичне результатів двох послідовних визначень.

Лабораторна робота 2.9. Визначення вмісту афлатоксинів

Афлатоксини – токсичні та канцерогенні речовини, що виробляються різними видами грибів роду *Aspergillus*. Серед всіх токсинів, які виробляються біологічним шляхом, афлатоксини – найбільш токсичні. Існує три основні групи афлатоксинів:

Афлатоксини групи В: входять афлатоксини В₁ (найпоширеніший, найбільш токсичний та канцерогенний) та В₂.

Афлатоксини G: в цю групу входять афлатоксини G₁ та G₂;

Афлатоксини М: в цю групу входять афлатоксини М₁ та М₂. Це метаболіти афлатоксину В₁, які виявляються у молоці корів.

Матеріал для дослідження: зерно.

Устаткування, реактиви, лабораторний посуд і матеріали: рідинний хроматограф високого тиску з флуоресцентним детектором; ваги лабораторні; орбітальний шейкер; дистильована або деіонізована вода; маніфолд з вакуумним насосом; натрію хлорид; целіт (для жирових продуктів); хлороформ (для жирових продуктів); фосфатний буфер розчин (PBS) таблетки; фільтрувальний папір (синя стрічка) та все необхідне для фільтрування; піпетки, об'єм дозування 1–10 см³; лабораторні стакани, 250 см³; конічні колби, 250 см³; конічні колби, 500 см³ (для жирових продуктів); мірні колби, 250 см³; пробірки, 5–10 см³; ацетонітрил; метанол; стандартний розчин афлатоксинів В₁, В₂, G₁, G₂.

Хід роботи

Зважити 50 г мілко подрібненої проби та 4 г натрію хлориду, помістити в літрову ємність блендери (стійкого до розчинників). Додати 250 см³ метанол:дистильована вода (60:40) накрити і перемішувати 1 хв при високій швидкості (на шейкері протягом 15 хв). Розвести екстракт у 250 см³ дистильованої води. Обережно і добре перемішати (вручну). Негайно після перемішування, відфільтрувати

приблизно 25–50 см³ екстракту проби через фільтр (синя стрічка). Відібрати 10 см³ фільтрату (еквівалентно 1 г проби) до скляного шприца для пропускання через імуноафінну колонку.

Імуноафінна колонка має набути температури оточуючого середовища перед використанням. Для наступного етапу процедури потрібно зняти заглушку з дна колонки і пропустити отриманий об'єм проби крізь імуноафінну колонку зі швидкістю потоку 2–3 см³/хв. Повільний постійний тиск є визначним фактором для «закріплення» афлатоксинів на антитілах. Об'єм проби має бути 10 см³ при використанні екстракту з метанолом (еквівалентно 1 г оригінальної сировини).

Помістити 50 г мілко подрібненої проби та 25 г целіту в конічну колбу на 500 см³. Додати 250 см³ хлороформу та 25 см³ дистильованої або деіонізованої води, закрити пробкою та перемішувати протягом 30 хв. Профільтрувати через фільтр (синя стрічка) і зібрати 20 см³ фільтрату. Відібрати 10 см³ фільтрату і випарити до сухого осаду на роторному випаровувачі при 60 °С. Осад розчинити в 5 см³ метанолу і довести об'єм до 50 см³ дистильованою водою. Перемістити весь розчин (еквівалентний 2,0 г проби) в ємність скляного шприца для пропускання через колонку.

Імуноафінна колонка має набути температури оточуючого середовища перед використанням. Для наступного етапу процедури потрібно зняти заглушку з дна колонки і пропустити отриманий об'єм проби крізь імуноафінну колонку зі швидкістю потоку десь 2–3 дм³/хв. Повільний постійний тиск є значним фактором для «закріплення» афлатоксинів на антитілах. Об'єм проби має бути 50 см³ при використанні екстракту з хлороформом (еквівалентно 2 г проби).

Додати 20 см³ PBS (рН 7,2) в ємність скляного шприца і пропустити через імуноафінну колонку зі швидкістю потоку 5 см³/хв.

Помістити віалу прямо під колонкою. Набрати 1 см³ метанолу для хроматографії (елюент) в скляний шприц. Елюювати афлатоксини з колонки в скляну віалу пропусканням метанолу крізь колонку зі швидкістю потоку 1 крапля в секунду. Рекомендується повторення проходження потоку крізь колонку (зміна напрямку потоку) тричі, щоб відбулася повна денатурації моноклональних антитіл і послідовному звільненні афлатоксинів у розчин. Наступний етап елюювання – набрати 1 см³ дистильованої води в ємність скляного шприца, пропустити крізь колонку та зібрати у віалу до

загального об'єму 2 см^3 після чого аналізують на високоефективному рідинному хроматографі з флуорисцентним детектором.

Проведення розрахунків

$$p = (C*2)/1000)*1000, \text{ де}$$

C – концентрація афлотоксинів B_1, B_2, G_1, G_2 в пробі, нг/дм^3 ;

2 – коефіцієнт перерахунку згідно методики;

1000 – коефіцієнт перерахунку з нанограмів в мікрограми;

1000 – коефіцієнт перерахунку на мкг/кг .

ДОДАТОК ПРИГОТУВАННЯ РЕАКТИВІВ

1. Приготування 0,5 н. спиртового розчину калію гідроксиду – 35 г калію гідроксиду розчиняють в 20 см³ дистильованої води та додають 1 дм³ етилового спирту, залишають на добу для відстоювання в зачиненій колбі. Потім переносять у темну тару.

2. Приготування 0,5 н. водного розчину гідрохлоридної кислоти – 41,25 см³ HCl (d = 1,19) доводять до 1000 см³ дистильованою водою.

3. Приготування 1 % спиртового розчину фенолфталеїну або тимолфталеїну – 1 г фенолфталеїну або тимолфталеїну розчиняють в 100 см³ етилового спирту, ретельно перемішуючи. Зберігають в темному місці.

4. Приготування безбарвного розчину калію йодиду з масовою часткою 10 %. 10 г калію йодиду розчиняють в 100 см³ дистильованій воді.

5. Підготовка 1% водного розчину крохмалю – 1 г розчиненого крохмалю розтирають в ступці до кашоподібного стану з 3–5 см³ дистильованої водою. Приготовлену суміш додають до 100 см³ киплячої води та кип'ятять протягом 2 хв. Після охолодження розчин повинен бути прозорим. Для збільшення стійкості при зберіганні до отриманого розчину крохмалю додають 0,12–0,13 г саліцилової кислоти.

6. Приготування 0,1 н. спиртового розчину калію гідроксиду – наважку калію гідроксиду масою 5,611 г переносять у мірну колбу на 1000 см³, розчиняють в етиловому спирті та доводять об'єм до мітки спиртом.

Коефіцієнт поправки спиртного розчину калію гідроксиду встановлюють за розчином сульфатної кислоти концентрації c ($1/2$ H₂SO₄) = 0,1 моль/дм³.

Для цього в колбу наливають 20 см³ сульфатної кислоти, додають 2 краплі фенолфталеїну та титрують 0,1 н. розчином калію гідроксиду до легко-помітного рожевого забарвлення. Об'єм розчину сульфатної кислоти, розраховується як середнє арифметичне результатів трьох визначень.

Коефіцієнт поправки розчину калію гідроксиду (K) розраховується за формулою:

$$K = \frac{V1 \times K1}{V}$$

$V1$ – об'єм розчину сульфатної кислоти, яка пішла на титрування, см^3 ;

$K1$ – коефіцієнт поправки розчину сульфатної кислоти, що дорівнює 1;

V – об'єм розчину калію гідроксиду, який пішов на титрування 20 см^3 розчину сульфатної кислоти, см^3 .

7. Приготування розчину калію йодиду масовою часткою 50–55 %. 50–55 г калію йодиду розчиняють у 100 см^3 води. Перед використанням його перевіряють. Для цього додають 2 краплі розчину крохмалю до $0,5 \text{ см}^3$ розчину калію йодиду в 30 см^3 суміші оцтової кислоти і хлороформу у співвідношенні 3:2. Якщо утвориться блакитна забарвленість, для знебарвлення якої потрібно більше ніж 1 крапля $0,01 \text{ моль/дм}^3$ розчину натрію тіосульфату, то розчин калію йодиду не використовують і готують свіжий.

8. Приготування водного розчину натрію тіосульфату молярної концентрації $c(1/2 \text{ Na}_2\text{S}_2\text{O}_3) = 0,01 \text{ моль/дм}^3$.

Для отримання розчину натрію тіосульфату $c(1/2 \text{ Na}_2\text{S}_2\text{O}_3) = 0,01 \text{ моль/дм}^3$ розбавляють водний розчин натрію тіосульфату молярної концентрації $c(1/2 \text{ Na}_2\text{S}_2\text{O}_3) = 0,1 \text{ моль/дм}^3$ у 10 разів. Зберігається у склянці з темного скла на протязі 1 місяця. Готують за 10–14 діб до використання.

9. Приготування водного розчину натрію тіосульфату молярної концентрації $c(1/2 \text{ Na}_2\text{S}_2\text{O}_3) = 0,002 \text{ моль/дм}^3$.

Для отримання розчину натрію тіосульфату $c(1/2 \text{ Na}_2\text{S}_2\text{O}_3) = 0,002 \text{ моль/дм}^3$ розбавляють водний розчин натрію тіосульфату молярної концентрації $c(1/2 \text{ Na}_2\text{S}_2\text{O}_3) = 0,1 \text{ моль/дм}^3$ у 50 разів. Зберігається у склянці з темного скла на протязі 1 місяця. Готують за 10–14 діб до використання.

10. Приготування водного розчину натрію тіосульфату молярної концентрації $c(1/2 \text{ Na}_2\text{S}_2\text{O}_3) = 0,1 \text{ моль/дм}^3$.

Готують двома шляхами:

- З натрію сіркуватистокиислого – реактиву;
- Зі стандарт-титрів (фіксаналів) натрію сіркуватистокиислого.

1) розчин натрію тіосульфату з реактиву готують наступним чином:

25 г натрію сіркуватистокиислого розчиняють в 400 см³ води, додають 10 см³ ізобутилового спирту, ретельно перемішують, доводять об'єм до 1 дм³.

2) розчин натрію тіосульфату зі фіксаналів готують наступним чином:

Теплою водою змивають напис на ампулі і добре її обтирають. У мірну колбу місткістю 1 дм³ ставляють спеціальну воронку, в яку вкладений скляний бойок, гострий кінець якого повинен бути звернений угору. Коли бойок буде правильно укладений у воронці, ампулі з речовиною дають вільно падати так, щоб тонке дно ампули розбилося під час удару об гострий кінець бойка. Після цього пробивають верхнє поглиблення ампули і весь її вміст обережним струшуванням висипають у колбу. Ампулу, не змінюючи її положення, промивають дистильованою водою. Після цього видаляють, а розчин доливають дистильованою водою до мітки, закривають колбу пробкою і обережно ретельно перемішують до повного розчинення речовини. Розчин придатний до застосування через 10–14 діб. Зберігається у склянці з темного скла на протязі 1 місяця.

Після закінчення терміну зберігання необхідно визначити поправку до номінальної концентрації розчину натрію тіосульфату. Якщо величина поправки становить не менше ніж 0,9, розчин може бути використаний.

Якщо під час зберігання з'являються пластівці або осад, розчин не треба застосувати.

Визначення поправки до номінальної концентрації розчину натрію тіосульфату.

0,15–0,20 г калію двохромовокиислого додають до конічної колби на 500 см³ з пришліфованою пробкою, розчиняють в 50 см³ води. До розчину додають 10 см³ розчину калію йодистого (з масовою часткою 30 %), 20 см³ розчину сульфатної кислоти (з масовою часткою 20 %), зачиняють колбу пробкою, що оброблена розчином калію йодиду, ретельно перемішують та витримують в темному місці протягом 10 хв. Потім додають до колби 200 см³ води, а йод, що утворився, титрують з бюретки приготовленим розчином натрію тіосульфату до зміни забарвлення розчину у жов-тий колір, потім додають 2 см³ розчину крохмалю та продовжують титрування при ретельному перемішуванні до зміни забарвлення синього кольору розчину в світло-зелений.

Концентрацію розчину натрію тіосульфату розраховуємо за формулою:

$$c = m / \{M((1/6)K_2Cr_2O_7) \cdot V\},$$

де c – концентрація розчину тіосульфату, моль/дм³;

m – маса наважки $K_2Cr_2O_7$, г;

$M((1/6)K_2Cr_2O_7) = 49,031$ г/моль – молярна маса еквіваленту калію дихромату;

V – об'єм розчину тіосульфату, дм³, витрачений на титрування наважки.

11. Приготування 0,5 % водного розчину крохмалю – 0,25 г крохмалю розчиняють в 10 см³ води до розчинення. До 40 см³ води, яка нагрітою до 60–70 °С, додають при ретельному перемішуванні крохмальну суміш та доводять розчин до кипіння.

12. Приготування розчину натрію бромистого та бром у метиловому спирті (розчин Кауфману) – 140 г натрію бромистого розчиняють в 1 дм³ метанолу. Розчин ретельно перемішують і залишають на 24 год, періодично перемішуючі. Після закінчення зазначеного терміну розчин фільтрують через фільтр, у прозорий розчин додають 5,1 см³ бром у і ретельно перемішують. Через 10–15 хв розчин готовий до використання.

13. Очищення йоду. До 10 г йоду додають 1 г калію йодиду і 2 г прожареного кальцію оксиду. Суміш швидко розтирають у чистій ступці і переносять у чисту. Добре висушену склянку. Зверху склянку закривають чистою круглодонною колбою, зовні зовсім сухою, але наповненою холодною водою для кращого охолодження. Склянку злегка нагрівають, йод у цьому разі сублімується та осідає на дно колби у вигляді кристалів. Після охолодження склянки колбу знімають та зчищають чистою скляною паличкою кристали йоду в склянку.

14. Приготування натрію бромистого. Натрій бромистий висушують у сушильній шафі за температури 130 °С до порошкоподібного стану, періодично перемішуючи його. Після охолодження порошок використовують до готування розчину Кауфману.

3. Приготування безбарвного розчину калію йодиду з масовою часткою 10 %.

10 г калію йодиду розчиняють в 100 см³ дистильованій воді.

4. Приготування окису алюмінію (лужна) – у колбі об'ємом на 200 см³ змішують 75 г окису алюмінію для хроматографії (100–325 меш) з 75 см³ 2 н. спиртового розчину їдкого калію, підігріва-

ють на водяній бані 15 хв при температурі 80 °С і охолоджують. Потім фільтрують відсмоктуванням, сушать при 130 °С і зберігають у герметично закритій колбі.

5. *Приготування реактиву Нієлда* – беруть 22 г сурми трихлористої і заливають 100 см³ хлороформу. З отриманого розчину готують 2-% розчин ацетилхлориду. Через 3 доби реактив готовий до вживання.

РЕКОМЕНДОВАНА ЛІТЕРАТУРА

6. Аналітичні методи досліджень. Спектроскопічні методи аналізу: теоретичні основи і методики: навч. посібник для підготовки студентів вищих навчальних закладів / Д. О. Мельничук, С. Д. Мельничук, В. М. Войціцький [та ін.]: за ред. Д. О. Мельничука. – К.: ЦП «Компринт», 2016. – 289 с.

7. Аналітичні методи досліджень. Хроматографічні та електрофоретичні методи аналізу: теоретичні основи і методики: навч. посібник для підготовки студентів вищих навчальних закладів / В. М. Войціцький, С. В. Хижняк, В. А. Грищенко [та ін.]. – К.: ЦП «Компринт», 2017. – 268 с.

3. AFLAPREP[®] Application of immunoaffinity columns for sample clean-up prior to HPLC analysis for aflatoxins (AFLAPREP[®] Застосування імуноафінних колонок для очистки зразків для визначення вмісту афлатоксинів методом вискоєфективної рідинної хроматографії).

4. Агасян П. К. Кулонометрический метод анализа / П. К. Агасян, Хамракулов Т.К.. – М., 1984. – 176 с.

5. Агасян П. К. Основы электрохимических методов анализа. Потенциометрический метод / П. К. Агасян, Е. Р. Николаева – М., 1986. – 176 с.

6. Айвазов Б. В. Основы газовой хроматографии / Б. В. Айвазов. – М.: «Высшая школа», 1990. – 215 с.

7. Аналитическая химия. Проблемы и подходы. В 2 кн. / Под ред. Р. Кельнера, Ж.-М. Мерме, М. Отто, М. Видмера. – М.: Мир, 2004. – 320 с.

8. Гайдукевич О. М. Аналітична хімія / О. М. Гайдукевич, В. В. Болотов та ін. – Харків «Основа», 2000. – С. 358–368.

9. Голицын В. М. Неденатурирующий электрофорез. Фракционирование фотосинтетических пигмент-белковых комплексов и белков плазмы крови / В. М. Голицын // Биохимия. – 1999. – Т. 64. – С. 64–70.

10. ГОСТ 13586.3-83 Зерно. Правила приемки и методы отбора проб.

11. ГОСТ 8285-91 Жиры животные топленные. Правила приемки и методы испытания.

12. ГОСТ Р 51445-99 Жиры и масла животные. Метод определения показателя преломления.

13. ДСТУ 4350:2004 Олії. Метод визначення кислотного числа.
14. ДСТУ 4463:2005 Маргарини, жири кондитерські та для молочної промисловості.
15. ДСТУ 4569:2006 Жири тваринні і рослинні та олії. Методи визначення йодного числа.
16. ДСТУ 5508-2001 Жири та олії тваринні і рослинні. Аналізування методом газової хроматографії метилових ефірів жирних кислот.
17. ДСТУ 5509-2002 Жири та олії тваринні і рослинні. Приготування метилових ефірів жирних кислот.
18. ДСТУ EN 12955 – 2001 Визначення вмісту афлатоксину-В1 та суми афлатоксинів В1, В2, G1 та G2 в зернових культурах, фруктах з твердою шкіркою та похідних від них продуктах. Метод високоефективної рідинної хроматографії за допомогою постколонової дериватизації та очищення на імуноафінній колонці.
19. ДСТУ ISO 11885:2005 Якість води. Визначання 33 елементів методом атомно-емісійної спектроскопії з індуктивно-зв'язаною плазмою.
20. ДСТУ ISO 13690:2003 Зернові, бобові та продукти їх помелу. Відбирання проб
21. ДСТУ ISO 3961:2004 Жири тваринні і рослинні та олії. Визначення йодного числа.
22. ДСТУ ISO 6320-2001 Жири тваринні і рослинні та олії. Визначення показника заломлення.
23. Дубініна А. А. Токсичні речовини у харчових продуктах та методи їх визначення: Підруч. / А. А. Дубініна, Л. П. Малюк, Г. А. Селютына [та ін.]. – К.: «Видавничий дім «Професіонал», 2007. – 384 с.
24. Золотов Ю. А. Основы аналитической химии. В 2 кн. Учеб. для вузов / Ю. А. Золотов, Я. Н. Дорохова, Фадеева [и др.]: под ред. Ю. А. Золотова – М.: Высшая школа, 2002. – 351 с.
25. IRIS спектрометр с индуктивно-связанной плазмой, руководство по эксплуатации спектрометра.
26. Коренман Я. И. Практикум по аналитической химии. Хроматографические методы анализа: Учебное пособие / Я. И. Коренман. – Воронеж, 2000. – 336 с.

27. Кучеренко Н. Е. Современные методы биохимических исследований / Н. Е. Кучеренко, Ю. Д. Бабенюк, В. М. Войцицкий. – К.: Фитосоциоцентр, 2001. – 424 с.

28. Харитонов Ю.Я. Аналітична хімія. Кн. 2. / Ю. Я. Харитонов. – М.: Вища школа, 2003. – 345 с.

29. Чмиленко Ф. О. Методи атомної спектроскопії: атомно-абсорбційний спектральний аналіз / Ф. О. Чмиленко, Т. М. Деркач. – Дн-ск: РВВ ДНУ, 2002. – 120 с.

ЧАСТИНА Ш

ЛАБОРАТОРНА ДІАГНОСТИКА ПОРУШЕНЬ МЕТАБОЛІЗМУ ПРИ ПАТОЛОГІЇ ВНУТРІШНІХ ОРГАНІВ

3.1. СТРУКТУРА І ФУНКЦІЇ БІОЛОГІЧНИХ МЕМБРАН ТА ПАТОЛОГІЯ КЛІТИН

Мембранні структури клітин живого організму піддаються впливу патологічних чинників зовнішнього і внутрішнього середовища. Взаємодія уражаючого агента з поверхнею плазмолемі клітин запускає каскад взаємопов'язаних біохімічних процесів, які протікають як на мембрані, так і всередині клітин.

Інтенсивність відновлення внутрішньоклітинного гомеостазу при розвитку патології суттєво залежить від тривалості дії патогенного чинника й адаптаційних можливостей організму, що в значній мірі визначається ступенем ураження клітинних мембран. Результати клінічних і експериментальних досліджень доводять ключову роль ліпідного бішару мембран у розвитку тяжких захворювань печінки, їхніх рецидивів та ускладнень. Основними структурно-функціональними компонентами ліпідного бішару клітин, як відомо, є фосфоліпіди. Репаративна, мембрано стабілізуюча та протекторна дії фосфоліпідів досягаються завдяки мітогенстимулювальній активності цих сполук, безпосереднього їхнього вбудовування у фосфоліпідну структуру мембран пошкоджених клітин, заміщення дефектів і відновлення бар'єрної функції їх ліпідного бішару. Отже, функціонування зовнішніх клітинних мембранних систем залежить від цілісності їхніх фосфоліпідних структур. Водночас повноцінність метаболічних процесів у клітинах та їхнє порушення при розвитку патології визначається структурно-функціональним станом мембранних систем.

3.1.1. Структурна організація клітинної мембрани та її модифікація під дією патологічних чинників

Біологічні мембрани – надмолекулярні інтегруючі системи, які формують клітини та їхнє внутрішньоклітинне середовище, а також забезпечують вияв усіх найважливіших функцій клітини: 1) *бар'єрної* – селективний і регулюючий обмін речовин із навколишнім середовищем; 2) *міжклітинних контактів* – морфогенез тка-

нинних систем, спрямована міграція клітин у процесі росту й розвитку, забезпечення інтеграції між зовнішньо- та внутрішньоклітинним середовищем; 3) *матричної* – взаєморозташування та орієнтація мембранних білків, їхня оптимальна взаємодія; 4) *ферментативної* – певні мембранні білки є ферментами; 5) *рецепторної* – сприйняття хімічних і фізичних чинників; 6) *енергетичної* – синтез аденозинтрифосфорної кислоти (АТФ) при участі внутрішньої мембрани мітохондрій; 7) *генерації та проведення біопотенціалів*; 8) *механічної* – міцність та автономність клітин, внутрішньоклітинних структур.

Біологічні мембрани побудовані за єдиним принципом: вони складаються з ліпідного бішару, в якому інтегрально й фіксовано до їх поверхні розташовані білкові молекули (рис. 3.1).

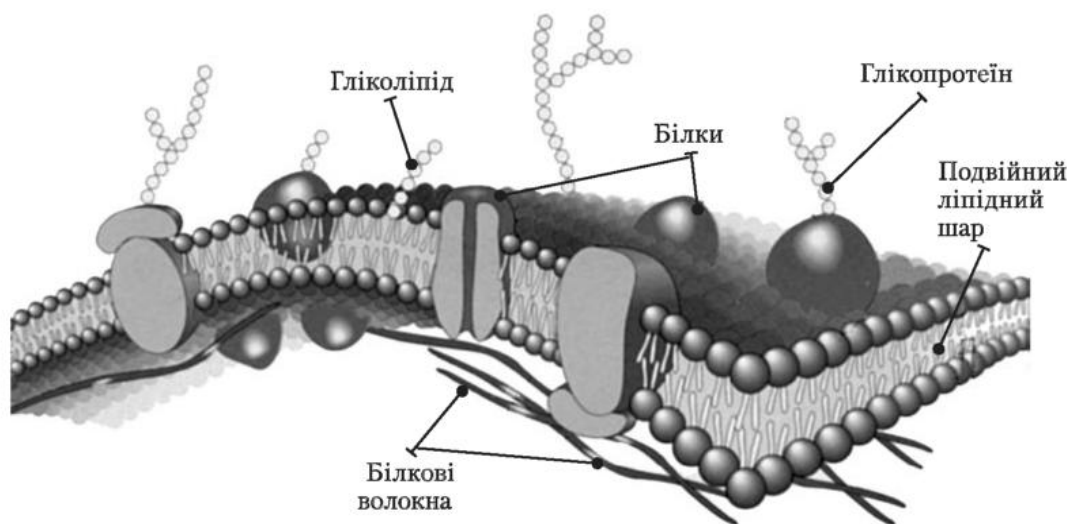


Рис. 3.1. Молекулярна організація біомембран

Особливістю структурної організації молекул ліпідів, які входять до складу плазматичних мембран – фосфоліпідів (ФЛ) і гліколіпідів, є наявність у них гідрофільної “голівки”, утвореної залишками фосфату, естерифікованого полярними або зарядженими групами, та гідрофобних “хвостів”, які є ацилами насичених і ненасичених жирних кислот (ЖК). У структурі біомембран молекули ФЛ звернені одна до одної гідрофобними жирнокислотними “хвостами”, а з оточуючим водним середовищем контактують полярними гідрофільними “голівками” (рис. 3.2).

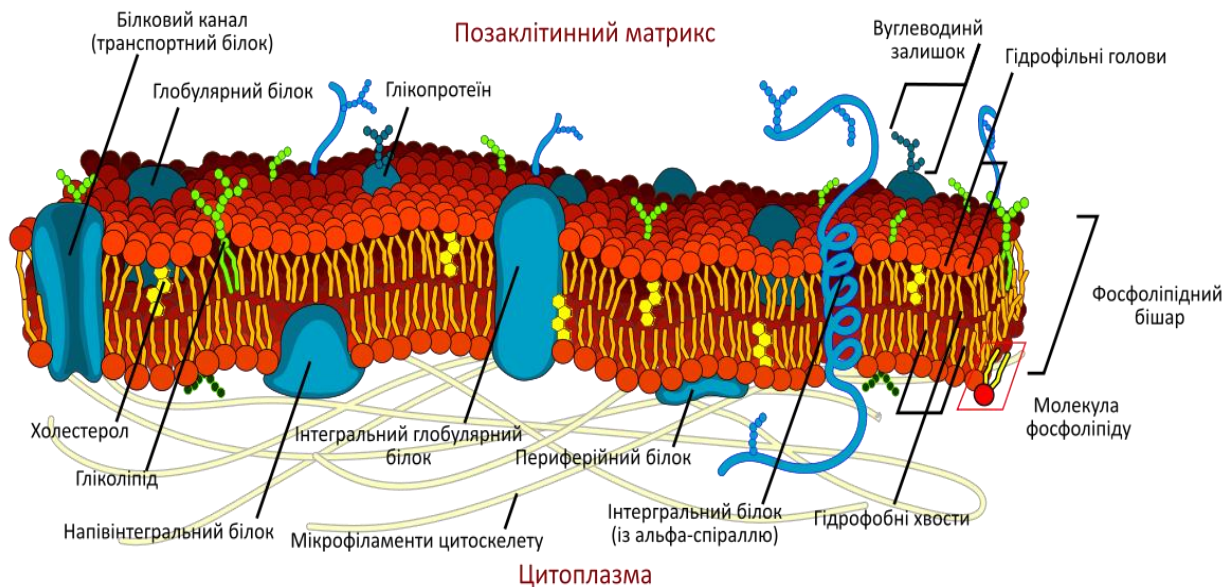


Рис. 3.2. Схема молекулярної організації плазматичної мембрани

Життєво важливими компонентами усіх клітинних і субклітинних мембран є ФЛ, які забезпечують нормальну структуру мембран і численні функції клітини. Так, наприклад, мембрани клітин печінки на 65 % складаються з ФЛ, серед яких 80–90 % припадає на фосфатидилхолін (ФХ), фосфатидилетаноламін (ФЕ), фосфатидилсерин (ФС) та сфінгомієлін (СМ).

До складу біомембран також входить холестерол (ХС), який виконує важливу функцію модифікатора фізико-хімічних властивостей ліпідного бішару, стабілізуючи його шляхом обмеження рухомості внутрішньомембранних компонентів, тобто зменшуючи плинність і збільшуючи в'язкість мембранних ліпідів. При цьому зовнішня плазматична мембрана характеризується значним вмістом вільного ХС і його естерів, а також наявністю гліколіпідів, які відсутні в інших мембранних структурах.

До головних компонентів біологічних мембран належать білки (понад 50 %). Серед них розрізняють поверхневі й внутрішні. Поверхневі білки (приблизно 30 % від усіх білків мембран) розміщені на зовнішній або внутрішній поверхні мембран і зв'язані з її матриксом електростатично – безпосередньо або через двовалентні метали, в основному Mg^{2+} і Ca^{2+} . Внутрішні (інтегральні) білки (приблизно 70 % від усіх білків мембран) на різну глибину занурені в подвійний ліпідний шар, іноді “прошивають” його наскрізь, з'єднуючи обидві поверхні мембрани.

Поверхневі (зовнішні) білки функціонують як рецептори для значної кількості біологічно активних субстратів, таких як нейромедіатори, пептиди, гормони, антигени та антитіла. До інтегральних (трансмембранних) білків належать білки іонних каналів і рецепторні. Частина мембранних білків здатна вільно переміщуватися у фосфоліпідному бішарі, але здебільшого вони фіксовані в певних місцях у площині мембрани. Для мембран різних органел характерний неоднаковий білковий склад. Чим більше функцій виконує мембрана, тим більше “специфічних” білків входить до її складу. Більшість білків мембран набувають біологічної активності завдяки контакту з ФЛ. Життєва необхідність у ФЛ для активації мембранних білків доведена експериментально.

Таким чином, ліпідний бішар визначає основні структурні особливості біологічних мембран, тоді як білки відповідальні за більшість мембранних функцій.

Після видалення зв'язаних ФЛ методом екстракції ацетоном або під дією фосфоліпаз активність мембранних білків можливо знову повністю відновити введенням ФЛ.

Отже, основна структура мембран клітин складається з фосфоліпід-білкових комплексів. Функціонування зовнішніх (клітинних) і внутрішніх (субклітинних) мембранних систем залежить від цілісності їхніх фосфоліпідних структур. Усі метаболічні процеси в клітинах мають відбуватися за участю цих мембранних систем.

Ліпідний бішар практично непроникний для більшості полярних водорозчинних молекул, оскільки внутрішня частина його гідрофобна. Завдяки такому бар'єру запобігається втрата водорозчинного вмісту клітини. Різні речовини мають неоднакову здатність проникати через цей бар'єр. Транспорт речовин крізь мембрани відбувається згідно з правилами пасивної та полегшеної дифузії з проміжним переносником, активного транспорту і шляхом екзотозу чи ендоцитозу.

Ліпідний бішар – незмінний структурний і функціональний елемент будь-якої мембрани. Він виконує такі основні функції, як бар'єрну та структурну (матричну).

Функції фосфоліпідів мембран:

1. *Фосфоліпіди* необхідні для диференціації, проліферації та регенерації біологічних мембран. Цілісність мембранних систем є важливою умовою для нормального здійснення численних клітин-

них функцій. Пошкодження тканини завжди пов'язано з ураженням мембран;

2. *Фосфоліпиди* забезпечують біологічну активність більшості зв'язаних з мембранами білків і рецепторів;

3. *Фосфоліпиди* мають вирішальну роль в активації багатьох ферментов, зв'язаних з мембранами;

4. *Фосфоліпиди* регулюють численні метаболічні процеси між внутрішньоклітинним і міжклітинним простором;

5. *Фосфоліпиди* мембран важливі для синтезу ейкозаноїдів: основні простагландини утворюються з таких попередників, як ейкозатриєнова або ейкозатетраєнова і арахідонова кислоти. Ці попередники наявні у клітині як компоненти ліпідів мембран. Всі вони утворюються з есенційної лінолевої кислоти. Деякі простагландини розглядаються як цитопротектори;

6. *Фосфоліпиди* необхідні для забезпечення нормального жовчного току;

7. *Фосфоліпиди* є структурними та функціональними елементами ліпопротеїнів;

8. *Фосфоліпиди* визначають агрегацію еритроцитів і тромбоцитів;

9. *Фосфоліпиди* впливають на імунні реакції на клітинному рівні.

В основі необоротного ураження клітин лежить порушення функцій плазматичної та внутрішньоклітинних мембран. Реакція клітин на пошкоджуючий вплив несприятливих факторів майже стереотипна: різко збільшується проникність мембран, знижується потенціал спокою на мембрані, у клітину надходять іони Кальцію, а виходять іони Натрію, збільшується об'єм мітохондрій і вони втрачають здатність синтезувати основний носій енергії – аденозинтрифосфорну кислоту (АТФ).

Зміна бар'єрних властивостей мембран, тобто різке підвищення їхньої проникності, разом зі зміною в'язкості та властивостей поверхні ліпідного прошарку (зміна матричних властивостей білків), безперечно порушує роботу мембранних структур, дезорганізує життєдіяльність клітини і сприяє розвитку захворювань організму.

3.1.2. Пошкодження плазматичної мембрани як один із механізмів розвитку патології клітини

Пошкодження плазматичної мембрани клітин, незалежно від причини – механічний чи осмотичний розрив, електричний пробій, випромінювання, дія ксенобіотиків (фармацевтичні засоби, діоксини, пестициди, нітрати, нітрити), вплив вірусів, бактерій, грибів, ультразвуку, поля ЗВЧ – викликає типові патохімічні зміни, котрим відповідають характерні патохімічні та морфологічні картини.

Владимиров Ю. А. (1994) виділяє чотири основні типи пошкодження плазматичних мембран:

- пероксидне окиснення мембранних ліпідів;
- гідроліз мембранних ліпідів фосфоліпазами;
- механічно-осмотичне розтягнення мембран;
- адсорбція на мембрані надлишку поліелектролітів.

Фактично будь-які причини, що викликають формування активних вільних радикалів-окисників (радіація, озон і високі концентрації Оксигену, отрути-окисники, запалення), зумовлюють у мембрані блокування сульфгідрильних груп поверхневих білків, зшивання ліпідних молекул і пероксидне окиснення ЖК. Внаслідок цього можуть зрізуватися чи змінювати своє місце розташування у мембрані кінцеві ділянки трансмембранних глікопротеїнів, у т. ч. клітинних рецепторів. Також утворюються і звільняються токсичні для клітини продукти розпаду, наприклад ТБК-реактивні продукти. Пероксидні процеси можуть поширюватися з плазматичної мембрани на внутрішньоклітинні мембранні структури.

Інтенсивне надходження Кальцію до клітини, що виникає при гіпоксії або під дією важких металів, активує мембранні фосфоліпази, зумовлюючи подальший гідроліз ліпідного бішару.

На початковій, оборотній стадії клітинного пошкодження виявляються структурні зміни у вигляді випинань на поверхні клітини. У клітинах, які мають мікроворсинки, вони можуть частково зникати. Порушуються міжклітинні контакти.

У подальшому можуть сформуватися мієлінові фігури внаслідок порушення контактів між білковими та ліпідними структурними компонентами, що призводить до розшарування мембрани. При необоротному пошкодженні в плазмолемі спостерігаються розриви.

Порушення функцій плазматичної мембрани при її пошкодженні проявляються в результаті змін трансмембранних градієнтів, що обертається посиленням проникності таких мембран. Проте найтипівішою причиною є наростання дефіциту енергії під час розвитку клітинної гіпоксії. Суттєві витрати енергії в клітинах пов'язані з функціонуванням Na^+ -, K^+ -АТФази. За дефіциту енергії функція цього ензиму порушується в першу чергу, що призводить до деполяризації мембрани. Пошкодження клітини супроводжується зростанням вмісту внутрішньоклітинного Натрію, який утримує в клітині надлишок води. Водночас у міжклітинному просторі підвищується концентрація Калію. Фокальне пошкодження тканини і масивний некроз клітин супроводжуються місцевим надлишком Калію у вогнищі запалення і/або системною гіперкаліємією. Поряд з цим, помірний ступінь гіпоксичного пошкодження клітин завжди супроводжується їхнім „мутним набуханням”, а при більш вираженій гіпоксії можливий і більший надлишок внутрішньоклітинної рідини, що проявляється „балонною дистрофією”. Цей процес спричинює порушення мікроциркуляції в тканині, посилюючи гіпоксію.

Інтенсивне надходження Кальцію у внутрішньоклітинне середовище активує мембранні фосфоліпази A_2 , зумовлюючи звільнення з ФЛ пошкодженої мембрани арахідонової кислоти, яка потім каскадно перетворюється у так звані ейкозаноїди – медіатори запалення. При цьому разі через пошкоджену плазматичну мембрану назовні виходить внутрішньоклітинний Калій, внаслідок чого вона стає нестабільною, спостерігається електричний пробій. Водночас сили поверхневого натягу протидіють електричному пробою мембрани і зменшують дефекти ліпідного бішару. Проте в умовах пошкодження клітини, як правило, діють такі фактори, як активні оксигенові радикали та ендогенні детергенти, які здатні розпушувати бішар і полегшувати його пробій.

Отже, при пошкодженні мембрани виникає ланцюг наслідків первинної альтерації плазмолемі, що включає:

1. Порушення функцій натрій-калієвого насосу та іонних каналів;
2. Втрату фізіологічних трансмембранних градієнтів;
3. Надлишкове надходження Натрію і води у клітину;
4. Набухання клітини;
5. Надлишкове надходження Кальцію у клітину;

6. Активацію мембранних фосфоліпаз;
7. Звільнення і перетворення арахідонової кислоти;
8. Порушення локальної мікроциркуляції;
9. Появу навколо клітин ліпідних медіаторів запалення.

Окиснення арахідонової кислоти відбувається у відповідь на будь-яке пошкодження клітинної мембрани або на рецепцію різних регуляторів-гормонів, нейромедіаторів та імуноглобулінів.

Ейкозаноїди не накопичуються в клітинах, завжди синтезуються знову і являють собою медіаторну систему гострої клітинної реакції на пошкодження. Оскільки їхній ефект обмежений вогнищем, де вони утворюються, ейкозаноїди належать до аутокоїдів або паракринних регуляторів.

Основні етапи арахідонового каскаду. При пошкодженні мембран відбувається перехід просеринестерази в активну серинестеразу. Остання, за участю іонів Кальцію і метилтрансферази, мобілізує фосфатидилсерин (ФС), який перетворюється на ФХ. За рахунок дії фосфоліпази A_2 на мембранні гліцерофосфоліпіди відщеплюється арахідонова кислота. Її джерелом може бути також діацилгліцерол, який утворюється з мембранних ФЛ за участю фосфоліпази С. Фосфоліпази інгібуються глюкокортикоїдними гормонами, з чим пов'язаний протизапальний ефект цих регуляторів.

Ключовою подією у залученні вільної арахідонової кислоти на шлях біосинтезу простагландинів і тромбоксанів є дія простагландин-синтазного комплексу, який за рахунок циклооксигенази та пероксидази послідовно перетворює арахідонат на простагландин G_2 та простагландин H_2 – на безпосередній попередник простаноїдів і тромбоксанів.

Отже, знання механізмів пошкодження мембран та їхньої ролі у розвитку патології клітин стало підґрунтям важливої методологічної концепції, яка розглядає захворювання з позицій сучасної біофізики і біохімії клітин.

3.1.3. Універсальні закономірності змін ліпідного складу клітинних структур при патологічних станах

Розподіл ЖК у клітині взаємопов'язаний із вмістом ХС та дією екопатогенних чинників зовнішнього середовища. Американські вчені М. Синенські та Дж. Газел незалежно один від одного запропо-

нували теорію гомовіскозної адаптації, яку вони розробили в результаті вивчення термінальної адаптації пойкилотермних тварин.

Експериментально доведено, що ХС підвищує ступінь упорядкованості фосфоліпідного бішару мембран у рідкокристалічній фазі та знижує – у фазі гелю. За фізіологічних температур (біля 37 °С) у гомойотермних тварин ХС підвищує упорядкованість ліпідного бішару біологічних мембран. Водночас інкорпорація ХС у ліпідний бішар мембран супроводжується зниженням ступеня упорядкованості ацильних залишків ФЛ внаслідок підвищення ступеня їх ненасиченості. Зростання рівня ХС у біологічних системах спричинює зменшення величини співвідношення НЖК/НЕЖК. Встановлено, що окремі ФЛ, такі як ФЕ, незалежно від ацильного складу через малі розміри полярної голівки здатні знижувати ступінь упорядкованості ФХ ліпосом.

Теорія гомовіскозної адаптації не дає повної уяви щодо функціональної ролі змін у ліпідному складі мембран. Проте вона добре пояснює, чому при зміні температури тіла пойкилотермних тварин в'язкість біологічних мембран залишається сталою – цей феномен забезпечується внаслідок модифікації ступеня ненасиченості ЖК, естерифікованих у ФЛ мембран. Так, зі зниженням температури тіла пойкилотермних тварин зростає вміст ФЛ із ненасиченими ацильними залишками і знижується рівень вільного ХС, що запобігає збільшенню в'язкості клітинних мембран; із підвищенням температури тіла вміст ФЛ із ненасиченими ацильними залишками зменшується, а рівень вільного ХС зростає, що запобігає надмірному підвищенню рідинності мембран.

Таким чином особливості термальності адаптації у пойкилотермних тварин дали змогу сформулювати теорію гомовіскозної адаптації, якою вперше було зроблено спробу виявити загальні закономірності зміни ліпідного складу за екстремальних умов довкілля. Ця теорія розкрила біохімічні механізми підтримання належної в'язкості біологічних мембран пойкилотермних та гомойотермних тварин у результаті модифікації ліпідного складу біологічних систем. Так показано, що підвищення рівня ХС у біологічних мембранах ссавців компенсується збільшенням ступеня ненасиченості ФЛ і, навпаки, зниження рівня ХС у біологічних мембранах компенсується зменшенням ступеня ненасиченості ФЛ, внаслідок чого в'язкість клітинних мембран не змінюється. Такий фундаментальний механізм компенсації змін у ліпідному складі дає змогу

підтримувати на належному рівні гомеостатичні реакції в клітині, забезпечуючи її адаптацію до мінливих умов зовнішнього середовища. На жаль, автори, які досліджували гомовіскозну адаптацію пойкило- і гомойотермних тварин, не визначили її місця та ролі в патогенезі гострих і хронічних захворювань у людини та ссавців.

Важлива роль у світовій науці відводиться дослідженням ліпідому клітин організму ссавців, що, передусім, має ще й біофармацевтичний аспект. Значення останнього нині особливо актуально. Це стосується пошуку біологічно активних ліпідів і розробка на їх основі нових лікарських засобів для фармакотерапії, перш за все, найпоширеніших захворювань. Адже дисбаланс у розподілі насичених і ненасичених ЖК, а також у вмісті ω -6 та ω -3 НЕЖК є важливим чинником патогенезу різноманітних хронічних захворювань, зокрема атеросклерозу та ішемічної хвороби серця, цукрового діабету, інсулінрезистентності й ожиріння, злоякісних новоутворень, а також біполярного розладу та шизофренії тощо.

Теорія гомовіскозної адаптації порушила низку важливих питань: чи існують певні загальні закономірності формування ліпідного дисбалансу за патологічних станів у людини й тварин? Яку роль відіграє гомовіскозна адаптація у виникненні й перебігу гострих і хронічних патологічних станів? Якщо гомовіскозна адаптація має захисний характер за патологічних станів, то чи можливо стимулювати її перебіг за допомогою біологічно активних ліпідів?

На сьогодні вже встановлено існування спільних закономірностей порушення складу ЖК мембран, клітин і тканин при хронічних серцево-судинних та онкологічних захворюваннях, а також у віддалений період після дії іонізуючого опромінення. Універсальною ознакою зазначених хронічних патологічних станів є неспецифічне зростання рівнів ПНЖК та ФЛ, зокрема ФЕ, в біологічних структурах, яке компенсується підвищенням рівня показника загального/вільного ХС. Ці зміни забезпечують компенсацію порушень ліпідного складу при хронічних захворюваннях, у результаті чого підвищений вміст сполук, які знижують упорядкованість ліпідного бішару (ПНЖК й неламільярні ФЛ), нівелюється ХС, який підвищує його упорядкованість.

Біологічна сутність компенсації порушень ліпідної складової біомембран може полягати у посиленні захисних резервів клітини. Це забезпечують її виживання й адаптацію до дії патогенного чинника шляхом задоволення її підвищеної потреби у ПНЖК як факторів

регуляції мембранозв'язаних функцій і попередників вторинних месенджерів ліпідної природи, що опосередковують дію гормонів стресу. В результаті відмічається стійкий ліпідний дисбаланс, здатний спричинити порушення специфічних функцій клітини і виникнення хронічних захворювань.

За умови зростання рівня ПНЖК у клітині, підвищується їх доступність для циклооксигеназ. Внаслідок цього в імунокомпетентних клітинах можуть утворюватися великі кількості продуктів, які негативно впливають на імунну функцію, зокрема моногідроксильовані похідні ПНЖК. Це може слугувати ключовим фактором патогенезу різноманітних захворювань. Патогенетичні механізми, які запускаються в період прямого контакту з патогенним чинником (наприклад, іонізуювальним опроміненням) можуть функціонувати і далі під впливом подальшої хронічної дії інших несприятливих чинників і формування стійкого дисбалансу ЖК. Як вважають Л. М. Овсянникова та ін., синдром дезадаптації, що розвивається під впливом несприятливих чинників зовнішнього і внутрішнього середовища, реалізується в патології серцево-судинної, ендокринної, травної та ін. систем організму з прискоренням вікової інволюції і скороченням тривалості життя.

Тимчасом патологічні стани, що супроводжуються зниженням рівня загального ХС у біологічних тканинах, асоціюються зі зменшенням вмісту мононенасичених жирних кислот (МНЖК) і ПНЖК ω -6/ ω -3 рядів, а також загальних і деяких індивідуальних ФЛ (експериментальна морфінна залежність у щурів).

Вищенаведені зміни вперше інтерпретовано з позиції теорії гомовіскозної адаптації: зростання вмісту поліненасичених ліпідів у біологічних структурах людини й тварин за хронічних патологічних станів компенсується підвищенням рівня ХС, а зменшення їх вмісту – підвищенням рівня ХС.

Ремоделювання ЖК і ФЛ є фундаментальними біохімічними механізмами, за якими реалізується гомовіскозна адаптація. Під ремоделюванням ліпідів розуміють перетворення одного молекулярного виду ліпиду на інший. У клітині функціонують не до кінця розкриті механізми, які забезпечують специфічне включення ацильних залишків у мембранні ФЛ. Зміни в ацильному складі ФЛ призводять до модифікації функціональної активності мембран.

Відомо, що ацильні групи у складі гліцерофосфоліпідів розподілені асиметрично. НЖК зазвичай локалізуються в *sn*-1-позиції,

ненасичені – в *sn*-2-положенні гліцерофосфоліпідів. Розподіл молекулярних видів ФЛ зі специфічними ацильними залишками в *sn*-1-та *sn*-2-позиціях на клітинному і субклітинному рівнях різняться залежно від типу тканини. Основними ферментами, що забезпечують ремоделювання ЖК, є десатурази й елонгази, а ФЛ – фосфоліпази та ацилтрансферази. Порушення процесу деацильовання/реацильовання може спричинити підвищення рівня лізофосфоліпідів (ЛФЛ) до цитотоксичних концентрацій. Так, акумуляція ЛФЛ при гострій ішемії міокарда є важливим чинником патогенезу серцевих аритмій. За гострої ішемії-реперфузії відбувається порушення процесів ремоделювання ЖК і ФЛ у тканині ізольованого серця й печінки, виявляється накопичення ВЖК, лізо-ФЛ та естерів ХС, які негативно впливають на функціональну активність органа.

Зміни вмісту ПНЖК у клітині за хронічних патологічних станів асоціюються з відповідними якісними й кількісними перетвореннями ФЛ і ХС. У результаті, розвивається стійкий дис-баланс ЖК.

Гостра ішемія–реперфузія міокарда у людини й тварин супроводжується збільшенням вмісту вільних та естерифікованих у складні ліпіди ПНЖК, а також накопиченням лізо-ФЛ, що, однак, на відміну від хронічних патологічних станів, не компенсується підвищенням рівня загального та вільного ХС. З огляду на існування певного латентного періоду з моменту підвищення вмісту ПНЖК до компенсаторного зростання рівня ХС за відповідних захворювань, зроблено припущення, що за гострих патологічних станів, які супроводжуються ішемією–реперфузією, клітина не встигає належною мірою запустити реакції гомовіскозної адаптації, регуляція яких вочевидь здійснюється на рівні експресії генів, зокрема під впливом ПНЖК.

Доведено, що ЖК можуть впливати на геном, модифікуючи активність ядерних рецепторів і перебіг процесів сигнальної трансдукції. Фактично ЖК здатні прямо чи опосередковано діяти на активність різноманітних генів. На сьогодні встановлено, що вплив ЖК на експресію генів не вичерпується взаємодією з факторами транскрипції. ЖК здатні модифікувати обмін мРНК і білків. Разом ці ефекти ЖК зумовлюють відповідні зміни профілю експресії генів, метаболізму, росту й диференціації клітин.

Крім того встановлено, що ЖК та їх метаболіти можуть діяти подібно до гормонів, контролюючи активність і розподіл специ-

фічних факторів транскрипції, які взаємодіють з відповідними генами й елементами апарату транскрипції. Факт, що синтез ліпідів *de novo* пригнічується ПНЖК, які надходять в організм з їжею, відомий уже понад 50 років. Споживання ПНЖК ω -3 або ω -6 ряду призводить до швидкого (протягом кількох годин) пригнічення активності ензимів, які беруть участь у метаболізмі вуглеводів і ліпогенезі. ПНЖК ω -3 та ω -6 рядів пригнічують синтез ліпідів *de novo* у печінці гризунів і людини внаслідок гальмування утворення мРНК, що кодує біосинтез різноманітних ензимів, які беруть участь у ліпогенезі й метаболізмі глюкози. Опосередковане ПНЖК інгібування ацетил-КоА карбоксилази, стеароїл-КоА десатурази-1 і білка S14 відбувається на рівні транскрипції, в той час як пригнічення активності глюкозо-6-фосфат дегідрогенази здійснюється в результаті перебігу реакцій посттрансляційної модифікації.

Незважаючи на те, що швидкість експресії низки протеїнів, які беруть участь у ліпогенезі *de novo*, стимулюється інсуліном, вуглеводами і трийодтироніном, ПНЖК пригнічують дію цих активаторів, виявляючи виражений негативний вплив на швидкість експресії ензимів ліпогенезу.

Вільні й естерифіковані в ФЛ ЖК є важливими компонентами клітини, що визначають фізико-хімічні властивості біологічних мембран, забезпечують надходження поживних речовин у клітину, слугують джерелом енергії, беруть участь у реакціях сигнальної трансдукції, міжклітинних комунікаціях тощо. Встановлено, що за гострої ішемії –реперфузії істотно зменшується вміст НЖК (14:0, 16:0, 18:0) у складі мітохондріального ФЛ – кардіоліпіну. Зазначені зміни в ацильному складі кардіоліпіну є проявом порушення мітохондріальної функції, зумовленої дефіцитом кисню. Хоча ендоплазматичний ретикулум посідає чільне місце у синтезі ЖК і ФЛ, мітохондрії відіграють важливу роль у регуляції ліпідного гомеостазу в ремоделюванні ліпідів.

За реперфузії ізольованої печінки після попередньої гострої ішемії підвищення рівня ФС може бути наслідком стимуляції реакції обміну основи, в ході якої цей ФЛ утворюється з ФХ. Відомо, що накопичення ФС у внутрішньому листку плазматичної мембрани є важливою молекулярною подією, що супроводжує апоптоз. Підвищення вмісту ФЕ в разі відновлення постачання кисню до гепатоцитів вочевидь є проявом стимуляції реакції декарбоксилювання ФС в мітохондріях з утворенням ФЕ.

Отже, за гострих патологічних станів не розвивається компенсаторне зростання рівня загального/вільного ХС у відповідь на збільшення вмісту ПНЖК, оскільки клітина на рівні геному не встигає модифікувати метаболізм ліпідів. За хронічних патологічних станів у клітині є достатньо часу, щоб компенсувати порушення у складі ЖК, що може виявлятися підвищенням рівня ХС у біологічних системах. Водночас ХС через фактори транскрипції також може впливати на експресію десатураз ЖК.

Як зазначено в літературі, клітина має складні механізми компенсації порушень у ліпідному складі. Фактично зміни вмісту одного класу ліпиду (наприклад, ПНЖК) через певний час призводять до компенсаторних якісних і кількісних змін інших ліпідних класів (наприклад, ХС).

Незбалансовані зміни в розподілі ЖК і ФЛ в ушкоджених тканинах зумовлюють порушення специфічних функцій клітини. Дуалістичне розуміння біологічного значення дисбалансу ЖК і компенсаторної ролі ХС спонукає переглянути сучасну терапевтичну стратегію фармакотерапії гіперхолестеролемії, розробити більш диференційовані підходи до фармакотерапії дисліпідемій, які враховуватимуть не тільки рівень ХС й ліпопротеїнів у сироватці/плазмі крові, а й вміст ЖК, їх моногідроксильованих похідних та ФЛ у формених елементах крові. Це дасть змогу ефективно керувати ризиками фатального ушкодження клітини внаслідок дії патогенного чинника.

Наведені дані теоретично обґрунтовують доцільність пошуку біологічно активних речовин (БАР), які стимулюють перебіг гомовіскозної адаптації клітини й компенсують дисбаланс ЖК за патологічних станів. Адже той факт, що клітина в умовах гострого ушкодження нездатна власними ресурсами в короткі терміни забезпечити перебіг реакції гомовіскозної адаптації на належному рівні, диктує необхідність введення екзогенних біологічно активних ліпідів, здатних прискорити цей процес.

3.2. ЗМІНИ МЕТАБОЛІЗМУ ЗА ПАТОЛОГІЇ ВНУТРІШНІХ ОРГАНІВ ТА ЇХ ЛАБОРАТОРНА ДІАГНОСТИКА

3.2.1. Вплив фізіологічного стану тварин на біохімічні показники крові

Основними об'єктами клініко-біохімічних досліджень є *біологічні рідини організму*: кров, плазма, сироватка, лімфа, рідше – інші рідини внутрішніх середовищ організму (спинномозкова рідина, внутрішньосуглобна рідина та ін.); використовуються також *екскрети*, такі як сеча, жовч, слина, шлунковий та кишковий сік, кал, піт, молоко; шматочки тканин та органів (*біоптати*), взяті прижиттєво під час хірургічних операцій або за допомогою спеціальних пристосувань. Найчастіше матеріалом для клініко-лабораторних досліджень є кров і сеча, інші біологічні рідини.

Для правильного тлумачення результатів біохімічних досліджень слід враховувати такі принципи:

1. При дослідженні біохімічних показників у біологічних рідинах необхідно зважати на те, що кожний показник, який окремо визначається, відображає діяльність багатьох органів і тканин, а також функцію, що притаманна відповідній рідині, – транспортну, метаболічну, гомеостатичну (кров, сеча), екскреторну (сеча, жовч) тощо.

2. Усі процеси життєдіяльності можуть змінюватися під впливом зовнішніх чинників (корму, зміни часу доби, пори року або сонячної активності). Деякі параметри характеризуються значним діапазоном коливань, що необхідно враховувати при трактуванні результатів і порівнянні даних, отриманих у різні періоди відповідного ритму. Ці чинники набувають певного значення останнім часом завдяки розвитку нового напрямку в лікуванні захворювань – *хронотерапії*.

3. Біохімічний склад біорідин та його зміни під впливом чинників довкілля зазнають індивідуальних коливань у різних тварин, відображаючи вплив генетичних особливостей, статі, віку, типу нервової діяльності, характеру годівлі, умов утримання тощо.

Ці фактори необхідно обов'язково враховувати при трактуванні результатів біохімічних досліджень для запобігання помилковим діагностичним рішенням.

4. При вирішенні питання про *відхилення біохімічного параметру від норми*, коли виконується індивідуальне обстеження тварини, правильніше орієнтуватися не на *середні показники*, одержані шляхом обстеження певної кількості умовно здорових особин, а на *референтні (довідкові) показники*, отримані з урахуванням вищезгаданих факторів. При проведенні наукових досліджень, визначені впливу лікувальних заходів, фармако-логічних препаратів та ін., доцільно створювати контрольну групу із умовно здорових тварин і спиратися на показники, одержані при їх обстеженні та оброблені за допомогою методів статистичного аналізу. Але при цьому слід пам'ятати, що значення цих показників не повинні виходити за межі референтної норми.

5. Для отримання результатів біохімічного аналізу, які б достовірно відображали зміни в організмі, необхідно забезпечувати суворе дотримання правил забору проб біоматеріалу, належні умови його зберігання і транспортування до лабораторії. Виконання цих правил повністю залежить від клінічного персоналу і має перебувати під постійним контролем лікаря.

6. Трактуючи результати біохімічних досліджень, необхідно враховувати: умови, в яких перебуває тварина перед взяттям проби біоматеріалу, зокрема ступінь фізичної активності, положення тіла (стоячи, лежачи); інші діагностичні дослідження (введення контрастних матеріалів; проведення навантажуючих проб, деякі види пальпації, накладання джгута і т. п.); лікувальні заходи (лікарське, фізіотерапевтичне, хірургічне лікування).

Діагностичне значення результату біохімічного дослідження залежить від ступеня зв'язку досліджуваного параметра з патологічним процесом. Оскільки більшість біохімічних параметрів відображає вплив не одного, а декількох чинників, більшу частину змінених показників при біохімічних дослідженнях треба розглядати з позицій імовірного, багатофакторного підходу, а діагностичну цінність цих відхилень від норми для кожного виду патології розраховувати на підставі математичного аналізу значної кількості підтверджених випадків захворювання. При цьому слід враховувати величини діагностичної чутливості, специфічності, ефективності лабораторних тестів.

7. Результати біохімічних досліджень є лише часткою відомостей про стан тварини, яка обстежується. Зважаючи на високу варіабельність фізіологічних і патологічних процесів, у *клінічній*

діагностиці здебільшого не можна спиратися тільки на дані біохімічного дослідження. Проте тісний зв'язок біохімічних параметрів з найбільш важливими процесами метаболізму дозволяє в ряді випадків виявляти біохімічними методами ранні та приховані форми патології, що може істотно розширити можливості ранньої діагностики діабету, порушень обміну ліпідів, подагри, гіперпаратиреоїдизму і особливо спадкової патології.

Слід пам'ятати: не можна ставити діагноз лише на підставі даних лабораторних досліджень. Необхідно враховувати дані анамнезу та результати попереднього обстеження хворої тварини, тобто дотримуватися клініко-біохімічних паралелей.

Важливе значення в одержанні правильних результатів має здійснення діагностичною лабораторією контролю якості процесу їх отримання. Він має три етапи:

- 1) доаналітичний;
- 2) аналітичний;
- 3) постаналітичний.

Доаналітичний етап включає правильний забір матеріалу, транспортування, реєстрування, зберігання і т. ін.

Різноманітність біохімічних досліджень вимагає раціональної тактики їх проведення і виконання другого, **аналітичного** етапу контролю якості процесу отримання результатів, до якого входять контроль відтворюваності та контроль правильності. Вони виконуються з використанням спеціальних контрольних сироваток.

Контроль відтворюваності дозволяє оцінити точність виконання, а контроль правильності – уникати систематичних помилок і контролювати правильність одержаних результатів.

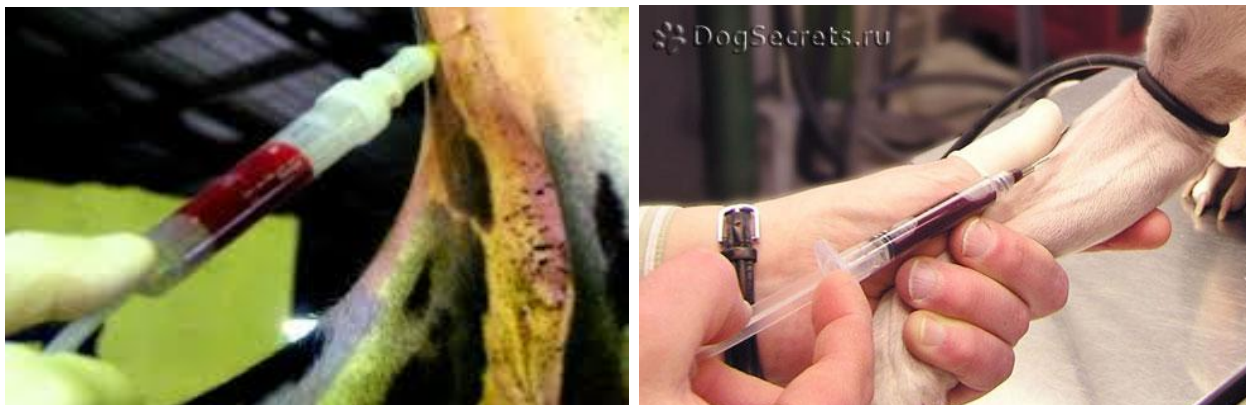
Третій, **постаналітичний** етап контролю якості передбачає дотримання правил реєстрування даних досліджень у спеціальному журналі, оформлення аналізів, наведення в ньому показників референтної норми тощо.

Правила забору проб біорідин

Час. З огляду на циркадний ритм змінюваності вмісту в крові багатьох речовин доцільно брати пробу біорідини в один і той же час – вранці й натще.

Кров рекомендовано відбирати вранці (між 7-ю і 8-ю год), до фізичного навантаження й діагностичних процедур. Для виконання більшості тестів взяття крові проводять після 8–12 год

голодування, а визначення триацилгліцеролів – витримати 10–12-год інтервал після вживання корму.



Голка для взяття крові повинна мати кінчик з коротким скосом, щоб запобігти пораненню протилежної стінки вени.

Венозний стаз. Час утворення стазу у венах має бути мінімальним. Вена має скоріше прощупуватись, ніж бути видимою. При заборі крові шляхом венопункції час здавлювання судин джгутом по можливості має бути мінімальним, оскільки стискування судини спричиняє місцевий стаз і гіпоксію, а також зсув у розподілі деяких речовин (холестеролу, Калію, Натрію, Кальцію та ін.) між форменими елементами крові та її рідкою частиною. Довгий стаз підвищує вміст загального білка та його фракцій, Кальцію, Калію, лактату, пірувату й інших компонентів.

Антикоагулянти. Кількість взятої крові має відповідати кількості антикоагулянту, з яким кров необхідно обережно змішати. Антикоагулянт не повинен містити речовину, яка досліджується, та компонентів реагенту, які будуть використані в наступному дослідженні. При заборі крові для визначення Кальцію слід користуватися не оксалатом і етилендіамінтетраацетатом (ЕДТА), які утворюють нерозчинні або неіонізуючі солі Кальцію, а солями Літію або гепарином (проте останні не можна використовувати, наприклад, при визначенні кількості гетерополісахаридів у сироватці крові). Для запобігання гемолізу, кров необхідно брати сухим шприцем, сухою голкою (одноразового використання), у хімічно чисту і суху пробірку. Якщо набрана шприцем кров переноситься в пробірку, то цю процедуру здійснюють повільно (для запобігання спінювання крові).

Вид біоматеріалу. Більшість біохімічних аналізів можна виконувати з використанням як плазми, так і сироватки, але в деяких

випадках тип біоматеріалу має значення. Наприклад, для електрофорезу білків необхідна сироватка, а для визначення активності реніну – плазма. При заборі крові слід запобігати гемолізу, і якщо хворій тварині проводиться внутрішньовенна терапія, то кров для аналізу слід брати далі від місця вливання, щоб запобігти контамінації лікарським засобом.

Кров для аналізу збирають як у скляні, так і в пластикові ємкості, але іноді переважним або навіть необхідним є тільки один із цих матеріалів.

Цілісна кров з антикоагулянтом використовується для дослідження речовин, що рівномірно розподілені між еритроцитами й плазмою (сечовина, глюкоза та ін.). У разі лізису еритроцитів, зосереджених у згустку, до сироватки крові потрапляють ензими, які в них локалізовані. Цим пояснюється, наприклад, більш висока активність ензимів (лактатдегідрогенази, аланін-, аспартат-амінотрансферази, фруктозодифосфатальдолази, кислоти та лужної фосфатази, аргінази, фосфогексоізомерази та інших ензимів, які містяться в значних кількостях у тромбоцитах та еритроцитах і вивільняються з них при згортанні крові) у сироватці, ніж у плазмі крові. Тому для оцінки активності перелічених ферментів рекомендується користуватися плазмою. Крім того, наслідком гемолізу може бути активація процесів пероксидного окиснення ліпідів (ПОЛ) сироватки, що також впливатиме на біохімічні показники. Плазму отримують після додавання до крові відповідних антикоагулянтів, але необхідно враховувати їхній вплив на окремі показники (табл. 3.1).

Пробірки з кров'ю дозволяється витримувати при кімнатній температурі (20–26 °С) упродовж 1–1,5 год після взяття. Згусток відділяють від стінки пробірки пластиковою паличкою.

Об'єм отриманої сироватки становить приблизно 1/3 взятого об'єму крові (при деяких патологічних станах сироватки може бути значно менше). Сироватку бажано використовувати для лабораторних досліджень у день взяття крові. Для зберігання до наступного дня, пробірку закривають пробкою і ставлять у холодильник, при температурі 4 °С (якщо це дозволяє відповідний метод).

Таблиця 3.1. – Розчини антикоагулянтів і протипоказання до їх застосування у лабораторній практиці

Антикоагулянт	Приготування розчинів та їх використання	Лабораторні тести, визначенню яких заважає антикоагулянт
Натрію оксалат $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$	300 мг натрію оксалату розчиняють у 20 см^3 дистильованої води. Використовують $0,1 \text{ см}^3$ розчину на 2 см^3 крові. Для стабілізації крові при приготуванні плазми без фактора згортання I і для приготування барієвосульфатної плазми використовують $0,1 \text{ М/дм}^3$ розчину ($13,4 \text{ г/дм}^3$) натрію оксалату. Додають із розрахунку $0,1 \text{ см}^3$ на 1 см^3 крові.	Електроліти (К, Na, Ca), лужна фосфатаза, α -амілаза, рН крові
Амонію оксалат $(\text{NH}_4)_2\text{C}_2\text{O}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	Розчин (10 г/дм^3) готують на дистильованій воді, кип'ячать, фільтрують, зберігають при $4 \text{ }^\circ\text{C}$.	Аміак, лужна фосфатаза, α -амілаза, рН крові
Тринатрію цитрат $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Зазвичай використовують водний розчин концентрації 38 г/дм^3 (з урахуванням наважки кристалізаційної води). Зберігають у скляній пляшці з притертою пробкою, краще в холодильнику при $4 \text{ }^\circ\text{C}$. Поновлюють кожні 10–14 діб. 1 об'єм розчину натрію цитрату додають до 9 об'ємів крові.	α -Амілаза крові

Цитратно-глюкозна суміш (для дослідження процесів в еритроцитах та активності кислій фосфатази)	4,7 г цитринової кислоти, 16 г тризаміщеного натрію цитрату, 25 г глюкози розчиняють у 1000 см ³ (бі)дистильованої води. Беруть 1 частину розчину на 4 частини крові. (Співвідношення можуть бути зменшені відповідно в 10 або іншу кількість разів)	Електроліти, глюкоза
Етилендіамінтетраацетат або його динатрієва сіль: ЕДТА-натрій (селектон Б, хелатон, версен, трилон Б)	300 мг натрію етилендіамінтетраацетату (динатрієва сіль, дигідрат) розчиняють у 20 см ³ (бі) дистильованої води. Якщо ЕДТА розчиняється повільно можна додати луги (рН = 8,4...8,6), а потім шляхом внесення кислоти відновити попередню нейтральну реакцію розчину. На 2 см ³ крові беруть 0,1 см ³ розчину, що містить 1,5 мг антикоагулянту. Припускається всипати ЕДТА в пробірку з розрахунку 1 мг порошку на 1 см ³ крові. ЕДТА-натрій на відміну від інших антикоагулянтів не порушує морфологічну структуру еритроцитів. Зв'язуючи іони металів змінної валентності, ЕДТА запобігає ПОЛ	Електроліти (К, Na, Ca), залишковий Нітроген
Гепарин (з активністю 1000 од. в 1 см ³)	0,01 см ³ беруть на 5 см ³ крові або краплю гепарину – на весь об'єм пробірки	-

Натрію гепаринат або калію гепаринат	60 мг гепаринату розчиняють у 20 см ³ (бі)дистильованої води. Беруть 0,1 см ³ розчину на 2 см ³ крові	Електроліти (К, Na)
Літію гепаринат	Так само	Лужна фосфатаза
Амонію гепаринат	— // —	Аміак

П р и м і т к а. Натрію або калію оксалат іноді вносять у пробірку на кінчику скальпеля (приблизно 0,01 г).

Гемолізовані сироватку і плазму не рекомендується використовувати для аналізу, за винятком деяких випадків

Консервація і зберігання. Зниження вмісту глюкози в крові, яке відбувається дуже швидко (не довше 2 год) унаслідок гліколізу, можна запобігти додаванням фториду; сироватку для визначення ферментів слід відділяти від згустка не пізніше як через 1–2 год і зберігати при глибокому охолодженні. Тривале зберігання крові без відділення від еритроцитів може спричинити підвищення вмісту Калію, креатинфосфату (КФ), активності амінотрансфераз, лактат-дегідрогенази (ЛДГ), сорбітолдегідрогенази (СД) та інших ензимів.

Вплив різних лікувальних маніпуляцій з хворими та лікарських препаратів на результати біохімічних досліджень. Накладання джгута, дія ліків та інші чинники обумовлюють зміни біохімічних показників, тому що впливають на функції певних органів і систем. Наприклад, холінергічні засоби змінюють концентрацію білірубину в крові. Відзначається також взаємодія метаболітів з реактивами в процесі лабораторного дослідження. Так, хлоралгідрат збільшує вміст Нітрогену сечовини, реагуючи з реактивом Несслера.

Вплив інших діагностичних процедур. На результати біохімічних досліджень впливає більшість діагностичних процедур, що також необхідно враховувати, трактуючи результати того чи іншого аналізу. Так, введення контрастних засобів для рентгенологічних досліджень змінює результати таких аналізів, як ниркові проби, білірубін крові, бромсульфалеїнова проба, білок крові, електрофореграма білкових фракцій та ін.

Загальні тактичні принципи клінічної біохімії

1. Лабораторні тести, призначені тварині, яка обстежується, мають бути відповідними до основної клінічної мети обстеження:

а) виявлення відхилення від норми, яке раніше не спостерігалось (профілактичне обстеження);

б) постановка діагнозу, тобто розпізнавання захворювання (діагностичне, здебільшого диференційно-діагностичне обстеження);

в) оцінка ефективності лікувальних заходів (контроль за лікуванням);

г) оцінка ступеня одужання та відновлення порушених хворобою функцій (прогностичне обстеження, диспансерне спостереження). Визначається набір, комбінація і частота тестів.

2. Пошук патології, яка раніше не спостерігалася, можна проводити як «всліпу», за широким колом тестів, так і спрямовано, за вузьким набором тестів. Найбільш раціональним є цілеспрямований пошук. Набув поширення недетермінований, так званий «вступний скринінг», тобто проведення кожному пацієнтові стандартного набору біохімічних тестів.

3. Перевага віддається виконанню особливого діагностичного комплексу, так званим *біохімічним констеляціям*. До складу констеляцій слід добирати тести, які відповідають завданням діагностики певного захворювання і його диференціації від інших форм патології відповідно до найвищих значень діагностичної чутливості, специфічності та ефективності лабораторних тестів стосовно даного захворювання.

4. Ще вищою формою раціоналізації лабораторної діагностики є диференційні діагностичні програми, до яких включають декілька констеляцій, застосовуючи їх поетапно. Констеляція першого етапу має орієнтовний характер; залежно від її результатів надалі включається одна з альтернативних констеляцій другого (якщо потрібно, і третього) етапу, яка дозволяє отримувати найтовнішу діагностичну інформацію про форму патології.

5. Лабораторне тестування треба призначати з урахуванням їхньої діагностичної цінності на різних стадіях хвороби (прихований перебіг, гостра фаза, криз) і можливостей спостереження за станом хворого.

6. Тести з навантаженням (функціональні та фармакологічні проби) дають більшу можливість виявляти приховані чи явні зміни

біохімічних параметрів, резервні можливості систем, ніж дослідження в стані спокою. Призначати ці тести необхідно з урахуванням стану хворого й можливих негативних ефектів проби.

7. При біохімічному контролі за результатами певного виду лікування слід передбачати можливі впливи інших лікувальних дій або діагностичних заходів.

8. Найбільш інформативними вважаються констеляції, що дозволяють здійснювати синдромну оцінку стану тієї чи іншої системи або органу, робити «біопсію без біопсії», тобто визначати зміни структури й функцій системи або органу.

Наприклад, діагностуючи хвороби печінки, виділяють синдроми: цитолітичний, паренхімально-запальний, холестатичний, печінкової недостатності та ін. Кожному з цих синдромів відповідає специфічна біохімічна констеляція, тобто добір біохімічних тестів.

Метаболічний профіль показників крові за різного фізіологічного стану тварин

На сучасному рівні ветеринарної медицини уявлення про клінічні, фізіологічні і патологічні показники при захворюваннях недостатні. Необхідні результати біохімічних досліджень, що може допомогти в розробці тестів ранньої діагностики і перевірки ефективності терапії.

Дослідження вмісту біохімічних компонентів у крові, інших біологічних рідинах, тканинах здорових тварин і їх змін при захворюваннях, дозволяє за допомогою лабораторних досліджень проводити своєчасну діагностику (при відсутності клінічного прояву) хвороби та контролювати повноцінність раціону. При зміні біохімічних показників на ранніх стадіях порушень, їх вдасться повернути до норми за допомогою збалансованої годівлі.

Хімічний склад крові тварин

Кров складається з плазми і формених елементів. Як правило, визначають концентрацію конкретного компоненту в плазмі або сироватці, а не в цілісній крові.

Протеїни плазми крові тварин займають найбільший відсоток (60–80 г/дм³). Концентрація інших речовин у багато разів менша. Визначення загального вмісту протеїнових фракцій в плазмі, сироватці крові має діагностичне, терапевтичне і прогнозує значення. Такі білки, як альбуміни, глобуліни і фібриноген у плазмі

знаходяться в максимальних кількостях. За допомогою електрофорузу білки сироватки крові розділяються на фракції: альбуміни, альфа-, бета- і гамма-глобуліни.

Альбуміни створюють колоїдно-осмотичний тиск крові, забезпечуючи рівновагу води і електролітів між плазмою і тканинами, зберігають необхідний об'єм крові для нормальної циркуляції. Альбуміни забезпечують транспортування аніонів, переносять розчинні проміжні продукти обміну від однієї тканини до іншої. *Глобуліни* транспортують ліпіди, естрогени, каротиноїди, стероїди, жиророзчинні вітаміни, естерази, неполярні жирні кислоти, Йод, Цинк, Купрум, Ферум, лікарські речовини. В крові присутні антитіла у вигляді гамма-глобулінів. Кількість гаммаглобулінів у сироватці крові збільшується при імунізації тварин та при інфекціях. У плазмі є протіни, які містять метали (гемокупреїн, трансферин, глобулін зв'язаний з йодом), а також ензими – фосфатаза, холінестераза, амілаза, оксидази, дегідрази, протромбін та інші. *Протромбін* – специфічний ензим плазми, який є показником згортання крові. За допомогою сироваткової *холінестерази* визначають функціональний стан печінки. При захворюваннях паренхіми печінки порушується синтез холінестерази і зменшується її активність. Важливе значення має визначення активності лужної фосфатази. Її активність у сироватці (плазмі) підвищується при захворюваннях кісток, що супроводжуються проліферацією остеобластів, у молодняка тварин – при рахіті. Підвищення активності лужної фосфатази виявляється задовго до прояву клінічних ознак захворювання.

При дослідженні хімічного складу крові широко застосовують визначення залишкового Нітрогену. Він складається з Нітрогену сечовини, сечової кислоти, алантоїну, креатиніну, аміаку, амінокислот і деяких інших речовин. Цей показник характеризує функціональний стан нирок, серця і серцево-судинної системи, а також інтенсивність катаболічних процесів у тканинах.

До складу плазми (сироватки) входять *вуглеводи*: глюкоза, фруктоза, гексозаміни, пентози, глікоген. В крові присутні *продукти проміжного обміну вуглеводів*: лактат, піруват, ацетат, цитрат та інші кислоти. Глюкоза – основна енергетична речовина в організмі, що має важливе значення для характеристики обміну вуглеводів. В плазмі крові протейни утворюють комплекси з такими речовинами, як холестерол, жирні кислоти, фосфатази, аденкортикостероїди, каротини, а також із вітамінами А, Д і Е.

В плазмі знаходяться *мінеральні сполуки*: NaCl, KCl, MgCl₂, NaHCO₃, CaCO₃, K₂HPO₄, NaH₂PO₄, Na₂SO₄, Cu₃(PO₄)₂ та інші. Лужні солі і лужноземельні метали створюють сприятливу для організму величину осмотичного тиску. *Мікроелементи*: (Ферум, Йод, Купрум, Цинк, Кобальт) містяться в плазмі в дуже малих кількостях, але значення мають велике. Вони входять до складу ензимів, складних протеїнів, забезпечуючи їх активність і специфічну роль в обміні речовин. *Пігменти* (білівердин, білірубін, ліпохром, лютеїн) також входять до складу плазми крові. Білівердин і білірубін є продуктами розпаду гемоглобіну, тому збільшення їх концентрації в крові свідчить про патологію печінки і крові. *Концентрація хімічних компонентів в крові змінюється в залежності від фізіологічного стану тварин, їх годівлі, утриманні та віку.*

Фактори, що впливають на показники крові

Продуктивність. У високопродуктивних корів в сироватці крові рівень загального протеїну і залишкового Нітрогену вище, ніж у менш продуктивних. Так, у корів з середньорічним надоем 8000 кг рівень білка в середньому складає 8,27 г %, тоді як у корів з надоем 4000 кг – 7,58 г %; у високопродуктивних корів рівень залишкового Нітрогену в сироватці крові у перший період лактації досягає в середньому 54,04 мг%, у середньопродуктивних 43,48 мг%. Причиною цього є активація обміну протеїнів у високопродуктивних тварин. В крові високопродуктивних курей міститься більше фосфоліпідів і холестеролу, зв'язаного з глобулінами, вище активність лужної фосфатази.

Фізіологічний стан тварини. У корів у процесі лактації змінюється в сироватці крові вміст альбумінів і глобулінів. Максимальний рівень глобулінів спостерігається у перший період лактації. З глобулінових фракцій найбільш виражена залежність між величиною надоїв і динамікою фракції альфа-глобулінів.

Кожний лактаційний період у корів характеризується різними рівнями глюкози і глікогену в крові. Так, глюкоза в крові корів у перший період лактації складає 71,10–75,35 %, а в третій період 66,20–67,37 %. Є зворотна залежність між вмістом глікогену в печінці корів і їх молочною продуктивністю: чим вище молочна продуктивність, тим менше запас глікогену. В період тільності у

лактуючих корів глікогенні запаси печінки збільшуються: чим вище термін тільності, тим більше в ній відкладається глікогену.

В процесі лактації змінюється активність ензимів. Активність каталази крові високопродуктивних корів найбільша у період лактації. В протилежність каталазної активності, пероксидазна активність крові найбільш низька у перший період лактації, а в другий і третій – вона поступово підвищується.

Рівень протеолітичних ензимів і ліполітична активність крові лактуючих корів найбільш високі в перший період лактації. Найбільша активність ліпази і протеази визначена у період сухостою. Активність аспартатамінотрансферази найнижча у сухостійних корів у стійловий період, а найвища – у лактуючих корів у пасовищний період. У великої рогатої худоби в процесі лактації вміст у крові кальцій-білкових комплексів зменшується. Після нового отелу корів у сироватці крові знижується рівень загального протеїну, головним чином за рахунок гамма-глобулінової фракції, в результаті чого можуть знижуватись захисні функції організму.

Годівля і утримання. Довгочасне згодовування великій рогатій худобі концентратів викликає помітні зміни протеїнового спектра сироватки крові. Вміст Кальцію, неорганічного Фосфору і каротину зменшується при неповноцінній годівлі. Встановлено що у телят (до місячного віку), яких утримують на підсосі, рівень загального протеїну, глобулінів і, особливо гамма-глобулінів, у сироватці крові вище, ніж у телят, яким молоко випоюють. При випоюванні новонародженим телятам молока Кальцій, Фосфор і Магній засвоюються краще, ніж у період їх годівлі рослинними кормами.

Умови утримання. Наприклад, вигульне утримання птиці, порівняно з клітковим, стимулює накопичення в організмі Кальцію. У сироватці крові курей кліткового утримання виявлена вища активність лужної фосфатази, внаслідок напруженого стану фосфорно-кальцієвого обміну. Це є ранньою діагностичною ознакою порушення мінерального обміну.

Віковий фактор. З віком у тварин змінюється вміст низки біохімічних компонентів крові і тканин. Особливо значні зміни в обміні речовин і вмісті біохімічних сполук у крові доводиться на період інтенсивного росту – перші шість місяців життя тварин. Новонароджені тварини значно відрізняються за параметрами більшості біохімічних показників від молодняка старшого віку і дорослих тварин. У багатьох новонароджених телят до отримання

перших порцій молозива, в сироватці крові методом електрофорезу не виявляється гамма-глобулінова фракція. У телят першого місяця життя вміст гамма-глобулінів збільшується майже вдвічі порівняно з їх вмістом у перші доби життя.

Породність. Низка біохімічних показників у крові змінюється в залежності від породи тварин. У шведських корів (молочно-м'ясних порід) показник вуглеводів зв'язаних із сироватковими білками вище, ніж у тварин холмогорської і чорно-рябої породи.

Свині, у яких в сироватці крові міститься глобулінів більше, ніж альбумінів, є більш скороспілими.

Сезонність. Весною у крові корів знижений рівень протеїну, цукру, Кальцію, каротину, вітаміну А, та резервна лужність, тоді як активність лужної фосфатази і концентрація сечовини підвищені. Сезонні зміни обміну речовин, особливо зимою і весною, найбільш виражені при незадовільній годівлі. Влітку, при пасовищному утриманні, у сироватці крові тварин збільшується вміст каротину, Кальцію, глютаміну, гексоз, зв'язаних із протеїном та резервна лужність, знижується концентрація сечовини, кетонів і активність лужної фосфатази.

Питання для самоконтролю:

1. Дати визначення клінічної біохімії
2. Основні об'єкти клініко-біохімічних досліджень?
3. Рекомендації щодо забору крові.
4. Які умови для зберігання крові?
5. Назвати основні принципи біохімічних досліджень.
6. Для яких біохімічних досліджень використовують нативну кров?
7. Назвати антикоагулянти, які використовують у лабораторній практиці?

3.2.2. Ензимодіагностика хвороб тварин

Ензими – це специфічні протеїни, що виконують в організмі роль біологічних каталізаторів. Загальна кількість відомих видів ензимів наближається до 10000. До цього числа входять не тільки ензими, які каталізують 2000–3000 реакцій обміну, але також й ензими, залучені в процеси дихання, м'язового скорочення, згортання крові, транспортування речовин, знешкодження токсинних і чужорідних сполук, нейротрансмісії.

Майже всі ензими функціонують усередині тих клітин, в яких відбувається їх біосинтез. Винятком є ензими травного тракту, а також деякі ензими плазми крові, зокрема ті, які беруть участь у процесі згортання крові. У табл. 3.2 підсумовано дані про локалізацію деяких найважливіших ензимів та їх участь в окремих стадіях метаболічних шляхів у різних субклітинних структурах. Наявність визначених ензимів у внутрішньоклітинних ділянках (компартаментах) обумовлює функціонування в них метаболічних шляхів – перетворення одних метаболітів на інші. Знання локалізації ензимів в органелах клітини дуже важливе для діагностики багатьох захворювань, оскільки дозволяє з великою точністю визначити осередок uszkodження і в ряді випадків його розміри.

Відповідно, ферментний склад різних клітин різний. Більшість ензимів зустрічається в багатьох органах і тканинах (лактатдегідрогеназа (ЛДГ), амінотрансферази та ін.) – *неспецифічні*. Однак існують ензими, які активні лише в одній або кількох тканинах і практично відсутні в інших органах і тканинах. Так, ензим аргіназа який бере участь в утворенні сечовини, знаходиться лише в клітинах печінки, а кисла фосфатаза, що бере участь у гідролізі моно етерів ортофосфорної кислоти – у клітинах передміхурової залози. Це так звана *органоспецифічність* ензимів. Якщо говорити про вузькоспеціалізовані клітини, то ензими, які забезпечують їх функціонування, знаходиться в цих клітинах більше порівняно з іншими. Наприклад, у клітинах міокарда підвищена кількість креатинфосфокінази (КФК) і аспартатамінотрансферази (АсАТ), у гепатоцитах – аланінамінотрансферази (АлАТ), в остеобластах – лужної фосфатази (ЛФ) тощо.

Нині методи визначення активності ензимів широко практикують у клініці з діагностичними, прогностичними й лікувальними цілями. Ці дослідження мають особливе значення при

Таблиця 3.2. – Внутрішньоклітинна топографія розміщення ензимів

Цитозоль	Мітохондрії	Лізосоми
<p>Ензими гліколізу</p> <p>Ензими пентозофосфатного шунта</p> <p>Ензими активації амінокислот</p> <p>Мультиензимний комплекс синтезу жирних кислот</p> <p>Ензими катаболізму пуринових і піримідинових основ</p> <p>Пептидази</p> <p>Амінотрансферази</p> <p>Малатдегідрогеназа</p> <p>Ізоцитратдегідрогеназа (НАД-залежна)</p> <p>Глікогенфосфорилаза</p> <p>Глікогенсинтетаза</p>	<p>Піруватдегідрогеназний комплекс</p> <p>Цитратсинтетаза</p> <p>Ізоцитратдегідрогеназа (НАД-залежна)</p> <p>Малатдегідрогеназа та ін. ензими циклу Кребса</p> <p>Ацил-КоА-дегідрогеназа та інші ферменти окиснення жирних кислот</p> <p>Ензими дихального ланцюга та окиснювального фосфорилювання</p>	<p>Кисла фосфатаза</p> <p>β-глюкуронідаза</p> <p>α-глюкозидаза</p> <p>β-глюкозидаза</p> <p>Катепсини</p> <p>Кисла рибонуклеаза</p> <p>α-галактозидаза</p> <p>Лізоцим</p> <p>Гіалуронідаза</p> <p>Арилсульфатаза</p> <p>Колагеназа</p>
Мікросомна фракція	Плазматична мембрана	Ядро
<p>НАДН- і НАДФН- цитохром С-редуктази, цитохром P₄₅₀- і цитохром b₅-оксидази, глюкозо-6-фосфатази, естерази, нуклеозиддифосфатази, глюкуронілтрансферази, фосфогліцерид- і тріацилгліцеридсинтетази, -глюкуронідазиβ</p>	<p>Аденілатциклаза</p> <p>Лужна фосфатаза</p> <p>Na⁺-K⁺-залежна АТФаза</p>	<p>Ензими, які беруть участь у процесі реплікації ДНК</p> <p>РНК-полімераза</p> <p>НАД-синтетаза</p>

Глюкозо-6-фосфатаза		
Рибосомні ензими синтезу білка		
Ензими, які беруть участь у реакціях гідроксилювання		
Ензими синтезу фосфоліпідів, тригліцеридів, а також деякі ензими синтезу холестерину		
Ендоплазматичний ретикулум	Комплекс Гольджі	
Глюкозо-6-фосфатаза	Галактозилтрансфераза	

розпізнаванні інтоксикацій, інфарктів міокарда, діагностиці захворювань печінки, нирок, підшлункової залози, деяких видів злоякісних пухлин тощо.

Зміни ензимних реакцій, що відбуваються в організмі хворої тварини, є часто настільки характерними, що можуть слугувати підтвердженням клінічного діагнозу, а вивчення динаміки цих змін дає можливість стежити за ефективністю методів лікування і робити прогностичні висновки.

При багатьох патологічних станах спостерігаються істотні зміни не лише активності ензимів, але й співвідношення їх форм.

Ізоензими. Під множинними молекулярними формами ензимів розуміють низку форм одного і того ж ензиму, які каталізують одну і ту ж реакцію, але відрізняються за місцем локалізації в організмі, складом, а отже, і за деякими властивостями: швидкістю переміщення в електричному полі, оптимумом рН, імунологічними характеристиками тощо.

Група споріднених ензимів, які мають кілька форм одного і того ж ензиму з четвертинною структурною організацією і відмінних один від одного якісним і кількісним складом субодиниць, отримала назву ізоензимів. У залежності від кількості наявних поліпептидних субодиниць, а також від будови ензиму (димер, тетрамер, полімер) можлива різна кількість комбінацій поліпептидних ланцюгів або різна кількість ізоензимів. Властивості ізоензимів обумовлені властивостями субодиниць, які входять до їх складу.

Зазвичай органи характеризуються різним кількісним складом того чи іншого ізоензиму. Відмінності в будові поліпептидних ланцюгів та особливості поєднання цих ланцюгів у молекулі ізоензиму обумовлюють відмінності в його загальному електричному заряді що, у свою чергу, забезпечує різну електрофоретичну рухливість. Це дозволяє фракціонувати ізоензими за допомогою методу електрофорезу (рис. 3.3).

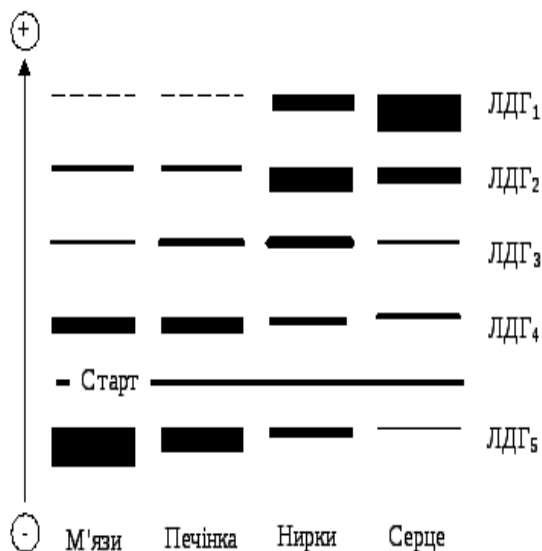


Рис. 3.3. Електрофореграма множинних форм ЛДГ

Нині ізоензими виявлені у понад 100 ензимів. Прикладом ізоензимів може слугувати ЛДГ – ензим, що каталізує утворення й окиснення молочної кислоти. За допомогою електрофореграми виявлено 5 його ізоформ (див. рис. 3.3).

Кожна ізоформа містить 4 субодиниці двох типів – «Н» (від англ. heart - серце) та «М» (від англ. muscle – м'яз) і складається з таких протомерів: ЛДГ₁ = Н₄; ЛДГ₂ = МН₃; ЛДГ₃ = М₂Н₂; ЛДГ₄ = М₃Н₁; ЛДГ₅ = М₄.

Для кожної тканини характерне своє співвідношення ізоформ. Так, ЛДГ₁ та ЛДГ₂ переважають в органах, які характеризуються аеробним метаболізмом – серці, мозку, нирках, підшлунковій залозі та еритроцитах; ЛДГ₃ – у легенях, селезінці, лімфатичних вузлах; ЛДГ₄ та ЛДГ₅ – в органах з активним анаеробним обміном – печінці та скелетних м'язах.

Субодиниці ЛДГ відрізняються за спорідненістю до субстратів. Субодиниця „М” краще каталізує перетворення піровиноградної

кислоти до молочної. Субодиниця „Н” є менш специфічною за своєю дією та каталізує взаємоперетворення α -кето- та α -гідроксимасляної кислоти в реакції:



Це дозволяє відрізнити ізоензими, які складаються, переважно, з субодиниць „Н” (ЛДГ₁, ЛДГ₂) від ізоензиму, побудованого з „М”-субодиниць (ЛДГ₅) на підставі дослідження їх активності в реакції, яка визначається як реакція дегідрогенази α -гідроксимасляної кислоти та відбувається за участю ЛДГ₁.

Вивчення ізоензимного спектра широко використовується в клініці для діагностики органічних і функціональних уражень органів і тканин, встановлення чіткої локалізації патологічного процесу. Так, розподіл ізоензимів ЛДГ у сироватці крові за умов норми має наступний вигляд: ЛДГ₂ > ЛДГ₁ > ЛДГ₃ > ЛДГ₄ > ЛДГ₅. При інфаркті міокарда ЛДГ₁ > ЛДГ₂ > ЛДГ₃ > ЛДГ₄ > ЛДГ₅ - помітна характерна зміна „розташування” ЛДГ₁ та ЛДГ₂: активність ЛДГ₁ переважає над активністю ЛДГ₂. При гемолітичній анемії ЛДГ₂ + ЛДГ₁ > ЛДГ₃ + ЛДГ₄ + ЛДГ₅, загальна активність ЛДГ при цьому в 2–5 разів перевищує норму. При мегалобластних анеміях активність перевищує норму в 10–50 разів. Для захворювань м’язів, печінки, утворення пухлин розподіл ізоформ має наступний вигляд: ЛДГ₄ = ЛДГ₅ > ЛДГ₂ > ЛДГ₁ > ЛДГ₃.

Крім ізоензимів лактатдегідрогенази важливе клінічне значення мають ізоензими креатинфосфокінази (КФК). Цей ензим є димером і побудований з двох основних субодиниць – В та М, із них утворюються три комбінації цих субодиниць і, як наслідок, три ізоензими КФК. У мозку переважає ізоформа ВВ, у скелетних м’язах – ММ, а у серцевому м’язі – ВМ.

Визначення активності ізоензиму МВ найчастіше використовують для підтвердження діагнозу інфаркту міокарда. Підвищену активність цієї ізоформи виявляють вже на 4–6 год після відчуття болю, пов’язаного з інфарктом, тоді як загальна активність КФК може значно зростати при будь-якому пошкодженні скелетних м’язів (метаболічні порушення, запалення, ішемія тощо). Зростання активності ВВ-ізоформи супроводжує пошкодження мозку (крово-

вилив у мозок, церебральний емболізм), деякі ракові захворювання. Проте, воно не має великого діагностичного значення.

Участь ензимів у метаболізмі препаратів. Встановлено, що лікарські речовини, потрапляючи в організм, зазнають різномунітних метаболічних перетворень, що відбуваються в печінці, легенях, плаценті, слизовій оболонці кишечника та в інших органах. Проте основна роль у біотрансформації лікарських препаратів відводиться ензимам ендоплазматичного ретикулулу клітин печінки.

На активність ензимів, що беруть участь у метаболізмі лікарських препаратів і тим самим змінюють їх ефективність і токсичність, впливають багато зовнішніх факторів: світловий режим, температура середовища, радіація, режим годівлі або голодування, недостатність у кормах протеїнів, вітамінів та їх похідних, лікарські речовини.

Так, збільшення тривалості світлового дня знижує активність ензимів мікросомального окиснення в печінці, а вночі їхня активність зростає. Вплив на організм іонізуючого випромінювання знижує знешкоджувальну здатність монооксигеназного ланцюга окиснення лікарських препаратів у печінці. Такий же ефект викликає голодування і нестача в раціоні кормових протеїнів. При гіповітамінозах B_1 і B_2 також знижується гідроксилювання ксенобіотиків. Крім того, встановлено, що на ферментативні процеси метаболізму препаратів впливають інші лікарські засоби. Відомо понад 200 препаратів, що можуть індукувати ензими метаболізму лікарських речовин, насамперед мікросомальних. До них належать бутадіон (протизапальний), амідопирин (болезаспокійливий), новокаїн (локально болезаспокійливий), етиловий спирт та ін.

Індуктором синтезу ензимів мікросомального окиснення в печінці є фенобарбітал. Він різко збільшує синтез цих ензимів, впливаючи на генетичний апарат гепатоцитів, що спричиняє активацію метаболізму природних сполук і ксенобіотиків. Крім того, фенобарбітал індукує синтез УДФ-глюкуронозил-трансферирази – ензиму, який каталізує фазу кон'югації в метаболізмі різних речовин. Фенобарбітал у медичній практиці застосовують при отруєннях для посилення метаболізму ендогенних речовин (наприклад, білірубину при фізіологічній жовтяниці новонароджених і при уроджених гіпербілірубінеміях).

Ензими плазми крові. Ензимний склад крові відносно сталий і має різноманітне походження. У сироватці крові виділяють три групи ензимів: клітинні, секреторні та екскреторні.

Клітинні ензими залежно від локалізації у тканинах поділяють на дві групи: одні каталізують неспецифічні (універсальні) реакції обміну речовин і містяться в більшості органів та тканин; інші – органоспецифічні, їх ще називають індикаторними або маркерними (наприклад, аргіназа в паренхімі печінки, КФК у м'язовій тканині). За умов норми їх концентрація в плазмі незначна, але ця група ензимів має суттєве клініко-діагностичне значення при патологічних процесах. Підвищення концентрації цих ензимів у плазмі пояснюється їх виходом із ушкоджених органів чи тканин на тлі продовження їх синтезу в цих тканинах, а також одночасним зростанням каталітичної активності деяких ензимів крові внаслідок припинення дії відповідних регуляторів (активаторів чи інгібіторів) ензиматичних процесів.

Секреторні ензими, іноді їх називають власне ензимами крові, синтезуються в печінці і звідти вивільняються в плазму, де виконують певні специфічні функції. Типовими представниками цієї групи є ензими, що беруть участь у зсіданні крові, церулоплазмін, який забезпечує транспорт Купруму, сироваткова холінестераза тощо.

Інкреторні ферменти виділяються органами травної системи (шлунком, підшлунковою залозою, слизовою оболонкою кишок, ендотелієм жовчних шляхів). Появу цих ензимів (ЛФ, амілази, трипсину тощо) у сироватці крові пояснюють природним руйнуванням клітинних структур, а також підвищенням проникності мембран секреторних клітин.

Різниця активності певних ензимів у плазмі та клітинах тканин може бути значною і залежить від швидкості, з якою вони виходять з клітин, а також від швидкості їх виведення з кровоплину. Так, активність амінотрансфераз в еритроцитах у кілька десятків разів перевищує активність цих ензимів у плазмі крові. Активність ЛДГ у клітинах скелетних м'язів у 1000 разів, а активність КФК – майже в 1000000 разів перевищує активність у плазмі крові. Виведення клітинних ензимів з кровоплину здійснюється шляхом їх поглинання та метаболізму, головним чином, у паренхіматозних органах. Ензими як і білки, причому переважно високомолекулярні, підлягають клубочковій фільтрації в нирках і не виділяються з сечею,

проте існують і певні винятки. Наприклад, амілаза, маючи малу молекулярну масу (менше 50000 Да) надходить у сечу в нативному стані. Порушення функціонування нирок і погіршення їх видільної функції може призвести до підвищення активності цього ензиму в плазмі крові.

Клініко-діагностичне значення дослідження ензимів

Майже всі ензими організму, за невеликим винятком, функціонують внутрішньоклітинно. Незначна їх кількість присутня в крові внаслідок нормального клітинного відновлення. При ушкодженні клітин, пов'язаному з різними захворюваннями, вивільняється велика кількість ензимів, їх концентрація в крові спочатку зростає, а потім поступово зменшується в результаті кліренсу (очищення).

Однак підвищення концентрації не завжди є результатом ушкодження тканин, можливі інші причини: посилене відновлення клітин; клітинна проліферація (наприклад, неоплазія); посилений синтез ензимів (індукція ензимів); знижений кліренс.

Про механізми видалення ензимів із кровообігу відомо небагато. Дрібні молекули (напр., амілаза) фільтруються в ниркових клубочках, але більшість ензимів, імовірно, виділяється клітинами ретикулоендотеліальної системи.

Визначення в сироватці крові активності ензимів з різною внутрішньоклітинною і органельною локалізацією (цитоплазматичних, мітохондріальних, лізосомальних, мембранних та ін.) дозволяє встановити ступінь ушкодження конкретного органа.

У сучасних клінічних лабораторіях проводять дослідження активності в крові переважно таких ензимів, як аспартатамінотрансфераза (АсАТ; ЕС 2.6.1.1), аланінамінотрансфераза (АлАТ; ЕС 2.6.1.2), глутаматдегідрогеназа (ГДГ; ЕС 1.4.1.2), лактатдегідрогеназа (ЛДГ; ЕС 1.1.1.27), креатинфосфокіназа (КФК; ЕС 2.7.3.2), лужна фосфатаза (ЛФ; ЕС 3.1.3.1), кисла фосфатаза (КФ; ЕС 3.1.3.2), альдолаза (АЛД; ЕС 4.1.2.13), холінестераза (ХЕ; ЕС 3.1.1.8), α -амілаза (АМ, ЕС 3.2.1.1), ліпаза (ЛП; ЕС 3.1.1.3), аланінамінопептидаза (ААП; ЕС 3.4.11.2), глюкозо-6-фосфатдегідрогеназа (Г-6-ФДГ, ЕС 1.1.1.49), γ -глутамілтранспептидаза (γ -ГТП; ЕС 2.3.2.2), аргіназа (Ар; ЕС 3.5.3.1), сорбітолдегідрогеназа (СД; ЕС 1.1.1.14), алкогольдегідрогеназа (АДГ; ЕС 1.1.1.1) та ін.

Для ензимодіагностики захворювань нирок досліджують активність таких ензимів: трансамідинази (ТА; ЕС 2.1.4.1), лізоциму (ЛЩ; ЕС 3.2.1.17), аланінамінопептидази (ААП; ЕС 3.4.11.2), лактатдегідрогенази (ЛДГ; ЕС 1.1.1.27), сукцинатдегідрогенази (СДГ; ЕС 1.3.5.1), ізоцитратдегідрогенази (ІДГ; ЕС 1.1.1.42), лужної і кислій фосфатаз (ЛФ і КФ; відповідно ЕС 3.1.3.1 і 3.1.3.2), карбоангідрази (КА, ЕС 4.2.1.1), альдолази (АЛД; ЕС 4.1.2.13), глутамінази (ГЛА; ЕС 3.5.1.2), аргінази (Ар; ЕС 3.5.3.1), піруваткінази (ПК; ЕС 2.7.1.4), γ -глутамілтранспептидази (γ -ГТП; ЕС 2.3.2.2).

α -Амілаза. Для діагностики гострого панкреатиту, кісти підшлункової залози, закупорки її протоку пухлиною, каменем або спайками спостерігається підвищення активності α -амілази, яку визначають у сироватці крові й частіше у свіжій сечі. Крім того, у деяких випадках підвищення рівня α -амілази може бути наслідком ниркової недостатності, діабетичного ацидозу, запалення підшлункової залози на фоні перфорації пептичної виразки.

Зниження активності ензиму спостерігається з віком, гострому та хронічному гепатиті, недостатності підшлункової залози. При некрозі підшлункової залози спостерігається різке падіння активності ензиму.

Активність α -амілази в плазмі крові тварини піддається коливанням у залежності від вживання корму та часу доби. Через 2–3 год після вживання корму виявляється виражений підйом активності ензиму в крові та сечі. Найбільш низькі показники α -амілази спостерігаються вночі та натще.

Окреме місце серед ензимів, які використовуються для діагностики різних захворювань, відводиться аланінамінопептидазі (ААП).

Аланінамінопептидаза каталізує розриви пептидних зв'язків з $-\text{NH}_2$ вільного кінця, яким є аланін.

ААП присутня у всіх внутрішніх органах, однак у високих концентраціях вона міститься в корковій речовині нирок. ААП в організмі людини представлена п'ятьма ізоензимами: у печінці – ААП₁, підшлунковій залозі – ААП₂, нирках – ААП₃; ізоформи ААП₄ і ААП₅ є у різних відділах кишечника. Вони відрізняються електрофоретичною рухомістю.

Амінотрансферази. Широко практикується дослідження активності амінотрансфераз – ензимів, які каталізують міжмолекулярне перенесення аміногрупи з амінокислоти на α -кетокислоту і навпаки.

Переамінування відбувається з участю коферменту – фосфопіридоксалу (похідна вітаміну В₆). Важливе клініко-діагностичне значення має активність двох амінотрансфераз: аспартатамінотрансферази (АсАТ) і аланінамінотрансферази (АлАТ). Розходження в найменуванні амінотрансфераз обумовлені назвою тієї амінокислоти, від якої відокремлюється аміногрупа.

Цей ензим поширений в органах і тканинах тварини. Найбільший вміст АсАТ виявлено в серцевому м'язі, потім послідовно в зменшуваній кількості у печінці, скелетній мускулатурі, головному мозку, нирках і сім'яних залозах. Активність АсАТ у серцевому м'язі майже в 10000 разів вища, ніж у сироватці крові. В еритроцитах АсАТ у 10 разів більше, ніж у сироватці. Тому при визначенні активності амінотрансфераз остання не повинна мати навіть слідів гемолізу.

Ензим, що каталізує зворотне перенесення аміногрупи з аланіну на α -кетоглутарову кислоту, одержав назву аланінамінотрансфераза (АлАТ).

Найвища активність АлАТ виявляється в печінці, підшлунковій залозі, серці та скелетній мускулатурі. У печінці активність АлАТ у кілька тисяч разів вища, ніж у сироватці крові.

Активність амінотрансфераз у сироватці крові можна визначати за допомогою хроматографічних, спектрофотометричних і колориметричних методів.

Підвищення активності амінотрансфераз у сироватці крові відзначено при цілому ряді захворювань, особливо при ураженні органів і тканин, багатих на ензими, – печінки та міокарда.

Нерідко підвищення активності АсАТ передуює появі типових ознак інфаркту на електрокардіограмі. Вважають, що існує тісна кореляція між розмірами осередків некрозу й показниками активності АсАТ у сироватці крові.

Деякі дослідники наголошують на прогностичній цінності визначення активності АсАТ: якщо після 3–4-ої доби захворювання активність АсАТ у сироватці крові не знижується, то прогноз несприятливий.

При стенокардії активність АсАТ, як правило, залишається в межах норми. Тому диференційно-діагностичне значення мають і негативні результати проби, що дозволяють у сумнівних випадках з більшою впевненістю виключити інфаркт міокарда.

При захворюваннях печінки в першу чергу і значно порівняно з АсАТ змінюється активність АлАТ.

Підвищення активності АлАТ. Особливо різко зростає активність АлАТ у сироватці крові при інфекційному гепатиті. Вона фіксується вже в інкубаційному періоді захворювання, що має велике діагностичне значення. Підвищення активності АлАТ при гострому інфаркті міокарда не настільки різке порівняно зі зміною активності АсАТ. Тому одночасне визначення активності обох сироваткових амінотрансфераз є дуже цінним діагностичним тестом. У нормі співвідношення активностей АсАТ/АлАТ (коефіцієнт де Рітіса) дорівнює $1,33 \pm 0,42$. У хворих на інфекційний гепатит відбувається зниження величини коефіцієнта, а при гострому інфаркті міокарда вона, навпаки, різко зростає.

Активність АлАТ і АсАТ зростає у хворих, що отримували препарати із вмістом піридоксальфосфату.

Фосфатази. Одним із тестів, найбільш узвичаєних у біохімічних дослідженнях крові, є визначення активності лужної та кислої фосфатаз. Фосфатазами називають ензими, що каталізують відщеплення фосфорної кислоти від її органічних сполук. Фосфатази розділяють на фосфодіестерази I (лужна фосфатаза (ЛФ), оптимум рН = 8,6–10,1) і фосфомоноестерази II (кисла фосфатаза (КФ), оптимум рН = 4,6–6,2),

Лужна фосфатаза (ЛФ) міститься практично у всіх тканинах організму, крім немінералізованого шару суглобового хряща, насамперед у кістковій тканині, паренхімі та стінках жовчних проток печінки, проксимальних відділах звитих канальців нирок, передміхуровій залозі, лактуючій молочній залозі, клітинах слизової оболонки кишечника, плаценті. Особливо багато її в кістках, які ростуть (ензим міститься в мембранах остеобластів), жовчі та плаценті. Локалізуючись у клітинній мембрані, ензим підключається до процесу транспортування біологічно важливих сполук.

Активність ЛФ виявлено в більшості біологічних рідин, включаючи сечу, екскременти, жовч, слину, молоко й лімфу. У

плазмі крові новонароджених вона в 1,5–3,0 рази вища, ніж у крові дорослих, за рахунок кісткового ізоензиму.

ЛФ – гетерогенний ензим, що включає окремі ізоензими, кожен із яких зосереджений у певному органі.

В організмі тварини три гени кодують біосинтез ізоензимів: один – печінковий, кістковий і нирковий ізоензими, другий – кишковий ізоензим і третій – плацентарну ЛФ.

Вважають, що існує ще й четвертий ген, який кодує синтез зародкової ЛФ і локалізується в тонкій кишці плоду. Ще один ізоензим ЛФ визначено в жировій тканині.

У дорослих тварин у плазмі (сироватці) крові виявляється лише ЛФ печінкового походження. У новонароджених тварин у сироватці крові міститься значна кількість кісткової ЛФ; у невеликій кількості вона може зустрічатися до 6 місячного віку. Після закінчення формування скелету присутність цього ізоензиму в сироватці крові в значній кількості свідчить про наявність в організмі доброякісних чи злоякісних пухлин, а в невеликій – про наявність деструктивних змін у тканинах кістково-суглобової системи.

Відразу після годівлі тварин у сироватці крові виявляється кишкова ЛФ, кількість якої значно зростає при вживанні значної кількості жирів. У другій половині вагітності в сироватці крові з'являється ЛФ плацентарного походження. Останнім часом особливо увагу онкологів привертають ізоензими ЛФ, що використовуються як маркери онкологічних захворювань: плацентарний, плацентарноподібний. Їх можна знайти як у злоякісних пухлинах, так і в сироватці крові.

Отже, в діагностиці розрізняють печінкову, кісткову, кишкову, плацентарну, плацентарноподібну, холестатичну, ниркову ЛФ, ізоензим «Реган» (виявляється в 1/6 онкологічних хворих та 1/3 хворих з підвищенням активності ЛФ). Особливості ізоензимного складу ЛФ полягають у тому, що окремі її ізоформи знаходяться в окремому, цілком визначеному органі (тоді як усі ізоензими лактатдегідрогенази можуть бути зосереджені в будь-якому органі, хоча й у різних співвідношеннях).

Підвищення активності ЛФ у сироватці крові не завжди дозволяє з достатнім ступенем вірогідності скласти уявлення про органотипову патологію. Активність ЛФ сироватки крові часто зростає при обструктивних захворюваннях печінки, холестази,

гепатиті, явищах гепатотоксичності, остеомаліяції, новоутвореннях печінки та кісток.

Кисла фосфатаза (КФ) представлена трьома різновидами ізоензимів — II, III і IV. КФ II виявляє оптимальну дію при рН = 4,6. Найбагатшим джерелом цього лізосомального ензиму є передміхурова залоза, фосфатазна активність якої приблизно в 1000 разів перевищує активність цього ензиму в кістковій тканині, печінці, селезінці, нирках і еритроцитах.

КФ III (оптимум активності при рН = 3,4–4,4) знаходиться в печінці та інших паренхіматозних органах, КФ IV (оптимум активності при рН = 5,2–6,2) – в еритроцитах і тромбоцитах.

Оскільки еритроцити містять помітні кількості КФ, гемолізовані зразки крові зовсім не придатні для діагностичного визначення

γ -Глутамілтранспептидаза (γ -ГТП). Значне підвищення активності спостерігається при захворюваннях печінки та внутрішньопечінкових жовчовивідних шляхів з явищами обтурації (обтураційна жовтяниця різного генезу, гепатити, пухлини печінки й метастази в печінку).

Помірне підвищення – при алкогольній інтоксикації та хронічній інтоксикації, гострому панкреатиті, ураженнях паренхіми нирок, отруєннях гепатотропними отрутами.

Креатинфосфокіназа. Фізіологічне підвищення активності креатинкінази (КФК) виявлено в сироватці крові: у новонароджених (невелике), у перші дні після родів, при фізичному навантаженні.

Значне підвищення – при інфаркті міокарда, дистрофії м'язів, травматичних ушкодженнях м'язів (роздробленнях), шоку й недостатності кровообігу.

Помірне підвищення – при інфаркті міокарда (дрібноосередковий), обмеженому ушкодженні скелетних м'язів, судомах, гіпотиреозі, розладах мозкового кровообігу, травмах мозку, гострому стресовому стані.

Диференційно-діагностичне значення визначення активності КФК можна підсилити розділенням ізоензимів. Так, виявлення MB-ізоензиму свідчить про ураження міокарда, BB – головного мозку, а також гладеньких м'язів травного каналу і сечовидільного тракту. Ізофермент BB може помірно зростати при злоякісних новоутвореннях бронхів й молочної залози. Враховуючи

більш широкий діапазон змін КФК–ВВ, можна сказати, що специфічність цього ензиму не така значна, як КФК–МВ.

Певне значення має визначення ізоензимного спектра при розмежуванні інсульту та інфаркту міокарда, інфаркту легені.

Лактатдегідрогеназа. Значне підвищення активності в сироватці крові встановлено при інфаркті міокарда, гострому вірусному гепатиті, анемії, лейкозах, гемолітичному стані, нефропатії, гострих масивних ураженнях скелетних м'язів.

Помірне підвищення – при хронічних ураженнях печінки, цирозах у стадії загострення, панкреатиті, пневмонії, інфаркті міокарда, інфаркті нирки, легень, мозку, злоякісних новоутвореннях, прогресуючій м'язовій дистрофії.

Будь-яка тканинна деструкція супроводжується збільшенням активності ЛДГ в сироватці, при цьому ступінь гіперензимемії залежить від глибини й поширеності процесу. Органна специфічність цього ензимного тесту значно зростає при визначенні ізоформ. Збільшення вмісту ЛДГ₁ має велике значення при діагностиці інфаркту міокарда, ЛДГ₂ та ЛДГ₃ – гострого лейкозу. ЛДГ₄ і ЛДГ₅ – паренхіматозного ураження печінки, ЛДГ₃ – ізоензим, активність якого зростає при багатьох злоякісних захворюваннях. Чітка й закономірна зміна ЛДГ₁ при інфаркті міокарда та ЛДГ₅ – при гепатитах забезпечує високу органну специфічність цих ізоформ. Значної діагностичної цінності набуває визначення ізоензимного спектра ЛДГ при хронічних захворюваннях печінки – як критерій активності процесу. Так, вимірювання активності ЛДГ₄ і ЛДГ₅ виявилось надійнішим та інформативнішим показником у цих випадках, ніж визначення активності амінотрансфераз та інших ензимів.

Заслуговує на увагу дослідження ізоформ ЛДГ для оцінки вираженості структурних ушкоджень серцевого м'яза і печінки в групі захворювань з ураженням цих органів. Так, підвищення ЛДГ₄ і ЛДГ₅ у сироватці крові хворих на інфаркт міокарда, хронічну коронарну недостатність, міокардит свідчить про ступінь ураженості печінки («шокова» або «застійна» печінка), а збільшення ЛДГ₁ і ЛДГ₂ при гепатитах – про вираженість дистрофічних змін у міокарді.

Ліпаза. Значне підвищення її активності виникає при гострому панкреатиті (майже в 200 разів порівняно з нормою). Рекомендується визначати активність ліпази паралельно з

амілазою при ураженнях підшлункової залози. Гіперліпаземія триває довше, ніж амілаземія, тому може вважатися більш інформативним критерієм ступеня одужання. Широко застосовується для оцінки функції підшлункової залози.

Помірне підвищення можливе при перфорації виразки шлунка, перитонітах, ентеритах, пухлинному процесі, отруєннях сильнотоксичними препаратами.

Сорбітолдегідрогеназа. Значне підвищення СД спостерігається при гострому інфекційному гепатиті (у 5–10 разів порівняно з нормою).

Помірне підвищення – при токсичному гепатиті (лікарські гепатити, отруєння гепатотропними отрутами), загостреннях хронічного гепатиту, цирозі.

Визначення її активності має важливе діагностичне значення при розмежуванні паренхіматозної та механічної жовтяниць.

Низькі значення активності СД у сироватці крові трапляються в нормі і при неускладненій запальним процесом механічній жовтяниці. Різке збільшення активності ензиму при гострому гепатиті забезпечує цьому показникові високу надійність та інформативність порівняно з іншими ензимами, які при цьому застосовують (лужна фосфатаза, 5-нуклеотидаза).

Важливим є ще й той факт, що при інфаркті міокарда, захворюваннях нирок і скелетних м'язів рівень активності СД у сироватці крові практично не змінюється. Тому підвищення активності ензиму характерне переважно для ураження паренхіми печінки. Як ранній діагностичний критерій СД поступається АлАТ. СД найчастіше використовується з диференційно-діагностичною метою при захворюваннях гепатобіліарної системи.

Трансамідиназа. Значне підвищення активності викликають хронічний пієлонефрит у фазі порушення азотовидільної функції, хронічний нефрит у термінальній фазі, нефротичний синдром, зумовлений амілоїдозом нирок і тромбозом ниркових вен. Помірне підвищення – хронічний нефрит без порушення азотовидільної функції, залишкові явища гострого нефриту, панкреатит.

Одиниці активності ензимів. У біологічних об'єктах ензими знаходяться в дуже мізерних концентраціях, тому для оцінки ензимних процесів визначають не їх вміст, що пов'язано з великими труднощами, а швидкість каталізованої реакції. Швидкість

таких реакцій залежить як від активності, так і від кількості ензиму.

Дослідження проводять в умовах оптимальної температури (25 °C), рН середовища і повного насичення ензиму субстратом. Швидкість реакції оцінюють за кількістю розщепленого субстрату або за кількістю утвореного продукту реакції.

За міжнародну одиницю активності ензиму приймається та його кількість, що перетворює один мікромоль субстрату (мкмоль) за одну хвилину в стандартних умовах: при t 25 °C, атмосферному тиску 1013 гПа (МО = мкм/хв).

Новою міжнародною одиницею активності ензиму є катал (кат). Він відповідає кількості ензиму, що перетворює 1 моль субстрату в продукт за 1 с (кат = М/с). Відношення міжнародної одиниці (МО) до каталу виражається таким чином: $1 \text{ кат} = 1 \text{ М} \cdot \text{с}^{-1} = 60 \text{ М} \cdot \text{хв}^{-1} = 60 \cdot 10^6 \text{ мкм} \cdot \text{хв}^{-1} = 6 \cdot 10^7 \text{ МО}$; або $\text{МО} = 1 \text{ мкм} \cdot \text{хв}^{-1} = 1/60 \text{ мкм} \cdot \text{с}^{-1} = 1/60 \text{ мккат} = 16,67 \text{ нкат}$.

Активність ензимів виражають також через питому і молекулярну активність. Питома активність ензиму виражається числом одиниць ензимної активності, що припадає на 1 мг білка. Чим вища питома активність, тим чистіший виділений ензим. Кількість молекул субстрату, що перетворюється однією молекулою ензиму за хвилину, називають сукупністю обертів, або молекулярною активністю ензиму. Наприклад, одна молекула каталази еритроцитів здатна розщепити за 1 хв $5 \cdot 10^6$ молекул пероксиду гідрогену.

Ензимопатії

Загальні тактичні принципи діагностики ензимопатій:

- склад ензимів та їх тканинний розподіл у дорослої тварини зазвичай постійні і можуть змінюватися при хворобах;
- для кожної тканини (органа) характерний свій якісний та кількісний склад білків, що обумовлює функціональні особливості кожної тканини;
- метаболічні шляхи в різних тканинах дуже схожі, тому існує небагато тканиноспецифічних ензимів (наприклад, орнітин-карбамоїлтрансфераза й гістидаза печінки);
- більш специфічним для тканин є співвідношення різних ензимів та ізоензимів.

Ензимопатії поділяють на *первинні* та *вторинні*. До першої групи належать спадкові захворювання обміну речовин, у патогенезі яких основну роль відіграє відсутність, нестача або аномальна структура ензиму. Краще вивчені та описані у гуманній медицині. Первинні, або спадкові, ензимопатії виникають унаслідок змін у генетичному коді синтезу ензимів. Причинами ензиматичних дефектів можуть бути: аномальна структура ДНК, порушення перенесення генетичного коду від ДНК до РНК, змінена структура РНК і порушення в передачі інформації від РНК до рибосом. Крім цього, причиною метаболічних розладів можуть бути генетично зумовлені порушення співвідношення природних активаторів та інгібіторів ензимів.

Причиною спадкових ензимопатій є мутації, що проявляються характерними змінами в активності відповідних ензимів. При цьому ензиматична активність відсутня або знижена, або (дуже рідко) підвищена. Можуть з'являтися патологічні ензими, які в нормі не трапляються.

Ензиматичні дефекти при спадкових ензимопатіях спричинюють порушення обміну речовин (метаболічний блок), що є причиною нагромадження невикористаного субстрату та його попередників, які, у випадку їх токсичності, призводять до патологічних змін і можуть викликати вторинний метаболічний блок. Так, при *галактоземії* (дефіцит галактозо-1-фосфат-уридилтрансферази або галактокінази) відбувається накопичення в крові й тканинах галактозо-1-фосфату, вільної галактози та спирту дульциту – продукту відновлення галактози. Високий їх вміст діє токсично, у новонароджених після споживання молока спостерігають блювання та пронос, збільшується печінка, розвивається катаракта.

Друга група – це захворювання, при яких ензиматичні порушення виникають вторинно. Вони розвиваються внаслідок пошкодження тканин різними агентами (вірусами, бактеріями, найпростішими, отрутами тощо). Розвиток набутих ензимопатій можна представити так: етіологічний фактор викликає порушення (пригнічення або стимуляцію) діяльності однієї або декількох ензиматичних систем і порушення відповідних обмінних процесів, у результаті чого виникає захворювання з характерними для нього симптомами. Так, інфекційні хвороби (вірусні, бактеріальні, паразитарні) супроводжуються важкими розладами функцій ензиматичних систем, насамперед, у результаті дії на них екзо- й ендотоксинів мікроор-

ганізмів, які блокують синтез низки важливих ензимів або гальмують їх активність. Описаний патогенез характерний також для більшості отруєнь.

Прикладом вторинних ензимопатій є ендокринні захворювання. Гіпо- або гіперфункція певної ендокринної залози пов'язана зі зниженням або підвищенням синтезу відповідних гормонів, отже, з порушенням роботи ензиматичних систем, які ними регулюються. Так, при цукровому діабеті дефіцит інсуліну викликає пригнічення або стимулювання активності низки ензимів: блокується активність ензимів, які забезпечують окиснення глюкози й активуються ензимами глюконеогенезу, ліполізу, метаболізму білків тощо.

Алергійні захворювання вважають індивідуальною вразливістю ензиматичних систем різними кормовими, лікарськими та іншими алергенами. Дія лікарських препаратів викликає ураження лізосомальних ензимів.

Механічне пошкодження тканин (хірургічні втручання, травми) також є типовою ензимопатією. Механічна травма порушує кровопостачання в пошкодженій ділянці, блокує надходження субстратів і коферментів, порушує оптимальні умови їх дії.

Порушення водно-мінерального обміну, кислотно-лужного стану, терморегуляції – це також ензимопатії, оскільки нормальний електролітний склад, рН і температура організму забезпечують оптимальні умови для функціонування всіх ензимів.

Гіпо- й авітамінози, нестача незамінних амінокислот, есенційних жирних кислот, макро- і мікроелементів у кормовому раціоні викликають порушення синтезу великої кількості ензимів, сприяючи цим самим розвитку ензимопатій.

У патогенезі деяких захворювань відбувається не тільки гальмування ензиматичних систем, але й їх гіперактивація. Так, наприклад, для гострого панкреатиту характерні гіперпродукція та гіперактивація протеолітичних ензимів, що викликає тяжкі метаболічні розлади. Тому штучне блокування протеїназ їх інгібіторами (трасилолом, контрикалом) забезпечує при цій патології виражений терапевтичний ефект. При травмах легенів із легеневої тканини в кров'яне русло викидається значна кількість фібринокіназ, які викликають гострий фібриноліз.

Таким чином, ензимопатії лежать в основі всіх патологій ссавців. Тому тяжко уявити захворювання, яке б не супроводжувалося ензиматичними порушеннями.

Ензими як аналітичні реагенти. Ензими, які застосовують для діагностики, отримують із різних джерел: рослин, тварин, мікроорганізмів (здебільшого бактерій). Їх широко використовують у клінічних лабораторіях як аналітичні реагенти для визначення кількості субстрату, ідентифікації медпрепаратів, визначення активності інших ензимів. Ці можливості пов'язані з каталітичними властивостями ензимів та високою специфічністю до субстратів каталізованих ними реакцій (табл. 3.3).

Таблиця 3.3. Приклади використання ензимів в якості хімічних реактивів

Функція ензиму	Ензим	Досліджувана речовина
Визначення субстрату	Гексокіназа	Глюкоза
Визначення коензимів	Аспартатамінотрансфераза	Піридоксальфосфат
Визначення активаторів	Ізоцитратдегідрогеназа	Магній
Визначення інгібіторів	Лужна фосфатаза	Теофілін
Зменшення впливу інших речовин	Оксидаза аскорбінова	Креатинін
Спряжені реакції	Яблучна дегідрогеназа	Аспартатаміно-трансфераза
Посилення діючого сигналу	Луцифераза	НАДН
Імунологічні визначення	Лужна фосфатаза Пероксидаза хрому Дегідрогеназа глюкозо-6-фосфату	Тироксин Пролактин Фенитоїн

Перевагою цих методів є те, що відповідний субстрат для його визначення не потребує попереднього виділення та очищення, він може бути ідентифікований у сироватці крові або іншій біологічній рідині.

Питання для самоконтролю:

1. Яке значення ензимів для медицини?
2. Локалізація ензимів у різних органелах клітини.
3. Особливості складу й розподілу ензимів в організмі тварини.

4. Застосування ензимів для діагностики та лікування захворювань. Навести приклади.
5. Використання ензимів в якості аналітичних реактивів.
6. Міжнародні одиниці визначення активності ензимів.
7. Роль ізоензимів у діагностиці захворювань нирок.
8. Використання ізоензимів у діагностиці захворювань серцево-судинної системи.
9. Клініко-діагностичне значення ізоензимів при патології печінки.
10. Клініко-діагностичне значення визначення активності: α -амілази, амінотрансфераз, аланінамінопептидази, лужної та кислої фосфатази.
11. Первинні та вторинні ензимопатії.
12. Ензими як аналітичні реагенти.

3.2.3. Лабораторна діагностика порушень біохімічних процесів у легенях і міокарді при хворобах респіраторної та серцево-судинної систем

Клініко-біохімічна характеристика патологічних процесів у легенях. Структурна організація легень забезпечує основні газообмінні функції. Враховуючи анатомічні особливості легень, що мають значну площу поверхні дихальних шляхів і сполучаються із зовнішнім середовищем, важливо знати метаболічні процеси, що відбуваються в їхніх клітинах. Легені синтезують і секретують поверхнево-активні речовини (сурфактанти), які беруть участь у регуляції згортальної та протизгортальної систем, в обміні біологічно активних речовин та інших механізмах підтримання гомеостазу організму.

Енергетичні процеси в легеневій тканині. Для підтримання структурної й функціональної системи в легенях потрібна енергія, яка утворюється під час метаболізму речовин. Основним місцем її синтезу є мітохондрії, де, крім цього, відбувається й біосинтез нових сполук: лецитину, фосфогліцеролу, кардіоліпіну. Мітохондрії легень відрізняються від мітохондрій інших тканин ферментативною активністю та розподілом ферментів. Так, піруватфосфаттрансфераза (EC 2.7.1.40) у легенях знаходиться в мітохондріях (90 %), тоді як у печінці – в розчинній фракції цитоплазми (90–96 %).

У мітохондріях легень 60 % піридинових нуклеотидів представлені у формі НАДН, причому НАД відновлюється у 6–8 разів повільніше порівняно з печінкою, а α -гліцерофосфат і малат окиснюються у 5–10 разів швидше.

Енергетична система мітохондрій легень реагує на швидкість кровоплину в легеневій тканині та її наповнення повітрям. У разі повнішого заповнення повітрям легенів інтенсивніше відбувається гліколіз і утворюється більше АТФ. У разі низької швидкості кровоплину знижується енергозабезпечення клітин, а також синтез аденілових нуклеотидів. У випадку вираженої гіпоксії в легенях спостерігають зниження активності мітохондріальної су пероксиддисмутази.

Мірою метаболічної активності може слугувати ступінь використання Оксигену, концентрація АТФ у легеневій тканині така сама, як і в інших тканинах. Легені синтезують від 57 до 174 мМ АТФ на 1 г тканини за 1 год.

Одним з основних чинників, що зумовлюють порушення біохімічних процесів у легеневій тканині у разі бронхолегеневих захворювань, є гіпоксія. Порушення кровоплину та лімфотоку до ушкоджених ділянок легенів спричинюють кисневе голодування та розвиток дихальної недостатності. Збільшення продукування легеневою тканиною лактату в разі нестачі Оксигену є результатом не тільки розщеплення глюкози, а й катаболізму амінокислот.

У разі виникнення гіпоксії в ізоферментному спектрі ЛДГ збільшується фракція ЛДГ₅. В ізоферментному спектрі МДГ (ЕС 1.1.1.37) також відбуваються значні зміни. У ЦТК посилюється окиснення яблучної кислоти, а також катаболізм амінокислот. Хронічна гіпоксія зумовлює ще більшу активність гліколізу та глікогенолізу; при цьому знижується концентрація АТФ. У відповідь генетичний апарат збільшує кількість мітохондрій для відновлення продукування АТФ.

Гіпоксичні стани спричинюють зміни не лише в легеневій тканині, а й в еритроцитах. Гіпоксія зумовлює дихальну недостатність I і II ступенів у хворих на пневмонію. Підвищення 2,3-ДФГ знижує активність глюкозо-6-фосфат-дегідрогенази (Г-6-ФДГ, ЕС 1.1.1.49), водночас збільшується активність карбонатгідратази (ЕС 4.2.1.1), що призводить до порушення транспорту O₂ еритроцитами. Подальша перебудова обмінних процесів у

еритроцитах спричинює виникнення компенсаторних механізмів транспорту O_2 .

Отже, у разі зміни або порушення газообміну, зумовленого патологічними процесами в легеневій тканині, відбувається перебудова окисно-відновних реакцій, активуються компенсаторно-приспосувальні механізми, спрямовані на відновлення синтезу макроергічних сполук, які необхідні для реакцій синтезу жирних кислот, фосфоліпідів – поверхнево-активних компонентів сурфактанту, а також інших глікопротеїдів і протеїнів – компонентів бронхіального секрету легенів.

Особливості метаболізму протеїнів у легенях. Легені перебувають в умовах постійного навантаження, що пов'язане як із силами протидії їх спаданню, так із чергуванням фаз вдиху та видиху. Виконання легенями їхньої функції забезпечується завдяки значному вмісту в їхній структурі протеїнів – колагену та еластину. Порівняно з іншими паренхіматозними органами, кількість колагену в легенях найбільша. Ці протеїни забезпечують сталість форми легень і полегшують виконання ними газообмінної функції. При деяких хворобах – емфіземі й фіброзі легень – спостерігають зміну структури та властивостей цих протеїнів. Важливу роль у фізіологічних процесах легень відіграють протеїни, що входять до складу сурфактанту та бронхіального секрету.

Колаген – фібрилярний протеїн, локалізований на рибосомах, який утворює триспиральну молекулу – мономер з молекулярною масою 270000 Да, завдовжки 290 нм. Сполучення 5–8 мономерів утворює фібрилярну нитку. Протеоглікани сприяють утворенню пучків колагенових фібрил і колагенових ниток. Виділено 5 типів легневих колагенів.

Еластин – фібрилярний протеїн строми легенів, який має два структурні компоненти – власний еластин і структурний глікопротеїн. Еластин характеризується наявністю значної кількості неполярних амінокислотних залишків таких як гліцин (близько 30 %), аланін (24 %), валін, фенілаланін, ізолейцин і лейцин. Структурний глікопротеїд містить у своєму складі багато вуглеводів і цистину, у ньому відсутні десмозин і оксипролін.

Концентрація еластину в легенях при емфіземі зменшується і перебуває в межах 9,0–9,9 %, тоді як у здорових тварин – 30–35 %,

у молодняка в середньому 7,3 %. Підвищений розпад еластину спостерігають у разі порушення балансу в системі ензимів протеолізу та інгібування. Інгібітором протеаз є α_1 -антитрипсин. Особини, в яких відсутній ген, відповідальний за синтез α_1 -антитрипсину, належать до групи ризику захворювань легень з подальшим розвитком емфіземи.

Наступним протеїном – інгібітором протеїназ є α_2 -макроглобулін, який належить до α_2 -глобулінової фракції й інгібує активність усіх чотирьох каталітичних класів: серинових, тіолових, карбокси- та металопротеїназ. Біологічна роль α_2 -макроглобуліну полягає в регуляції функціонування системи комплементу, регуляції судинного тону та реакцій запалення.

Зниження концентрації α_2 -макроглобуліну спостерігають при захворюваннях легень. α_2 -Макроглобулін із сироватки крові потрапляє в мокротиння внаслідок підвищеної проникності клітинної стінки. Отже, в розвитку легеневої патології має значення співвідношення протеаз та інгібіторів.

Роль протеогліканів і глікопротеїнів у легенях. Міжклітинна речовина сполучної тканини має гелеву консистенцію завдяки високому вмісту протеогліканів. Типова молекула протеоглікану складається з серцевинного поліпептидного ланцюга – кору, до якого з боків приєднуються глікозаміноглікани. Вуглеводна частина протеогліканів має негативний заряд, що визначає головну їх роль у регуляції водно-сольового обміну, а також має можливість вступати в комплекси з колагеновим протеїном та іонами Кальцію.

Гепарин – глікозаміноглікан, який синтезується базофілами сполучної тканини, виявляє антикоагулявальну дію, пригнічує згортання крові завдяки своїй властивості утворювати комплекси з багатьма протеїнами системи згортання крові. Концентрація гепарину в легенях досить висока, а його дія виявляється в основному в клітині.

Кератансульфат бере участь у формуванні каркасу легені, його кількість з віком збільшується, що призводить до зниження еластичності. До складу міжклітинної рідини входять і глікопротеїди, які містять до 15 % вуглеводних залишків. Вони малорозчинні, але мають високі антигенні властивості. До них належить фібронектин, який знаходиться в позаклітинній рідині на поверхні багатьох клітин. Розрізняють дві його форми –

розчинну, яка циркулює в крові та інших біологічних рідинах, і зв'язану з поверхнею клітин.

Ліпіди при легеневій патології. Дослідження ліпідів при захворюваннях органів дихання в основному спрямоване на вивчення ліпідів сурфактанту, тканин легень, бронхоальвеолярних змивів і сироватки крові. Дослідження ліпідів сурфактанту має велике значення для встановлення ступеня зрілості цієї системи. Досліджено, що співвідношення фосфатидилхолін/сфінгомієлін дорівнює 2, концентрація фосфати-ділхоліну становить 10 мкМ, а концентрація поверхнево-активних ліпідів 20 мкМ.

Легені містять набір ензимів для синтезу жирних кислот, триацилгліцеролів і холестеролу, у них також є ліполітичні ферменти: фосфоліпази, ліпопротеїдліпази, діацилгліцерол- і триацилгліцеролліпази. Ліпопротеїдліпаза в легенях перебуває у двох формах: розчинній і мембранозв'язаній. Вони різняться між собою оптимумом рН (7,5 і 9) й інгібуються протамінсульфатом. Фосфоліпазна активність у тканинах легень вища порівняно з печінкою. Фосфоліпаза A_2 перебуває в основному в розчинній і неактивній формі.

У легенях завдяки наявності ліпопротеїназ, триацилгліцероліпаз розщеплюються хіломікрони, а їх продукти використовуються в обмінних процесах. Таким чином, легені виконують роль буфера, який регулює вміст ліпідів у крові. Крім того, ліпіди необхідні для синтезу сурфактанту, який складається з холестеролу (8 %), моно-, ди-, і триацилгліцеролів (4 %), фосфатидилхоліну (66 %), фосфатидилетаноламіну (5 %), фосфатидилсерину (4 %), сфінгомієліну (1 %), вуглеводів (1 %), протеїну (9 %). Особливістю синтезу ліпідів у легеневій тканині є утворення ліпідів сурфактанту, особливо фосфоліпідів. Мета-болізм інших ліпідів відбувається так само, як у інших органах.

У разі гіпоксії в легеневій тканині зменшується утилізація вільних жирних кислот, фосфатидилхоліну та фосфатидилетаноламіну, що призводить до накопичення жирних кислот у гіпоксичній легені та до зниження поверхневої активності сурфактанту. Низький парціальний тиск Оксигену зумовлює гіпоксію в легеневій тканині, що зумовлює зниження інтенсивності процесів трансметилування й ацетилювання та порушення синтезу фосфоліпідів.

Підвищення концентрації жирних кислот зумовлене зменшенням інтенсивності окисних процесів у циклі Кребса, накопиченням ацетил-КоА, інгібуванням β -окиснення в мітохондріях і активацією фосфоліпаз, що призводить до збільшення концентрації вільних жирних кислот і лізофосфатидів. Отже, в разі гіпоксії не тільки інгібуються обмінні процеси, продукування АТФ, а й відбувається ушкодження мембран та порушується функція клітин.

Обмін біологічно активних речовин. Основу недихальних функцій легень становлять специфічні метаболічні процеси, які дістали назву «ендогенного легеневого фільтра», або «легеневого бар'єра». Вони пов'язані з вибірковою інактивацією деяких біологічно активних речовин (БАР), до яких належать серотонін, катехоламіни, ацетилхолін, гістамін і вазоактивні пептиди, що відіграють важливу роль у біохімічних процесах легень.

Дослідження метаболічної функції легень при їх різноманітній патології дає змогу відокремити три типи метаболічних зсувів: перший пов'язаний з підвищенням концентрації БАР у тканинах, що супроводжується збільшенням активності ферментів, їх катаболізму. Цей тип виникає у разі гострих стресових ситуацій; другий – зі збільшенням концентрації БАР, що супроводжується зниженням активності катаболічних процесів. Трапляється цей тип у разі тривалої гіпоксії та хронічних бронхолегеневих процесів. Третій тип характеризується дефіцитом БАР у легеневій тканині, що супроводжується пригніченням активності катаболічних ензимів. Його спостерігають у разі тривалого перебігу бронхоектатичної хвороби.

Фазовість змін метаболізму моноамінів та ацетилхоліну спостерігають при деяких патологічних станах. Гіпоксія супроводжується посиленням активності моноамінооксидази (МАО). Короткочасна ішемія органа зумовлює підвищення активності ензиму, й тривала – зменшення. Пригнічення окисного дезамінування зареєстровано у хворих на бронхоектатичну хворобу.

Отже, зниження активності МАО є однією з причин порушення метаболічної функції легень до серотоніну та норадреналіну і призводить до зростання їх концентрації в крові. Активність ацетилхолінестерази також змінюється при деяких патологічних станах, що істотно впливає на метаболізм ацетилхоліну. До таких станів належать ішемія легенів, хронічний запальний бронхоле-

геновий процес, за якого активність цього ензиму різко знижується.

Вазоактивні пептиди. До них належать найбільш вивчені кініни: брадикінін, калідин, метіоніллізилбрадикінін. Усі вони утворюються з попередників кініногенів, які представлені глюкопротеїдами α_2 -глобулінової фракції. За походженням кініно-геніни поділяють на плазмові й тканинні. Легені мають досить високу кініногенову активність і містять достатню їх кількість. Широкий спектр біологічної дії вазоактивних пептидів забезпечує процеси скорочення та розслаблення непосмугованих м'язів бронхів, розширення артерій, впливає на мікроцид-куляцію, місцевий кровообіг в органах, моторику бронхів.

Кініни не лише впливають на мікроциркуляцію, вони, розширюючи артеріоли та капіляри й зумовлюючи спазм артеріовенозних шунтів і венул одночасно підвищують проникність судинних стінок. Так, брадикінін може впливати на непосмуговані м'язи бронхів не лише безпосередньо, а й через подразнення адренорецепторів, які розміщені в непосмугованих м'язах.

Кініни в організмі дуже швидко інактивуються. Потужна ферментна система, що руйнує брадикінін, знаходиться в легенях. Легенева ферментна система може руйнувати брадикініни або брати участь у перетворенні ангіотензину I на ангіотензин II. У цьому процесі бере участь дипептидил-дипептидаза, яка може інгібуватись синтетичним препаратом каптоприлом, що є похідною N-ацилпроліну й містить SH-групи. Цей ензим досить часто називають кініназою II, або ангіотензинконвертувальним ензимом.

Гістамін (β -імідазолдіетиламін) належить до групи біогенних амінів і утворюється з гістидину. Місцем синтезу гістаміну є шкіра, слизова оболонка травного каналу та легені, а міститься він у тканинних базофілах.

Гістамін, на відміну від серотоніну, норадреналіну, ацетилхоліну, брадикініну, які циркулюють у крові, не зникає під час проходження через легені. У легенях містяться ензими, які можуть окиснювати й метилувати цей амін. Можливо, інактивація гістаміну частково відбувається в легенях, оскільки активність гістидин-метилтрансферази досить висока порівняно з іншими органами. Гістамін є нестійкою сполукою і швидко руй-

нується. Він підвищує тонус легеневих вен і, меншою мірою легеневих артерій. Гістамін відіграє значну роль у розвитку бронхіальної астми. Він може підвищувати тонус бронхіальних м'язів, збуджуючи H_1 -рецептори або аферентні вагусні волокна. Крім того, може підсилювати холінергічний і α -адренергічний бронхоспастичний ефект або погіршувати розслаблення непосмугованих м'язів, яке виникає у разі збудження β -адренорецепторів.

Простагландини (ПГ) – це ненасичені сполуки, які містять ланцюг із 20 атомів Карбону, частина яких включена в циклопентанове ядро. Їх поділяють на 4 основні групи – А, В, Е, F. Утворюються під впливом мультиферментного мембранозв'язаного ензиму простагландинсинтетази, яку виявлено в легенях. Синтез ПГ відбувається в ендотеліальних клітинах легенів. Інгібіторами синтезу є глюкокортикостероїди, які блокують активацію фосфоліпази A_2 , що розщеплює фосфоліпіди з утворенням вільних жирних кислот. Таким шляхом вивільнюється арахідонова кислота, яка є основним попередником ПГ. Вони беруть участь у формуванні тонуусу непосмугованих м'язів бронхів. ПГЕ виявляє бронхорозширювальну дію, ПГЕ₁ – розширює капіляри легенів і зменшує тиск у легеневій артерії, ПГF₂ зумовлює гіповентиляцію, ПГЕ₂ – гіпервентиляцію. Остання призводить до посиленого синтезу ПГЕ, що супроводжується розширенням судин і збільшенням співвідношення вентиляція/перфузія

Легені є основним місцем інактивації ПГ. Так, за одну циркуляцію знешкоджується 90–95 % ПГ груп Е і F при введенні їх у кров у концентрації 0,5–1 мг/дм³. Знешкодження первинних простагландинів полягає в окисненні гідроксильної групи в 15-му положенні. Вони перетворюються на неактивні метаболіти й швидко вимиваються з легенів у печінку, де відбувається їх подальше перетворення. ПГ можуть кон'югувати з глутатіоном.

Деякі ПГ метаболізуються легенями повністю, інші частково, а ПГА, ПГВ і простагландин ПГI₂ не усуваються з циркуляції зовсім. Слід зазначити, що легені інактивують не тільки ПГ, що циркулюють у крові, а й ті, які синтезують. Цей факт потрібно розглядати як захисну реакцію організму.

Отже, однією з ланок системи нейрогуморальної регуляції фізіологічних функцій організму є легені, які беруть участь у підтриманні гомеостазу багатьох БАР. Ця ланка забезпечує можливість інактивації в легенях надлишку циркулюючих у крові біогенних амінів, пептидів, ацетилхоліну, простагландинів, що визначає бар'єрну функцію легенів, яка пов'язана з катаболічними процесами, що в них відбуваються.

Система імунного захисту бронхолегеневого апарату.

Система імунного захисту бронхолегеневого апарату є неоднорідною і складається з лімфатичних вузлів, вузликів та скупчення лімфоїдних клітин. Лімфоїдна тканина розміщена вздовж усього дихального тракту, від носової частини глотки до альвеол. У легенях знайдено своєрідну структурну одиницю імунокомпетентної системи – бронхоасоційовану лімфоїдну тканину, подібну до групових лімфатичних фолікулів кишки. Лімфатичні вузли розміщені вздовж слизової оболонки, багато їх у місцях розгалуження бронхів. Вони є резервуаром імунокомпетентних клітин, які можуть мігрувати через епітелій у просвіт бронхів. Особливо багато лімфоїдної тканини в дрібних бронхах, де вона відокремлена від просвіту тонким шаром безвійчастого епітелію. Такий розподіл лімфоїдної тканини пов'язаний з тим, що у верхніх дихальних шляхах захист здебільшого забезпечують неспецифічні механізми – *повітряний фільтр, шар слизу, діяльність війок, активність ензимів та інші складові бронхіального секрету*. У каудальних відділах ці механізми майже не функціонують і тому стає можливим контакт поверхні дихальних шляхів із антигенними субстанціями, що й пояснює збільшення кількості лімфоїдної тканини в повітроносних шляхах.

У місці переходу війчастих клітин, що вистилають альвеолу, епітелій має назву лімфоепітелію і є аферентною ланкою імунної відповіді. Структура лімфоїдної тканини бронхів забезпечує швидкий і щільний контакт у системі макрофагів – Т- і В-лімфоцитів, а імунна відповідь реалізується продукуванням антитіл і виділенням лімфокінів. Клітини цієї системи обмінюються інформацією завдяки лімфокінам, які інгібують міграцію макрофагів. У разі проникнення антигену в лімфатичні вузли, відбувається специфічна активація клітин. Це зумовлює міграцію в лімфоїдну тканину бронхів і бронхоальвеолярного секрету клітин, які утворюють антитіла.

Залежно від особливостей антигену та функціональної активності місцевих захисних систем імунна реакція може здійснюватись у лімфоепітеліальних структурах слизової оболонки бронхів (*тканинний рівень*) або в регіонарних трахеобронхіальних і прикореневих лімфатичних вузлах (*органний рівень*), а також у лімфоїдних органах загальної системи імунітету (*системний рівень*).

Функціональна роль бронхолегеневого секрету. Сурфактантна система представлена клітинними та неклітинними компонентами. Клітинний компонент складається з альвеоларних макрофагів і альвеоцитів (I–III типів). Неклітинний компонент включає сурфактантний альвеолярний комплекс: сурфактант альвеолярних ходів і бронхіол 1–3-го порядку. Сурфактантний альвеолярний комплекс складається з *сурфактанту, гіпофази та глікокаліксу*.

Сурфактант – це поверхнево-активна мономолекулярна плівка, яка розміщена на межі поділу фаз повітря–рідина в альвеолах, альвеолярних каналах і респіраторних бронхіолах 1–3-го порядку. Встановлено, що *субодиницею сурфактанту є біліпідна мембрана*, в яку вбудовані ліпідні шари гліко- та ліпопротейнових комплексів.

Гіпофаза є рідкою фазою, яка розміщена під сурфактантом. Вона заповнює нерівності клітинної альвеолярної вистилки й містить макрофаги, резервний зрілий сурфактант, осмофільні пластинчасті тільця та їх фрагменти – продукти секреції альвеоцитів II типу (АЦ-II).

У легенях товщина шару *глікокаліксу* на апікальній поверхні АЦ-I становить 10 нм, а на апікальній поверхні АЦ-II – 40 нм. Сурфактант містить 90 % ліпідів, із них 75 % складають фосфоліпіди, 10 % – триацилгліцероли, близько 5 % – холестерол і жирні кислоти.

У регуляції сурфактантної системи легенів беруть участь глюкокортикоїдні гормони надниркових залоз. Сурфактантна система легенів виконує кілька важливих функцій. Поверхнево-активні речовини зменшують поверхневий натяг і, як наслідок, роботу, необхідну для вентиляції легенів, стабілізують альвеоли та запобігають їх ателектазу. При цьому поверхневий натяг зростає під час вдиху й зменшується під час видиху, отже, практично дорівнює нулю. Сурфактантна система бере участь в

адаптації організму до різних екстремальних впливів зовнішнього середовища. Гіповентиляція легенів призводить до руйнування плівки сурфактанту, а при відновленні вентиляції плівка сурфактанту повністю не відновлюється. Властивості сурфактанту змінюються і при гіпоксії.

Запальний процес у легенях зумовлює порушення властивостей сурфактанту. Ступінь цих порушень залежить від активності запалення.

Порушення в системі сурфактанту спостерігають при гострій та хронічній пневмонії, набряку легень, емфіземі. У разі запальних процесів у бронхолегеневій системі на стан сурфактанту впливають порушення кровообігу, об'єм повітря, що надходить, БАР і метаболіти.

Трахеобронхіальний секрет є результатом діяльності келихоподібних клітин, залоз бронхів і трахеї. До складу секрету входять: сурфактант альвеол, компоненти плазми крові, які потрапляють туди шляхом ексудації або трансудації, локально синтезовані білки, а також продукти дегенерації та розпаду власної тканини. Він є гетерогенною речовиною, що складається з легкокорозивної у воді фази та нерозчинного гелеподібного слизу, який має волокнисту структуру. Об'єм води становить 89–95 %, у ній містяться Натрій, Хлор, Фосфор і Кальцій. Органічні речовини – протеїни, вуглеводи, нуклеїнові кислоти та ліпіди знаходяться в слизу. Під час інфекційних запальних процесів у бронхах змінюється хімічний склад і підвищується в'язкість гнійного секрету. Розвиток запального процесу призводить до зростання вмісту лізоциму, цАТФ, збільшення активності лужної й кислоти фосфатази.

Муцини відіграють важливу роль у механізмах захисту бронхів, здійснюючи регуляцію концентрації води та іонів і створюють оптимальні умови для знешкодження мікроорганізмів. Бронхіальні муцини становлять 60–70 % сухої речовини слизу.

За хімічною структурою їх поділяють на три класи: *сіаломуцини* (містять залишки N-ацетилнейрамінової кислоти), *сульфомуцини* (містять сульфатну кислоту) і *нейтральні фукомуцини* (містять залишок фукози). У слизових клітинах виявлено ензим сіалілтрансферазу, яка бере участь у синтезі сіаломуцинів.

Під час запальних процесів концентрація імуноглобулінів А, G і трансферину у вмісті бронхів порівняно з сироваткою крові вища. Вміст трипсину в сироватці крові та бронхіальному вмісті приблизно однаковий, а концентрація α_2 -макроглобуліну в рідині незначна.

Патохімія та клінічна біохімія при запальному процесі в легенях. Сучасні уявлення про біохімічні порушення ґрунтуються на результатах вивчення метаболічної активності легенів, яка тісно пов'язана з їх основною фізіологічною функцією – газообміном. Під час запалення, яке спричинюють інфекційні агенти (пневмонія, гострий і хронічний бронхіт, бронхоектази тощо) поряд зі змінами метаболічної активності легенів виникають неспецифічні біохімічні порушення окремих параметрів крові. У розвитку запальних процесів значну роль відіграють медіатори запалення (гістамін, простагландини, лейкотрієни, цитокіни). Виявлення змін деяких із них істотно доповнює інформацію, яку отримують під час традиційних клінічних досліджень крові: вміст загального протеїну, альбумінів, глобулінів (α_1 , α_2), сіалових кислот, С-реактивного протеїну, гаптоглобіну, серомукоїдів, фібриногену. Ступінь інтенсивності місцевої запальної реакції в бронхах можна оцінити біохімічним дослідженням мокротиння (табл. 3.4).

Концентрація загального протеїну змінюється переважно при гнійних процесах у легенях. Гострі абсцеси легенів супроводжуються тенденцією до збільшення вмісту загального протеїну (впродовж перших двох місяців), при хронічних нагноєннях (бронхоектазії, хронічний абсцес, емпієма плеври) зафіксовано його зниження (75–60 %) відносно норми. У багатьох тварин, хворих на неспецифічні захворювання легенів,

Таблиця 3.4. – Характеристика мокротиння при патології легень

№ з/п	Нозологічна форма	Макроскопічне дослідження			Мікроскопічне дослідження
		кількість	характер патологічних елементів	включення	
1.	Гострий бронхіт	незначна	слизисте, слизисто-гнійне	–	циліарний епітелій, лейкоцити (помірна кількість), за затяжного перебігу – макрофаги
2.	Хронічний бронхіт	різна	слизисто-гнійне, слизисто-гнійно-кров'янисте	–	велика кількість лейкоцитів, еритроцити, макрофаги, численна флора
3.	Бронхоектатична хвороба	значна	гнійно-слизисте, тришарове	–	велика кількість лейкоцитів, кристали жирних кислот, гематоїдин, холестерол, різноманітна флора
4.	Крупозна пневмонія	спочатку незначна, пізніше значна	спочатку клейке, рідке, пізніше слизисто-гнійне	згустки фібрину, змінена кров	макрофаги, лейкоцити, еритроцити, кристали гематоїдину, пневмококи, зерна гемосидерину

5.	Абсцес легенів	значна в разі прориву абсцесу	гнійне з неприємним запахом	часточки тканини	велика кількість лейкоцитів, еластичні волокна, кристали жирних кислот, гематоїдину, холестеролу, різноманітна флора
6.	Бронхо-легеневий рак	різна	слизисто-кров'янисте, слизисто-гнійно-кров'янисте	уривки тканини	атипові клітини
7.	Туберкульоз легенів	різна	слизисто-гнійне, іноді з домішками крові	за наявності каверн – рисові тільця	мікобактерії туберкульозу, еластичні волокна, різні кристали

Слід звертати увагу на фракцію α_1 -глобулінів: її низькі показники можуть свідчити про дефіцит інгібітора α_1 -АТ. Підвищення вмісту β -глобулінів спостерігають при частих загостреннях і довготривалих процесах. При нагноєннях зростає концентрація γ -глобулінів. Достатньо інформативним тестом є визначення величини відношення вмісту альбуміну (А) до суми фракцій α -глобулінів $A/(\alpha_1+\alpha_2)$. Виражений запальний процес характеризується різким його зниженням.

Визначення С-реактивного протеїну дає відносне уявлення про активність запального процесу в легенях. У фазу загострення при гострій пневмонії та гнійних процесах спостерігають зростання концентрації сіалових кислот у 1,5–2,0 рази порівняно з нормою. Одночасно з сіаловими кислотами зростає концентрація гаптоглобіну, яка в гостру фазу збільшується у 1,5–2,0 рази. Концентрація серомукоїдів значно підвищується при хронічних бронхітах у фазу загострення.

Для багатьох гострих запальних процесів у респіраторних відділах легенів характерне накопичення ексудату, чому значною мірою сприяє пухка структура органа. Виділяючись із розширених капілярів міжальвеолярних перегородок, ексудат потрапляє в просвіт альвеол, витісняє повітря і поширюється повітряними шляхами. Склад ексудату змінюється в динаміці розвитку запального процесу, причому в більш пізню фазу зазвичай збільшується кількість альвеолярних макрофагів, які беруть участь у процесах розсмоктування. Знищення мікроорганізмів відбувається за участю нейтрофільних лейкоцитів і макрофагів шляхом виділення ензимів, поглинання твердих часточок і рідких речовин.

У тканині легенів знаходяться основні антиоксидантні ензими, церулоплазмін, вітамін Е, що беруть участь у різних адаптаційних процесах. Передусім це стосується газового складу повітря, яке вдихається. Так, у процесі гіпероксичної дії у пневмоцитах і альвеолярних макрофагах значно підвищується активність супероксиддисмутази. Гіпоксія призводить також до підвищення продукування супероксидного радикалу внаслідок інгібування активності цитохромоксидази, а активність каталази та глутатіонпероксидази зростають. Активні радикали ушкоджують ліпідні структури, що входять до складу сурфактанту легенів.

Бронхіальний секрет має складні реологічні властивості. Реологічні властивості мокротиння (еластичність) залежать від умісту муцину та секреторного IgA. Найбільшу в'язкість спостерігають у хворих на хронічний обструктивний бронхіт, а її зниження при необструктивній формі хронічного бронхіту. В'язкість мокротиння в добовій порції зазвичай є нижчою порівняно з ранньою. Існує кореляція між концентрацією сіалових кислот, рівнем протеїну та в'язкістю мокротиння. Бронхи й легені, які постійно контактують із зовнішнім середовищем, утворюють кілька захисних бар'єрів. Першим бар'єром є трахеобронхіальний слиз, який містить 70–80 % глікопротеїдів, що можуть забезпечувати детоксикаційні процеси.

Наступним важливим бар'єром на шляху вільних радикалів є легеневий сурфактант, який містить антиоксидантні ензими.

Лабораторна діагностика кардіопатій. Серед захворювань серцево-судинної системи (ССС) розрізняють ішемічну хворобу серця (ІХС) – гостре та хронічне ураження серця, спричинене зменшенням або припиненням постачання кров'ю міокарда.

В умовах дефіциту кисню в клітинах міокарда метаболізм переорієнтовується з аеробного на анаеробний, тобто активізуються гліколіз та глікогеноліз, продуктом яких є молочна кислота. Це лімітує функціонування кінцевого ферментного комплексу дихального ланцюга – цитохромоксидази, яка передає електрони на молекулярний кисень. Тим самим транспортування електронів дихальним ланцюгом у цілому та поєднаний з диханням ресинтез АТФ пригнічуються. Як наслідок, значно зростає вміст відновлених переносників дихального ланцюга, зменшується вміст АТФ і креатинфосфату, який регенерує АТФ під час витрачання, зростає кількість продуктів їх розпаду.

Уже на ранніх стадіях ішемії внаслідок підвищення внутрішньоклітинної концентрації катехоламінів та цАМФ стимулюється утворення активної фосфорилази α й активація фосфофруктокінази – ключових ензимів анаеробних шляхів вуглеводного катаболізму. Проте навіть максимально посилений анаеробний метаболізм не спроможний адекватно й тривалий час забезпечувати ушкоджений гіпоксичний міокард енергією. До того ж накопи-

чення лактату і формування стану метаболічного ацидозу, у свою чергу, впливає на структуру та функції мембран. Зменшується мембранний потенціал, унаслідок дефіциту АТФ пригнічується активність іонного транспортування.

Так, інактивація Na^+ , K^+ -АТФ-ази проявляється збільшенням у кардіоміоцитах вмісту Na^+ і зменшенням K^+ (рис. 3.4).



Рис. 3.4. Патохімічні зрушення в серцевому м'язі при гіпоксії

Зміна проникності мембранних систем Ca -насосу сарколеми й саркоплазматичного ретикулуму призводить до зниження їхньої Ca -акумулюючої здатності й накопичення Ca^{2+} у саркоплазмі кардіоміоцитів. Стан клітинних мембран за таких умов залежить від

активізації мембран-них фосфоліпаз, утворення лізофосфатидів, а також активації меха-нізмів ліпопероксидації.

Ушкодження лізосомальних мембран спричиняє вивільнення гідролаз, які, активізуючись у кислому середовищі, каталізують гідролітичне руйнування протеїнів – ліпопротеїнів (вторинна альтерація). Означені некротичні зміни в клітині супроводжуються виходом у кровоток внутрішньоклітинних ензимів – трансаміназ, фосфатаз, лактатдегідрогеназ, креатинфосфокіназ тощо. У цей же період виявляються зміни фракційного складу протеїнів міокарда – різке зниження міофібрилярних протеїнів та накопичення протеїнів стромі. Порушення обміну вуглеводів, протеїнів та ліпідів можуть виражатися в жировій інфільтрації серцевого м'яза. Накопичення НАД-ФН(H^+) прискорює синтез ліпідів, первинним субстратом яких є як неокиснені вільні жирні кислоти, так і лактат/піруват (через ацетил-КоА).

Отже, дефіцит енергетичних ресурсів і порушення іонного складу, насамперед підвищення рівня внутрішньоклітинного Кальцію, зумовлюють гальмування функціональної активності м'язових клітин та їх поступову загибель. Саме накопичення іонів Кальцію в саркоплазмі кардіоміоцитів становить, за сучасними даними, основну ланку патогенезу різноманітних форм ушкодження серцевого м'яза – від спадкових кардіопатій до недостатності гіпертрофованого серця.

Лабораторна діагностика ішемічної хвороби серця. У переважній більшості випадків біохімічні дослідження є важливим допоміжним методом розпізнавання тих нозологій ІХС, екстрена діагностика яких дозволяє відвернути смерть хворих. Насамперед це стосується лабораторної діагностики інфаркту міокарда (ІМ) – ішемічного некрозу міокарда.

Лабораторні дані в гострому періоді ІМ (ГІМ) відображають резорбційно-некротичний синдром, який розвивається внаслідок резорбції некротичних мас, асептичного запалення та виходу ферментів з міофібрил міокарда.

Найчастіше для діагностики ГІМ визначають активність ензимів АсАТ, ЛДГ, КФК, а також концентрацію міоглобіну в сироватці крові. Перелічені тести характеризуються невисокою

специфічністю, тому для уточнення діагнозу в деяких випадках необхідно визначати активність водночас декількох ферментів. Ще важливішим є дослідження ізоензимів. Так, МВ-фракція креатинфосфокінази визначається лише в серці й не міститься в інших органах. Гіперенземія МВ-КФК є абсолютним доказом ушкодження міокарда. За допомогою дослідження КФК можна визначити величину некрозу міокарда в грам-еквівалентах КФК. Один грам-еквівалент креатинфосфокінази – це така кількість тканини, в якій вміст ензиму відповідає вмісту в 1 г повністю некротизованого міокарда.

Іншим важливим ензимологічним показником є активність ЛДГ₁, зокрема серцевого ізоферменту ЛДГ₁. При гострому ІМ у сироватці крові в першу чергу зростає активність ЛДГ₁, і лише пізніше – загальної ЛДГ. Гіперенземія ЛДГ₁ є не тільки раннім, специфічним, але й чутливим тестом ГІМ. Вторинне підвищення активності органоспецифічних ензимів у крові після періоду нормалізації є свідченням розширення зони інфаркту або ознакою формування серцевої недостатності.

До неферментативних маркерів ІМ належать протеїни гострої фази (С-реактивний протеїн (С-РП), α_1 -глікопротеїд, α_1 -антитрипсин) і міоглобін. За допомогою доступних методів дослідження міоглобін у нормі не виявляється, тому його наявність розцінюється як ознака деструкції міокарда. Ступінь приросту міоглобіну може служити критерієм поширеності некротичного процесу в міокарді, характеризувати динаміку процесу та ефективність терапії.

При ІМ відбуваються зміни в крові, які відображають порушення обміну вуглеводів, протеїнів, ліпідів, кислотно-лужного стану, електролітного балансу, гормонального профілю. Так, у гострій фазі ІМ імовірна гіперглікемія, іноді навіть глюкозурія. У крові зменшується вміст альбумінів, підвищується (удвічі й більше) вміст α_2 -глобулінів, а також γ -глобулінів, фібриногену. На 2–3-тю добу виявляється позитивна реакція на С-РП, зростає вміст серомукоїду. Наведені зміни неспецифічні й не мають принципового значення для діагностики ІМ.

Лабораторна біохімічна діагностика стенокардії – іншої поширеної нозологічної форми ІХС – здійснюється за допомогою біохімічних констеляцій. Необхідно зазначити, що ензимологічні дослідження (АсАТ, ЛДГ, КФК та їх ізоензими) не виявляють будь-яких змін при стенокардії як у момент нападів, так і між ними, що дозволяє диференціювати ІМ зі стенокардією.

Імовірність правильної діагностики інфаркту міокарда зростає, якщо, крім підвищення активності окремих ензимів крові, зважати на зміни їх співвідношення МВ – КФК (загальна КФК зростає від 3 до 40 %, КФК/АсАТ – від 2 до 9,6 %, КФК/ЛДГ – від 0,27 до 1,6 %. Відношення показників активності КФК/АсАТ має високе діагностичне значення при диференційній діагностиці інфаркту міокарда та ураженні скелетних м'язів: відношення КФК/АсАТ близько 27 (13–56) свідчить про ураження скелетної мускулатури, близько 5 (2–9) – про патологію кардіоміоцитів.

При емболії легень, що супроводжується вираженим підвищенням активності АсАТ і АлАТ, активність КФК не збільшується, що може бути використано як диференційно-діагностичний критерій уражень в окремих органах (серці, легенях), що складають кардіореспіраторну систему. Комплекс додаткових біохімічних досліджень при ІХС охоплює насамперед дослідження стану ліпідного обміну. Саме зрушення ліпідного профілю крові (дисліпопротеїнемія), перш за все – підвищення вмісту холестеролу, зумовлює атеросклеротичне ушкодження судин серця та розвиток ішемії.

Важливість гіперліпопротеїнемії як одного з провідних факторів ризику серцево-судинних захворювань сьогодні не викликає сумнівів. За прийнятою нині теорією атерогенезу відоме висловлювання Н. Н. Анічкова «Без холестеролу немає атеросклерозу» набуває нового звучання: «Без атерогенних ліпопротеїнів немає атеросклерозу». Атерогенні ліпопротеїни (ліпопротеїни низької щільності – ЛПНЩ й ліпопротеїни дуже низької щільності – ЛПДНЩ), багаті на холестерол, є тими первинними субстратами, які, надходячи до стінок судин у підвищеній кількості, дають поштовх атеросклеротичним змінам.

Крім холестеролу-інфільтраційної гіпотези атеросклерозу, не менш доведеною є гіпотеза передуючого ушкодження ендотелію, хоча обидві теорії закономірно пов'язані між собою. Саме на ушкоджених ділянках ендотелій стає більш проникним для ЛПНЩ, які відзначаються малим розміром частинок. Важливою особливістю катаболізму атерогенних ЛП, який має місце при атеросклерозі, є їх попередня хімічна модифікація (глікозилювання, пероксидне окиснення, утворення комплексів ЛПНЩ-антитіло, ЛПНЩ-ГАГ тощо). Напружуються всі механізми поглинання ЛПНЩ, які існують в ендотеліальних клітинах: за допомогою апо-В, Е-рецепторів, сквенджер-рецепторів макрофагів та шляхом низькоафінного адсорбційного ендоцитозу. Надходження ЛП до інтими артеріальної стінки відбувається одночасно з міграцією плазмених моноцитів (макрофагів). Саме макрофаги, які за допомогою сквенджер-рецепторів захоплюють і поглинають ЛПНЩ і в такий спосіб збагачуються естерами холестеролу, надалі перетворюються на «пінисті» клітини – які є попередниками атеросклеротичних бляшок. Переважна частина «пінистих» клітин руйнується, ендотеліальні клітини судин перевантажуються холестеролом, етери холестеролу надходять до міжклітинного простору. Ушкодження ендотелію супроводжується міграцією гладком'язових клітин (ГМК) з медії до інтими та їх проліферацією під впливом факторів росту і цитокінів. Джерелами означених біологічно активних речовин є як ендотелій судин, так і моноцити-макрофаги, лімфоцити та тромбоцити. Секреція моноцитами-макрофагами власних цитокінів сприяє переходу через ендотелій модифікованих ЛП. З іншого боку, накопичення в інтимі модифікованих ЛП прискорює міграцію моноцитів. Створюється хибне коло, яке сприяє прогресуванню атеросклеротичного ураження.

Зрушення ліпідного профілю крові вважаються лише одним із вирішальних чинників атерогенезу. Оскільки ендотелій судин є як основним захисним механізмом, так і первинною мішенню при атеросклерозі, існує припущення про безпосередню залежність ендотеліальної дисфункції від гіперхолестеролемії. Насамперед, це стосується зменшення утворення нітрогену оксиду (NO) – ендоте-

ліального фактору релаксації. NO утворюється в ендотелії судин з амінокислоти *L*-аргініну під впливом ферменту NO-синтази, кофактором якої виступає тетрагідробіоптерин. Нітрогену оксид має короткий час напіврозпаду – менше 5 с, що є свідченням його локальної дії. Після утворення в ендотеліальних клітинах молекули NO дифундує до судинних гладком'язових клітин, активізує гуанілатциклазу, що, у свою чергу, посилює утворення цГМФ. Накопичення моонуклеотиду забезпечує релаксацію ГМК судинної стінки. Нітроген оксид справляє також антиадгезивний та антиагрегаційний вплив на тромбоцити. При атеросклеротичному ушкодженні клітин судинної стінки продукування NO зменшується, що спричиняє явища вазокон-стрикції, підвищення адгезії тромбоцитів, лейкоцитів, посилення міграції та проліферації судинних ГМК.

Проліферація ГМК, зумовлена впливом різноманітних клітинних факторів, вважається найбільш показовим проявом розвитку *атеросклеротичної бляшки* (атероми), а потім і фіброатероми. Зріла фіброзна бляшка – фіброатерома – складається з покришки, яка включає ГМК, та фіброзної тканини з ділянками кальцифікації. Ядро такої бляшки складається з «пінистих» клітин та кристалів позаклітинного холестеролу. Вміст етерів холестеролу у фіброзній бляшці в 20–26 разів, а вміст неестерифікованого холестеролу – у 6–7 разів перевищує кількість стеринів неуражених ділянок артерій. Унаслідок випинання бляшки у фатальних випадках спостерігається звуження просвіту однієї з головних коронарних артерій, а частіше двох або всіх трьох до 25 % від початкового діаметра.

При обстеженні хворих з підозрою на атеросклероз характерними є зміни окремих показників: у плазмі крові підвищення загального рівня ліпідів (>7 г/дм³), концентрації вільного ($>2,3$ мМ), естерифікованого ($>3,38$ мМ) і загального холестеролу ($>6,5$ мМ), вмісту триацилгліцеролів (>2 мМ), співвідношення фосфоліпід/холестерол ($<1,5$). Повторне виявлення зазначених відхилень є свідченням високої вірогідності доклінічного (прихованого) періоду атеросклерозу.

Найбільш інформативними показниками лабораторної оцінки вираженості атеросклеротичного процесу вважають ЛПНЩ, ага-льний холестерол (ЗХС), триацилгліцероли (ТАГ) та ЛПВЩ. У клінічних лабораторіях кількість ЛПНЩ найчастіше визначають розрахунковим шляхом за прийнятими формулами.

Незалежним фактором ризику появи атеросклерозу та ІХС є зниження концентрації ЛПВЩ, які виконують функцію зворотного транспортування холестеролу від органів і тканин до печінки, де відбувається його остаточна утилізація. Дослідження, проведені в багатьох країнах світу, показали, що у хворих на ІХС вміст ХС ЛПВЩ нижчий, ніж при відсутності ознак ІХС. Підвищення вмісту ЛПВЩ, навпаки, виконує роль антиризик-фактора. Маркером, який опосередковано визначає ймовірність розвитку атеросклерозу, є так званий *коефіцієнт (індекс) атерогенності – ІА*:

У клініці дуже зручно розраховувати цей коефіцієнт за результатами визначення загального холестеролу і холестеролу ЛПВЩ:

Чим вище значення ІА ($N < 3$), тим вище ризик розвитку ІХС (ІА = 4–6).

Закономірно поєднуються з гіперліпідемією (підвищенням у крові рівня атерогенних ЛП) відхилення від норми показників гемокоагуляції.

Найінформативнішими ознаками є збільшення адгезії тромбоцитів, активності факторів VIII, XI, XII, XIII, толерантності плазми до гепарину, зниження фібринолітичної активності крові.

До неспецифічних ранніх змін при атеросклерозі належать зниження активності окисно-відновлювальних ензимів – каталази, пероксидази, підвищення в крові вмісту сечової кислоти.

Виходячи з наявності запального компонента в патогенезі атеросклерозу визначається підвищення вмісту С-РП, моніторингу якого при означеному захворюванні присвячено зараз багато публікацій.

У лабораторній діагностиці інших поширених захворювань серцево-судинної системи найчастіше використовують комплекси біохімічних тестів (біохімічні констеляції), наведені в табл. 3.5. Результати проведених біохімічних досліджень допомагають лікареві правильно визначитися, насамперед, у диференційній діагнос-

тиці захворювань міокарда різноманітної етіології та патогенезі з ІХС та первинним ревмокардитом.

Таблиця 3.5. – Біохімічні констеляції у лабораторній діагностиці захворювань серцево-судинної системи

Хвороба	Біохімічний тест
Міокардит	Активність ензимів АсАТ, ЛДГ (ЛДГ ₁ і ЛДГ ₂), КФК (МВ-КФК) С-РП Глікопротеїди та їх компоненти (серомукоїд, сіалові кислоти) Загальний протеїн і протеїнові фракції Імунологічні дослідження (IgА та IgG, циркулюючі імунні комплекси, серологічні реакції)
Міокардіо-дистрофія	Загальний протеїн і протеїнові фракції Глікопротеїди (сіалові кислоти, серомукоїд, фібрин) Активність ензимів АсАТ, альдолази, КФК, ЛДГ _{1,2} Відповідний комплекс досліджень залежно від етіотропного фактора
Недостатність кровообігу	Загальний протеїн і протеїнові фракції Показники обміну ліпідів (холестерол, триацилгліцероли, ЛПНГ та ЛПДНГ) Глікопротеїди (сіалові кислоти, серомукоїд, фібрин) Активність АсАТ, альдолази Концентрація Натрію, Калію, хлоридів у крові та сечі
Перикардит	Загальний протеїн і протеїнові фракції Глікопротеїди (сіалові кислоти, серомукоїд, фібрин), С-РП Активність АсАТ, альдолази, КФК, ЛДГ, лужної фосфатази Білірубін

Питання для самоконтролю:

1. Енергетичні процеси у легеневій тканині.
2. Особливості метаболізму протеїнів у легенях.
3. Ліпіди при легеневій патології.
4. Система імунного захисту бронхолегеневого апарату.
5. Патохімія та клінічна біохімія при запальному процесі у легенях.
6. Зрушення окисного метаболізму в серцевому м'язі при ішемії.
7. Значення ензимодіагностики у клінічній кардіології.
8. Значення зрушень обміну ліпідів в атерогенезі.

3.2.4. Біохімічні процеси в організмі тварин при хворобах органів системи травлення, лабораторна діагностика їх порушень

Порушення метаболічних процесів при хворобах шлунково-кишкового тракту та їх діагностика. Використання необхідних для організму поживних речовин та перетворення їх на форму, доступну для засвоєння тканинами, здійснюється травною системою. Завдяки її діяльності компоненти корму підлягають перетравлюванню, тобто таким фізичним, фізико-хімічним та хімічним змінам, які забезпечують перетворення високомолекулярних сполук на низькомолекулярні, що всмоктуються в кров або лімфу. Ці процеси потребують тісної взаємодії ензимів, кофакторів та субстратів і підтримання оптимального рівня рН. Захворювання шлунка, підшлункової залози, печінки та кишечнику можуть призвести до порушень травлення і засвоєння поживних речовин.

До складу системи травлення входять травний канал, підшлункова залоза та печінка.

Порушення процесів травлення і всмоктування може відбуватись, принаймні, з трьох причин:

- 1) у зв'язку з гальмуванням або відсутністю дії ензимів;
- 2) через запальні процеси шлунка й кишечнику;
- 3) з виникненням новоутворень тощо.

Основні процеси *перетравлювання складних вуглеводів* відбуваються в тонкому відділі кишечника, де діють амілаза (на крохмаль і глікоген), мальтаза (на мальтозу), сахараза (на сахарозу) і лактаза (на лактозу). Під дією згаданих ензимів складні вуглеводи гідролізуються до глюкози, фруктози та галактози, які всмоктуються в кров, потрапляють у печінку й метаболізуються до глюкози. Тому процес перетравлювання вуглеводів можна відстежувати за концентрацією глюкози в крові.

При запальних процесах органів травлення (гастрити, гастроентерити, ентерити) або підшлункової залози (панкреатити) порушуються процеси гідролізу полісахаридів внаслідок нестачі або порушення біосинтезу амілази й дисахараз. Це призводить до неповного розщеплення в кишечнику полісахаридів і дисахаридів. Негідролізовані дисахариди потрапляють у товстий кишечник, де зазнають впливу бактеріальної мікрофлори і зброджуються до молочної кислоти. У цих випадках реакція калу стає кислою. Сахароза, крім цього, здатна зв'язувати значну кількість води й утримувати її в кишечнику, посилюючи діарею. Зміни адсорбційних властивостей слизової оболонки тонкого кишечника, які виникають при його запаленнях, призводять до порушення всмоктування моносахаридів у кров. Усе це спричиняє розвиток гіпоглікемії та пов'язане з нею недостатнє забезпечення тканин організму глюкозою.

Порушення обміну протеїнів спостерігається також на етапі їх гідролізу і всмоктування амінокислот. Відомо, що дія ензимів, що гідролізують протеїни, є кооперативною. Це означає, що кожний ензим руйнує пептидні зв'язки між певними амінокислотами поліпептидного ланцюга протеїну. Так, у шлунку пепсин гідролізує пептидні зв'язки, утворені аміногрупами ароматичних амінокислот (фенілаланін, тирозин), а також лейцину й глутамінової кислоти. Унаслідок цього утворюються поліпептиди, які мають у своєму складі від 4 до 8 залишків амінокислот. Подальший їх гідроліз здійснюється трипсином і хімотрипсином у тонкому кишечнику. Дія трипсину спрямована на пептидні зв'язки, утворені карбоксильними групами лужних амінокислот (аргінін, лізин) та аміногрупами інших амінокислот. Хімотрипсин переваж-

но гідролізує пептидні зв'язки, які утворені карбоксильними групами ароматичних амінокислот (тирозин, фенілаланін, триптофан) та аміногрупами інших амінокислот. У перетравлюванні протеїнів у тонкому кишечнику важлива роль належить екзопептидазам (аміно- та карбоксипептидазам) і дипептидазам, які завершують гідролітичне розщеплення протеїнів до амінокислот. Таким чином, білки розпадаються до амінокислот, які всмоктуються в кров.

Якщо дія пепсину гальмується (наприклад, при анацидному гастриті та зменшенні рН), протеїни в шлунку не розщеплюються, а потрапляють у тонкий кишечник і там зазнають неповного гідролізу. Нерозщеплені фрагменти протеїнових молекул посилюють перистальтику кишечника й спричиняють пронос.

Порушення процесів ферментативного гідролізу протеїнів і всмоктування амінокислот у травному каналі призводять до посиленого їх перетворення гнильними мікроорганізмами в товстому кишечнику. У процесі гниття протеїнів утворюються *протеїногенні аміни* (путресцин, кадаверин, тирамін, гістамін) та *отруйні ароматичні сполуки* (фенол, крезол, індол, скатол). У нормі цих сполук в організмі утворюється мало, і вони знешкоджуються в печінці. При надмірному їх утворенні розвивається загальне отруєння організму, що негативно впливає на обмінні процеси.

Порушення обміну ліпідів може спричинитися розладом процесів гідролізу та всмоктування їх у травному тракті. Однією з передумов нормального розщеплення ліпідів і всмоктування продуктів гідролізу є емульгування їх жовчними кислотами, які вкривають жирові краплі, зменшуючи їхній поверхневий натяг. Унаслідок цього великі краплі жиру розпадаються до найдрібніших краплинок. У такий спосіб поверхня контактування жиру з ліпазою значно збільшується. Оскільки ліпаза діє тільки на межі розподілу фаз вода–жир (ліпаза є протеїном, який розчиняється у воді, а жир у ній не розчиняється), гідроліз жирів буде ефективнішим, якщо шар емульсії буде тоншим. Жовчні кислоти виконують також інші функції. Зокрема, вони активізують ліпазу й утворюють розчинні комплекси із жирними кислотами, що

забезпечує гідроліз жирів та всмоктування вищих жирних кислот. Захворювання підшлункової залози і тонкого кишечника можуть спричинити недостатню кількість або зниження активності ліпази, а патологія печінки та жовчного міхура – недостатню кількість жовчних кислот.

При недостатній концентрації жовчних кислот і ліпази гідроліз та всмоктування жирів значно знижуються. При цьому кількість жиру в калі різко зростає (*стеаторея*). Стеаторея досить часто супроводжується сильною діареєю, а організм, окрім поживних речовин, втрачає воду й електроліти.

Значення біохімічних досліджень для діагностики функціональних розладів шлунка неістотне. Біохімічні тести застосовують у тих випадках, коли секреція хлористоводневої кислоти в шлунку завелика або недостатня. Надлишкова секреція соляної кислоти в шлунку є важливим фактором у патогенезі виразки дванадцятипалої кишки (але не шлунка). Визначення секреції кислоти шлунком тепер виконується рідко. Воно може бути корисним, коли треба виключити ахлоргідрію як причину гіпергастринемії, якщо останню виявлено у хворих з виразкою дванадцятипалої кишки.

Підшлункова залоза – це залоза змішаної секреції. Вона є важливим ендокринним органом, який синтезує інсулін, глюкагон, панкреатичний поліпептид та інші гормони. Екзокринний секрет підшлункової залози – це лужний, збагачений бікарбонатами сік з набором різних ензимів, які необхідні для нормального травлення: проензимів протеаз (трипсину, хімотрипсину та карбоксипептидази), ліполітичного ферменту ліпази, коліпази та амілази.

До захворювань, які супроводжують порушення екзокринної функції підшлункової залози, відносять гострий та хронічний панкреатит, карциному підшлункової залози.

Гострий панкреатит – це гостре запальне захворювання, в основі якого лежить набряк підшлункової залози, а при тяжких формах – її некроз, порушення структури. Існує також зв'язок між панкреатитами й запальними захворюваннями печінки.

Обов'язковими дослідженнями при захворюваннях підшлункової залози є: визначення активності α -амілази, ліпази, трипсину

та його інгібіторів, АсАТ, ЛДГ₄, вмісту білірубину, глюкози в крові та активності α -амілази в сечі.

Додаткові дослідження: загальний протеїн та його фракції, С-реактивний протеїн, лужна фосфатаза, електроліти К, Na, Са, інсулін, глюкагон, секретин, активність ДНК-ази. Визначається також присутність протеїну та глюкози в сечі.

α -Амілаза секретується підшлунковою та слинними залозами, тому ензим складається з двох фракцій – панкреатичної та слинної. У сироватці крові вищою є активність слинного ізоензиму, а в сечі – панкреатичного. Активність α -амілази в сироватці крові новонароджених дуже низька. Упродовж першого місяця життя вона зростає до рівня, який характерний для дорослих. Встановлено, що визначення ізоензимів α -амілази (слинного та панкреатичного) є більш інформативним тестом, ніж визначення загальної активності α -амілази. Співвідношення активності слинного та панкреатичного ізоензимів α -амілази в сечі здорової тварини становить 1:2. Підвищення активності амілази в сироватці крові та сечі спостерігається при ушкодженнях слинних та підшлункової залоз. Значна або швидка гіперамілаземія та гіперамілазурія розвиваються при гострому паротиті й гострому панкреатиті. Меншою мірою зростання активності α -амілази реєструється при виразках шлунка, хімостазі, дистрофії печінки, гепатиті, жовчнокам'яній хворобі.

Підвищення активності панкреатичної амілази в сироватці крові відзначається при панкреатитах будь-якого походження, особливо при гострому панкреатиті.

Гіперамілаземію викликають деякі гормони й ряд фармакологічних препаратів: адреналін, гістамін, секретин, фуросемід, саліцилати, антикоагулянти, морфін, пантопон, опій, кодеїн, тетрациклін. Це пояснюється впливом на відтік секрету із залози та стимуляцію його продукції. Введення кортизону або кортикостерону підвищує активність ензиму в декілька разів.

Панкреатична *ліпаза* секретується підшлунковою залозою і у великій кількості виявляється в дуоденальному вмісті. У сироватці крові активність ензиму низька. При гострому панкреатиті актив-

ність ліпази зростає в сотні разів і утримується на цьому рівні довше, ніж амілаза. У сечі активність ліпази відсутня.

Важливим тестом для оцінки стану підшлункової залози є фекальний тест – визначення панкреатичної *еластази*. При панкреатитах її рівень зростає, а чутливість цього методу перевищує 90 %.

Зміни метаболічного статусу організму новонароджених телят при гострих розладах травлення та після клінічного одужання. Новонароджені тварини часто хворіють на шлунково-кишкову патологію як незаразної (диспепсія), так і інфекційної етіології, що значно порушує становлення обмінних процесів в їхньому організмі та зумовлює виникнення розладів структурно-функціонального стану більшості органів і тканин, особливо травної системи. Внаслідок цього функціональна діяльність шлунка, кишечника, печінки та нирок залишається недостатньою впродовж тривалого часу після клінічного одужання тварин, що провокує розвиток рецидивів захворювання на тлі імунодефіцитного стану організму.

Крім того, у тварин з ранньою постнатальною ентеропатологією відмічають суттєві розлади у становленні таких генетично детермінованих природних процесів, як нормалізація кислотно-лужного стану організму, формування колострального імунітету, заміна фетального типу білків крові на дорослий, що негативно відображається на здатності їх організму підтримувати гомеостаз внутрішнього середовища під впливом різних екзо - та ендогенних патологічних чинників.

Природні адаптаційно-приспосувальні механізми (нейро-гуморальні, метаболічна система кислотно-лужного гомеостазу та інші) захищають тварин, які перехворіли на ентеропатологію, від подальшого ускладнення функціонального стану уражених тканин і органів, що забезпечує їх поступову нормалізацію в період реабілітації. Швидкість і якість відновлення порушених функцій органів травлення, печінки та нирок прямо залежить від тривалості дії патогенного фактору, тяжкості перебігу захворювання, умов утримання тварин та ефективності лікувально-профілактичних схем. Поряд із цим, не зважаючи на значний арсенал лікувальних засобів,

які призначаються при захворюванні телят на ентеропат-тологію, терапевтичні схеми виявляються мало ефективними, що призводить до значної загибелі тварин у перші доби життя. Це свідчить про необхідність удосконалення традиційних терапевтичних схем з включенням до них засобів.

У телят з традиційною схемою лікування диспепсії тривалість перебігу захворювання в середньому становить 6–8 діб (до 10 діб). У період видужування відмічаються рецидиви захворювання у 45 % телят. Такі тварини значно відстають за своїм розвитком та продуктивністю (Грищенко В. А., 2006).

Результати лабораторного дослідження біохімічних показників, що характеризують різні види обміну речовин і структурно-функціональний стан уражених органів та тканин за розвитку диспепсії, доповнюють описану клінічну картину (Грищенко В. А., 2006). Так, рівень загального протеїну в плазмі крові телят на 5–8 добу життя відрізняється тенденцією до підвищення у тварин з традиційною схемою лікування на 39 %, залишаючись високим і на 30-ту добу їх життя. Встановлена гіперпротеїнемія має відносний характер і є результатом дегідратації.

Уміст альбуміну знаходився в межах норми. Однак, високе значення гематокритної величини ($55\text{--}58 \text{ дм}^3/\text{дм}^3$) у телят за традиційного лікування на 5–8 добу їх життя свідчать про ймовірність прихованих змін вмісту альбуміну у плазмі крові телят після зникнення клінічних ознак захворювання у зв'язку з розвитком дегідратації.

Після зникнення клінічних ознак захворювання (5–8-ма доба життя) у телят залишається високою активність гепатоспецифічних ензимів: γ -ГТП у 2,8 раза, ЛФ в 1,8 раза. Це підтверджує наявність порушень жовчовидільної функції печінки (*холестази*) та запального процесу в ендотелії жовчних проток і паренхімі печінки. При цьому активність аспартат- і аланінамінотрансфераз у перехворівших телят фактично залишається в межах норми. Тільки у телят при традиційному лікуванні після зникнення клінічних ознак захворювання, активність аспартатамінотрансферази вірогідно вища (в 1,4 раза) за контрольний рівень, що доводить виникнення глибоких струк-

турних змін гепатоцитів (на рівні мітохондрій) під час клінічного прояву захворювання.

Гіпербілірубінемія і вірогідно високий, порівняно з контрольним, рівень прямого білірубину (в 3 рази) у телят, хворих на диспепсію, на 5–8-му добу життя, підтверджує факт порушення жовчовидільної функції печінки в період зникнення клінічних ознак розладів травлення.

Розлади функціонального стану печінки, можливо, є наслідком анатомічно близького розташування та наявності нервових і гуморальних зв'язків між кишечником та печінкою. При шлунково-кишковій патології часто відмічається ураження структури печінки і її функціональні зміни, оскільки, при гострих і хронічних розладах травлення в тканині печінки визначаються дистрофічні зміни гепатоцитів, а у важких випадках – дрібно-, середньо- і великокрапельне жирове переродження.

Водночас, вірогідно високий рівень сечовини (у 2,7 рази) і креатиніну (на 22 %) у тварин при традиційному лікуванні на 5–8-му добу життя, свідчить про деяке напруження в азотовому обміні (азотемію) і можливі розлади структурно-функціонального стану нирок у перехворівших телят. Проте, в телят, які перехворіли на диспепсію, у 25–30-добовому віці за традиційної схеми лікування відсутні істотні зміни у плазмі крові концентрації сечовини та креатиніну порівняно з відповідним контролем.

Патологія органів травного тракту негативно впливає на обмін гемоглобіну. Досліджено, що у телят за традиційного лікування в усі досліджувані періоди життя відмічається вірогідне зниження рівня гемоглобіну, що характеризує стан анемії, яку, згідно даних літератури, класифікують як ферумдефіцитну. Це особливо актуально для раннього постнатального періоду життя тварин, на який припадає розвиток природної гемолітичної анемії, що виникає внаслідок інтенсивної заміни фетального типу гемоглобіну (HbF) на дорослий (HbA). Дисфункція ентероцитів у цих телят порушує транспортування і всмоктування поживних речовин корму, у тому числі й тих, що є факторами гемопоезу (незамінні амінокислоти, Ферум, Купрум, Кобальт, Цинк, вітаміни групи В). Слід зазначити, що іони Феруму входять до складу ферумпорфіринових сполук,

представниками яких є ензими антиоксидантної системи захисту (каталаза, пероксидаза). Тому дефіцит Феруму, який відмічається за цієї патології, сприяє мембранопатологічним змінам за рахунок активації пероксидного окиснення ліпідів, що викликає дезорганізацію метаболічних процесів, які перебігають на мембранах клітин.

Вірогідно високий рівень глюкози (у 2,1 раза) у плазмі крові телят з традиційною схемою лікування на 5–8-му добу життя, може свідчити про адаптаційно-компенсаторні зміни нейро-ендокринної регуляції процесів синтезу та утилізації глюкози в організмі тяжко перехворівших тварин і, можливо, посилення процесів глікогенолізу і глюконеогенезу в їх тканинах. Крім того, концентрація глюкози вірогідно зростає у плазмі крові телят на 25–30-ту добу життя порівняно з 5–8-мою добою життя.

Отже, у телят реабілітаційного періоду за традиційної схеми лікування диспепсії встановлено (Грищенко В. А., 2006) розвиток гіперферментемії гепатоспецифічних ензимів (АсАТ, АлАТ, γ -ГТП, ЛФ), гіпербілірубінемію, ферумдефіцитну анемію та азотемію, що узгоджується з результатами клінічного обстеження цих тварин і проявляється більш тривалим та важким перебігом захворювання (до 10 діб) з повторними рецидивами (45 % тварин). Показники клінічного статусу організму перехворівших на ентеропатологію телят, значна напруженість метаболічних процесів у тканинах та повільний характер їх відновлення, поряд з наявною дисфункцією ентероцитів, гепатоцитів та інших клітин організму, свідчать про необхідність застосування таким тваринам засобів репаративної терапії, у тому числі в період реабілітації. Це може значно прискорити відновлення ушкоджених клітинних мембран і, в цілому, функціонального стану клітин, задіяних у патологічний процес органів та тканин.

Питання для самоконтролю:

1. Лабораторні тести для визначення порушень метаболічних процесів при хворобах шлунково-кишкового тракту.

2. Особливості метаболічної адаптації тварин на ранніх етапах постнатального розвитку в поєднанні з функціональною адаптацією в системі органів травлення.

3. Особливості метаболічного гомеостазу в організмі новонароджених телят під час захворювання на гострі розлади травлення та після клінічного одужання (у відновлювальний період).

4. Описати біохімічні механізми секреції води й електролітів в епітелії тонкого кишечника при гострих розладах травлення в новонароджених телят.

Біохімічні констеляції у лабораторній діагностиці хвороб печінки

Печінка – найбільший орган в організмі людини і тварин. Клітини печінки займають центральне місце в реакціях проміжного метаболізму.

Основна функціонально-структурна одиниця печінки – печінкова часточка. Гепатоцити в ній досягають 80 % клітинного складу (приблизно 300 блн. екземплярів). У гепатоциті відбувається проміжний обмін речовин, синтез жовчних кислот, знешкодження шкідливих речовин тощо, тобто забезпечується виконання основних біохімічних функцій, притаманних цьому органу. Між шарами гепатоцитів розташовані жовчні каналці.

Жовчні каналці переходять у дрібні жовчні протоки, а потім у головну жовчну протоку.

Крім гепатоцитів, печінка містить ретикулоендотеліальні клітини. Вони представлені трьома типами:

1) Купферівськими клітинами. Їхньою функцією є фагоцитоз еритроцитів, часток емульгованого жиру, барвників, колоїдальних часток, холестеролу;

2) ендотеліальними клітинами, що оточують стінки синусоїдів. За певних умов вони можуть підключатися до процесів фагоцитозу шляхом перетворення на Купферівські клітини;

3) клітинами, які накопичують жир. Вони знаходяться в проміжках між гепатоцитами. Їх відмінна особливість – наявність крапельок жиру в цитоплазмі.

Найважливішими функціями печінки є метаболічна, депонуюча, бар'єрна, екскреторна й гомеостатична.

Метаболічна функція. Продукти розщеплення поживних речовин надходять до печінки з травного тракту через ворітну вену. У печінці відбуваються складні процеси обміну протеїнів, амінокислот, ліпідів, вуглеводів, біологічно активних речовин (гормонів, біогенних амінів, вітамінів) та мікроелементів, регуляція водного обміну. Тут відбувається синтез ліпідів, фосфоліпідів, холестеролу, вуглеводів (синтез глюкози, наприклад, – переважно в цьому органі) та протеїнів. У печінці відбувається також катаболізм багатьох органічних речовин, енергія цього процесу запасється у вигляді макроергічних молекул.

Депонуюча функція. Печінка є місцем депонування енергетичних резервів організму (вміст глікогену може досягати 20 % маси печінки) та сполук-попередників; тут також депонується багато мінеральних сполук, макроелементів, серед них Ферум (майже 15 % від сумарного Феруму, який є в організмі), мікроелементи, вітаміни А, D, К, В₁₂ та фолієва кислота.

Екскреторна функція. Зовнішньосекреторна функція печінки пов'язана з тим, що вона є травною залозою. У печінці відбувається синтез жовчних кислот та утворення жовчі. З печінки різні речовини ендо- та екзогенного походження або надходять у жовчні протоки й виводяться в складі жовчі (близько 40 сполук), або потрапляють у кров, а потім виводяться нирками. Деякі хімічні елементи, наприклад, Плутоній, виводяться з організму тільки печінкою.

Жовч – це рідкий секрет клітин печінки, необхідний як для надходження в дванадцятипалу кишку поверхнево активних сполук (жовчних кислот, фосфоліпідів), що є учасниками перетравлення та всмоктування нейтральних жирів, так і для екскреції з організму кінцевих продуктів катаболізму, біомолекул і ксенобіотиків. У жовчі – 98 % води, 2 % сухого залишку. У міхуровій жовчі всіх компонентів у 5–10 разів більше, ніж у печінковій (табл. 3.6). Ра-

зом із жовчю з організму виводиться багато сполук, які утворюються в печінці або циркулюють в крові.

Таблиця 3.6 – Вміст основних біоорганічних сполук у печінковій та міхуровій жовчі, г/дм³

Компоненти жовчі	Печінкова жовч	Міхурова жовч
Протеїни	1,5–2,5	4,5–5,0
Жовчні кислоти	7–14	90–120
Фосфоліпіди	1,0–5,8	30–40
Жирні кислоти	1,6–3,4	20–25
Холестерол	1–2	3–10
Жовчні пігменти (білірубін, білівердин)	0,3–0,6	1,2–1,5

Передусім це жовчні кислоти, а також холестерол, сечовина, сечова кислота, протеїни, ензими, пігменти, муцин, мінеральні речовини, іони Na, K, Ca, Cl, HCO₃⁺.

Найважливіші органічні компоненти жовчі – *жовчні кислоти*. Вони синтезуються в печінці з холестеролу. Нині відомі близько 20 жовчних кислот. Основними серед них вважають холеву, дезоксихолеву та хенодезоксихолеву кислоти. Залежно від місця утворення їх поділять на первинні та вторинні. *Первинні* – холева та хенодезоксихолева – утворюються в печінці, *вторинні* – дезоксихолева та літохолева – синтезуються в кишках за участю ензимів бактеріальної мікрофлори і є похідними від первинних жовчних кислот.

Утворення й виділення жовчі має життєво важливе значення для організму.

Сучасні уявлення про молекулярні механізми жовчоутворення. Жовчоутворення є складним і поліетапним процесом, який здійснюється в паренхімі печінки на основі мем-бранних і внутрішньоклітинних механізмів транслокації, біосинтезу та енергетичного забезпечення.

Утворення каналцевої (первинної) жовчі розглядають як секреторний осмотичний процес, що відбувається за рахунок актив-

ного транспорту через апікальні мембрани гепатоцитів та жовчні каналці органічних речовин (насамперед жовчних кислот) і неорганічних іонів. З часу першого формулювання гіпотези осмотичної фільтрації отримано значну інформацію стосовно механізмів цих процесів, в останнє десятиріччя – на клітинному та молекулярному рівнях. Участь окремих компонентів жовчі в розвитку осмотичного градієнта, рушійної сили для надходження води в каналці обговорюється з позиції даних про наявність у плазматичних мембранах гепатоцитів систем транспорту відповідних речовин. Транспортери плазматичних мембран гепатоцитів переносять також метаболіти токсичних екзогенних та ендогенних речовин.

Утворення жовчі є результатом секреції і екскреції її органічних та неорганічних компонентів гепатоцитами (первинна жовч), фільтрації і реабсорбції води та електролітів холангіоцитами, і проникнення води та електролітів через міжклітинні щільні сполучення. Злагодженою роботою різних транспортних систем синусоїдальних та каналікулярних мембран обумовлюються певні етапи формування жовчі. Внутрішньоклітинні метаболічні процеси забезпечують біосинтез, кон'югацію, гідроксилювання та активний спрямований транспорт основних компонентів жовчі, а також енергетичне забезпечення жовчоутворювальної функції.

Слід зауважити, що при використанні транспортних, особливо Na^+ -залежних систем, є певний елемент конкуренції як між жовчними кислотами, так і з вільними амінокислотами зовнішнього середовища, бо зазначені системи відіграють значну роль у транслокації окремих груп останніх всередину клітини.

Певний внесок в надходження жовчних кислот до клітин печінки роблять мікрофіламенти та мікротубулярна система.

Надходження неорганічних катіонів та аніонів до гепатоцитах забезпечують іонні канали та транспортери: Na^+ -, K^+ -АТФаза, Na^+ -, H^+ -обмін-ник, Na^+ -, HCO_3^- -котранспортер, $\text{HCO}_3^-/\text{Na}^+$ -незалежний транспортер SO_4^{2-} , $\text{Na}^+/\text{K}^+/-2\text{Cl}^-$ -котранспортер та інші.

Впливи жовчних кислот як амфіфільних речовин, призводять до зміни фізико-хімічного стану мембран і функції мембранних транспортерів в гепатоцитах, а при підвищенні їх внутрішньо-

клітинного вмісту можуть бути причиною некротичного чи апоптичного пошкодження, що спричинює холестатичне ураження печінки. Цей патофізіологічний процес супроводжує різні захворювання печінки, є комплексним, зумовленим порушеннями регуляції та експресії мембранних транспортерів, сигнальних шляхів, зміною функції білків цитоскелета, щільних контактів. Хронічний, довготривалий холестаза призводить до розвитку біліарного цирозу через некроз та апоптоз клітин печінки та наступний фіброз. Експериментальні дані та клінічні спостереження свідчать про ефективність при холестатичних ураженнях гідрофільної дигідроксизовчної кислоти – урсодезоксихолевої та її тауринового кон'югата, які значною мірою поліпшують секреторну функцію та структуру печінки, виявляють антиапоптозний ефект.

Органічні сполуки, завдяки різноманітним механізмам активного і пасивного транспорту, проникають крізь каналікулярну мембрану і створюють осмотичний градієнт, що сприяє виходу води та електролітів, по типу пасивної осмотичної фільтрації, з перенхіматозних клітин печінки у каналікулярну жовч. Домінуюча роль у цьому процесі належить жовчним кислотам, а головними рушійними силами, котрі забезпечують їх транслокацію через каналікулярну мембрану є негативний електрохімічний потенціал та АТФ-залежні транспортні механізми.

Жовчні кислоти можуть змінювати секрецію жовчі через сигнальні механізми, які посттранскрипційно модулюють процеси їх транспорту в гепатоцитах: Ca^{2+} , протеїнкіназу С (ПКС), циклічний аденозинмонофосфат (цАМФ), а також мітогенактивовані протеїнкінази. Серед можливих механізмів таких впливів припускають фосфорилування/дефосфорилування транспортних білків, зміни їх вмісту в плазматичних мембранах гепатоцитів через поповнення з інтрацелюлярних пулів, активацію їх везикулярного транспорту та вбудовування в мембрану [179, 195].

У перенесенні через каналікулярну мембрану неорганічних катіонів та аніонів беруть участь АТФ-азні комплекси, обмінники типу АЕ-2 та інші транспортні системи. З обміном неорганічних і органічних катіонів і аніонів тісно пов'язаний рух води, котрий має важливе значення в утворенні жовчі.

У складному процесі жовчоутворення задіяні мембранні, внутрішньоклітинні поліферментні комплекси та мікротубулярна система різних клітин печінки тварин та людини. У регуляції діяльності цих систем нейрогуморальні чинники беруть активну участь як безпосередньо впливаючи на активність ключових ферментів у цих ланках, так і через активацію певних функціональних регуляторних блоків, змінюючи діяльний стан клітини в цілому. Ряд гормонів, взаємодіючи з функціональними елементами ядра клітини, індуюють біосинтез певних білків-ензимів, у тому числі і причетних до жовчоутворення. Отже, в залежності від нейрогуморального статусу організму буде змінюватись функціональний стан печінки і перебіг процесів, пов'язаних із жовчоутворенням та визначаючих якісні і кількісні характеристики жовчі.

Підсумовуючи множинні ефекти безпосередньо жовчних кислот в гепатоцитах, механізми яких лишаються значною мірою гіпотетичними, свідчать, що жовчним кислотам відводиться значна регуляторна роль у процесах утворення каналцевої жовчі. Жовчні кислоти регулюють транспортні процеси в гепатоцитах на рівні транскрипції мембранних транспортних білків, взаємодіючи з ядерними гормональними рецепторами, а також на посттранскрипційному рівні – через активацію клітинних сигнальних шляхів та, як виявилось, безпосередньо при взаємодії з ліпідним матриксом мембран. Нові аспекти регуляції процесів утворення первинної жовчі жовчними кислотами важливі для розробки адекватних підходів при корекції жовчосекреторної функції за умов холеста-тичних уражень печінки. В зв'язку з вищезгаданим, дослідження рівня та співвідношення жовчних кислот у жовчі тварин при певних відхиленнях у роботі шлунково-кишкового тракту є необхідним для оцінки функціонального стану печінки.

Співвідношення органічних компонентів жовчі як критерій зовнішньосекреторної функції печінки. Жовч тварин та людини є продуктом зовнішньосекреторної діяльності печінки. Вона є хімічно складною забарвленою біорідиною, котра містить широкий спектр органічних і неорганічних сполук. Органічні речовини жовчі представлені метаболітами білкового, нуклеотидного, пігментного,

ліпідного та вуглеводного обмінів, низкою специфічних і не специфічних ферментів і цілим рядом гормонів, медіаторів та їх похідних.

Зупиняючись на конкретних складових, необхідно відмітити, що основними компонентами жовчі, котрі значною мірою визначають якісну характеристику цієї біологічної рідини, є жовчні кислоти, пігменти, білки, фосфоліпіди та холестерол.

Роль жовчних кислот в організмі розглядають у двох аспектах – як компоненти жовчі і як поверхневоактивні речовини, що постійно циркулюють в крові, знаходяться в лімфі та тканинах.

При досягненні певної концентрації жовчні кислоти утворюють агрегати – міцели. За рахунок утворення ковалентного та іонного і водневих зв'язків з підключенням гідрофобних взаємодій жовчні кислоти утворюють комплекси, які сприяють розчинності важко розчинних речовин (ХС, ЖК, ТАГ, солі Кальцію). Завдяки таким властивостям жовчні кислоти відіграють вирішальну роль в забезпеченні колоїдостійкості жовчі і протидіють утворенню в жовчних шляхах і міхурі конкрементів.

Жовчні кислоти поряд із іншими поверхневоактивними компонентами жовчі, в т. ч. ФЛ, забезпечують емульгування та солюбілізацію ХС і жирів у кишечнику та полегшують їх всмоктування. Утворення комплексних сполук ЖК та жовчних кислот сприяє всмоктуванню іонів Кальцію. За відсутності жовчних кислот порушується всмоктування жиророзчинних вітамінів – А, Д, Е, К. Жовчні кислоти беруть участь в регуляції моторно-евакуаторної функції шлунково-кишкового тракту.

Для фізіологічних процесів є важливою взаємодія жовчних кислот із молекулами білків та ліпідів – основними компонентами мембран клітин. Під впливом цих сполук змінюється активність ферментів як на поверхні слизової оболонки, так і в порожнині кишечника. Встановлено, що жовчні кислоти є інгібіторами пепсину. Вони активують ензими панкреатичного соку (трипсин, амілаза, ліпаза) та стимулюють секреторну функцію підшлункової залози.

Жовчні кислоти змінюють процеси мембранного транспорту, стан клітинного метаболізму та активність мембранних ферментів. Виявлено вплив цих сполук на процеси кровотворення, дихання, на

діяльність залоз внутрішньої секреції, а також на функціональний стан збудливих структур ЦНС.

Слід зауважити, що в організмі тварин та людини жовчні кислоти переважно (95–98 %) зосереджені в органах системи травлення, циркулюючи в гепатоентеральному кругообороті. Вміст жовчних кислот у жовчі тварин та людини коливається в широкому інтервалі від 600 до 6500 мг%.

Для формування стабілізуючих колоїдних комплексів жовчі, забезпечення процесів всмоктування ліпідних компонентів із кишечника та здійснення ентоерогепатичного круговороту речовин необхідна тісна взаємодія жовчних кислот, ХС і ФЛ. Жовчні кислоти активують синтез лецитину, котрий становить 90 % всіх ФЛ жовчі у людей та 95,8 % у собак.

У жовчі тварин та людини в значних кількостях присутні ВЖК. Так, у жовчі із жовчного міхура людини загальний їх вміст становить 70–451 мг%, тоді як у печінковій – лише 25–146 мг%. Найбільшою часткою в жовчі людей представлені пальмітинова, олеїнова та ліноленова кислоти.

Вміст білків у печінковій жовчі людей становить біля 0,7 г/дм³, а в міхуровій – 2,6 г/дм³. У жовчі собак найбільший вміст муцину (3–4 мг/см³), ніж інших білків.

У жовчі тварин та людини виявляється ціла низка білків-ензимів різного походження. Із ензимів плазматичних мембран гепатоцитів у жовчі присутні: 5-нуклеотидаза, лужна фосфатаза, лужна фосфодіестераза, альфа-лейцин-бета-нафтиламіназа, Mg-АТФаза. До лізосомальних ензимів у жовчі відносять бета-глюкуронідазу, бета-галактозидазу, N-ацетил-бета-глюкуронідазу, кислу фосфатазу та арилсульфатазу. В жовчі ссавців є деякі ензими, котрі синтезуються в клітинах інших органів. До таких відноситься панкреатична амілаза, котра виявлена в жовчі собак і щурів. Фізіологічна роль більшості білків жовчі дотепер залишається нез'ясованою.

Щодо походження вільних амінокислот жовчі думки різних авторів явно протилежні. Одні вважають їх похідними з плазми крові та експериментальні дані інших авторів свідчать про суттєві відмінності у співвідношенні цих метаболітів у зазначених біорі-

динах. Специфічність співвідношення амінокислот у жовчі пов'язана частково з сечовиноутворювальною функцією печінки.

Недавно на канілікулярних мембранах гепатоцитів виявлена транспорт-на система, котра забезпечує вихід компонентів аденілової системи з клітини в позаклітинний простір, у т. ч. і у жовч. Концентрації АТФ, АДФ, АМФ у жовчі людей значні і у відношенні до рівня їх в плазмі крові становлять 40–60 %.

Дані наукової літератури свідчать, що жовч ссавців дуже багата на органічні речовини, котрі одночасно є метаболітами різних ланок обміну речовин в організмі тварин та людини. Їх призначення в цій біологічній рідині недостатньо з'ясоване. Значна увага приділялася жовчним кислотам і менша – іншим органічним складовим жовчі. Сучасні дослідження показують, що для нормального жовчоутворення в печінці тварин та людини необхідне певне співвідношення не лише жовчних кислот, а й обов'язкова присутність, іноді в невеликій кількості, певних спеціалізованих білків, пігментів, окремих фракцій ліпідів та інших складових жовчі.

Детоксикаційна та бар'єрна функції. У печінці відбувається знешкодження (біохімічна трансформація) чужорідних і токсичних сполук, які потрапили з кормом або утворилися в кишечнику, а також токсичних сполук екзогенного походження й токсичних продуктів метаболізму:

- знешкодження нормальних метаболітів (білірубін у та аміаку);
- інактивація гормонів;
- знешкодження чужорідних сполук (ксенобіотиків);
- знешкодження продуктів гниття амінокислот;
- метаболізм лікарських речовин.

Детоксикація реалізується шляхом хімічної модифікації сполук, яка включає дві групи перетворень:

1. Окиснення, відновлення або гідроліз з утворенням чи звільненням груп -ОН, -СООН, -SH, -NH₂ та ін.;
2. Приєднання до цих груп глюкуронової або сульфатної кислоти, гліцину, глутаміну або ацетильного залишку (*кон'югація*).

Реакції першої групи забезпечуються гідроксилазами (монооксигеназами) мікросом. З реакцій кон'югації переважає приєднання глюкуронової кислоти. Процес каталізує *глюкуронілтрансфераза* – інтегральний білок ендоплазматичного ретикулуму; постачальником глюкуронату є УДФ-глюкуронат.

У реакціях кон'югації з сульфатною кислотою постачальником є 3-фосфоаденозин-3-фосфосульфат (ФАФС). Постачальник ацетилю в реакціях кон'югації – ацетил-КоА. Глутамін та гліцин утворюють кон'югати зі сполуками, активованими ацетил-КоА шляхом його заміщення. Усі розглянуті перетворення зводяться до підвищення гідрофільності знешкоджуваного продукту, що полегшує його виведення з організму.

Гомеостатична функція. Печінка виконує важливі функції підтримання сталого складу крові (гомеостазу), вона поглинає, трансформує та екскретує багато компонентів плазми крові.

Біохімічна трансформація. Стероїдні гормони та білірубін, а також лікарські сполуки, етанол та інші ксенобіотики потрапляють до печінки, де вони інактивуються і перетворюються на високополярні сполуки.

Обмін речовин у печінці та клініко-біохімічні показники, що характеризують його порушення. Печінка бере участь у метаболізмі майже всіх класів речовин.

Метаболізм вуглеводів. Відомо, що вуглеводи корму, що потрапили в кишечник, перетравлюються там під дією амілолітичних ензимів до моносахаридів. Глюкоза, фруктоза й галактоза надходять у печінку з плазмою крові і перетворюються на глюкозо-6-фосфат, який є активованою формою глюкози. Напрямо його використання залежить від активності ензиматичних систем клітини: розпад за гліколітичним шляхом дає енергію, за пентозофосфатним шунтом – субстрати для анаболічних реакцій. За участю ензиму глюкозо-6-фосфатази утворюється вільна глюкоза, що надходить у кров. Глюкозо-6-фосфатаза найбільш активна в печінці, клітинах епітелію ниркових каналців і тонкого кишечника. Із глюкозо-6-фосфату синтезується резервний полісахарид глікоген. Надлишок глюкозо-6-фосфату, який не був використаний для утворення глюкози крові та глікогену печінки,

розщеплюється шляхом гліколізу до піровиноградної кислоти й далі – до ацетил-КоА і CO_2 , які необхідні для синтезу жирних кислот.

Печінка також забезпечує сталий рівень глюкози в крові. Якщо рівень глюкози знижується, то вона починає постачати глюкозу за рахунок мобілізації глікогену. Якщо запас глікогену вичерпується, глюкоза може синтезуватися в процесі глюконеогенезу з таких попередників, як лактат, піруват, гліцерол чи амінокислоти. Тільки в печінці відбувається перетворення галактози, фруктози та лактату на глюкозу.

Дослідження концентрації глюкози в крові не має суттєвого значення для діагностики патології печінки, тому що цей орган має значні функціональні резерви для підтримання рівня глюкози в крові. Існують так звані «печінкові проби», зокрема проби з навантаженням фруктозою, галактозою і лактозою. За їх допомогою з невеликим ступенем імовірності можна судити про функціональний стан органу, їх застосовують для діагностики гепатитів, пухлин печінки, прогресуючих цирозів. Підвищення рівнів глікозаміногліканів, сіаловмісних глікопротеїдів, вільного оксипроліну в крові та сечі (як показників активності сполучної тканини) супроводжує хронічні ушкодження печінки. Виявлення порушень у системі синтезу та розпаду колагену має значення в діагностуванні хронічного вірусного гепатиту і цирозу. Визначення у крові концентрації лактату й пірувату має значення для оцінки гіпоксичного стану, який супроводжує захворювання печінки.

Метаболізм ліпідів. У печінці зосереджені майже всі шляхи метаболізму ліпідів. Важливим біосинтетичним шляхом є утворення жирних кислот і жирів (ліпогенез). Жирні кислоти синтезуються в ній з ацетатних блоків, джерелом яких можуть бути глюкоза і амінокислоти, не використані для інших цілей. Водночас жирні кислоти надходять у печінку з крові. Тут жирні кислоти включаються до складу жирів, фосfolіпідів, які потрапляють у кров у формі ліпопротеїнів дуже низької щільності (ЛПДНЦ). У печінці може зберігатися тільки обмежена кількість жирів (менше 1 % маси органа), а їх надлишок виводиться в кров у складі ЛПДНЦ. Швидкість секреції печінкою ЛПДНЦ відповідна швидкості їх споживання периферійними тканинами. За добу печінка

виділяє в кров близько 20–50 г жиру. Порушення виведення жирів із печінки в складі ліпопротеїнів є однією з причин жирового переродження печінки.

Для енергозабезпечення організму велике значення має здатність печінки перетворювати жирні кислоти в кетоніві тіла, які потім знов повертаються в кров. Кетоніві тіла в мозку та периферійних тканинах потрібні як джерела енергії, але печінка не використовує їх для власних потреб, як енергетичний матеріал.

У печінці відбувається синтез холестеролу з ацетатних блоків, синтезується близько 80 % холестеролу організму. Потім холестерол у складі ЛПДНЩ транспортується кров'ю. Надлишок холестеролу перетворюється на жовчні кислоти або виводиться з організму із жовчю. Виведення жовчних кислот із жовчю – це основний шлях виведення холестеролу з організму. З холестеролу також синтезуються статеві гормони, гормони надниркової залози та деяка кількість вітаміну D.

Показники ліпідного обміну для оцінки стану печінки також мало інформативні. Рівень холестеролу в крові змінюється незакономірно. Зростання його вмісту може спостерігатися при обтураційній жовтяниці та холестазі, а зниження – при гемолітичній жовтяниці, гострому гепатиті, особливо тяжких формах, при гострій печінковій недостатності та цирозі. Зменшення вмісту ліпопротеїнів високої щільності (ЛПВЩ) спостерігається при гострих гепатитах, цирозах печінки та застійних жовтяницях. В останньому випадку воно настільки різке, що може спричинити повне зникнення фракції ЛПВЩ. Підвищення рівня ЛПВЩ трапляється при хронічному гепатиті.

Збільшення рівня ЛПДНЩ та ЛПНЩ характерне при інтрагепатальному застої жовчі, механічній жовтяниці, гострих гепатитах. Визначення вмісту ЛПДНЩ та ЛПНЩ (проба Бурштейна) має значення не лише при гіперліпідемічних станах, але і як функціональна печінкова проба. При зіставленні з тимоловою пробю цей показник особливо важливий, незважаючи на його неспецифічність. *Тимолова проба* (див. нижче про метаболізм протеїнів) чутливіша до ушкоджень паренхіми печінки на початковій стадії, а *проба Бурштейна* – на кінцевій стадії гострого гепатиту. Особливе

значення має *ліпопротеїнова проба* для оцінки стану печінки. У сполученні з тимоловою пробою вона має велике значення для диференціювання механічної жовтяниці та паренхіматозної. При паренхіматозній жовтяниці обидві проби позитивні (або тимолова проба позитивна, а проба на ліпопротеїни негативна), при механічній жовтяниці тимолова проба негативна (якщо немає вторинного гепатиту), а проба Бурштейна – різко позитивна. Визначення вмісту загальних ліпідів, триацигліцеридів, фосфоліпідів дає мало інформації.

Метаболізм амінокислот та протеїнів. У клітинах печінки на відміну від інших органів є повний спектр ензимів – учасників амінокислотного обміну. Рівень амінокислот у плазмі крові регулюється печінкою. Надлишок амінокислот розщеплюється, аміак зв'язується в циклі сечовини, сечовина переноситься до нирок. Ензим аргіназа, який каталізує заключну реакцію циклу утворення сечовини, знаходиться тільки в цитоплазмі гепатоцитів. Амінокислоти включаються в проміжний метаболізм як основа для синтезу глюкози (глюконеогенез) або як джерело енергії. Крім цього, у печінці відбуваються синтез та розщеплення багатьох білків плазми. Печінка – єдине місце, де відбувається синтез альбумінів, фібриногену, протромбіну, α -глобулінів, більшої частини β -глобулінів, гепарину та ензимів. Тільки γ -глобуліни продукуються не гепатоцитами, а системою макрофагів (клітини Купфера). Проте більшість γ -глобулінів утворюється в клітинах імунної системи. У печінці утворюються комплекси протеїнів з ліпідами та вуглеводами. У ній також синтезується холін – структурний компонент фосфоліпідів, один із ланцюгів, який зв'язує обмін протеїнів та ліпідів; завершується синтез креатину – амінокислоти, яка за безпечує енергією процес скорочення м'язів. Протеїни печінки відновлюються упродовж 7 діб, а у всьому організмі – 17 діб, що демонструє активність метаболізму в гепатоцитах.

Визначення загального протеїну не дуже інформативне. Але цей показник потрібен для визначення кількісного складу протеїнових фракцій. Розрізняють кілька видів протеїнограм, що характерні для різних захворювань печінки.

1. Протеїнограма характерна для гепатитів і наслідків токсичного ушкодження печінки. Це помірне зменшення вмісту альбумінів (через зниження протеосинтетичної функції гепатоцитів), збільшення рівня γ -глобулінів (завдяки «подразненню» системи фагоцитуючих мононуклеарів та посиленому продукуванню IgG, IgA, IgM) і збільшення вмісту β -глобулінів.

2. Протеїнограма характерна для цирозу печінки. Відрізняється значним зниженням вмісту альбумінів, α_2 -глобулінів (через глибокі дистрофічні зміни гепатоцитів, які призводять до порушення біосинтезу протеїнів цієї фракції) при значному підвищенні (компенсаторному) рівня γ -глобулінової фракції (за рахунок IgG). Пляма γ -глобулінів, яка є на матеріалі носія – хроматографічному папері тощо, – нерідко зливається зі смужкою β -глобулінів, особливо при атрофічному цирозі; рівень α_1 -глобулінів звичайно не змінюється.

3. Протеїнограма характерна для обтураційної жовтяниці. Показує зменшення рівня альбумінів та помірне збільшення вмісту α_2 -, β - й γ -глобулінів, коли жовтяниця виникає через наявність каменя в жовчній протоці, закупорення його раковою пухлиною, злоякісним новоутворенням у головці підшлункової залози (що створює механічну перешкоду відтокові жовчі при синдромі холестазу).

Досить інформативними є осадові проби (проби колоїдостійкості): проба або стрічка Вельтмана, тимолова та цинк-сульфатна проби.

Зсув стрічки Вельтмана вправо спостерігається при вірусному гепатиті, цирозі, гострій атрофії печінки, а вліво – при гострому запаленні, ревматоїдному артриті, злоякісних новоутвореннях. Тимолова проба привертає увагу як один з надійних тестів для оцінки функціонального стану печінки. Завдяки їй удається діагностувати «синдром запалення», який супроводжує багато уражень паренхіми печінки. Вона позитивна в 90–100 % випадків токсичного, інфекційного гепатиту, що дуже важливо ще в переджовтяничній стадії захворювання та безжовтяничній його формі. При механічній (обтураційній, застійній, холестатичній) жовтяниці ця проба негативна (близько 75 %). На цьому базується викорис-

тання тесту для диференційної діагностики жовтяниць. Важливо зазначити, що у хворих, які перенесли інфекційний гепатит, показники тимолової проби залишаються підвищеними протягом 6 місяців. Клініко-діагностичне значення *цинк-сульфат-ної проби* загалом співпадає з характеристикою тимолової проби.

Сечовина визначається для виявлення дуже високого ступеня ураження печінки, коли концентрація цього метаболіту знижується. Визначення *аміаку* також має значення лише при тяжких ураженнях паренхіми печінки.

Метаболізм пігментів. *Білірубін* – важливий пігмент організму, що утворюється з гемоглобіну. Утворення, виділення та кон'югація білірубіну з глюкуроновою кислотою є специфічними функціями печінки. Утворення білірубіну відбувається як у печінці, так і поза нею, у клітинах ретикулоендотеліальної системи. Спочатку утворюється так званий *вільний білірубін*, що погано розчиняється у воді та циркулює в комплексі з білками. Тому він не дає прямої реакції Ван-ден-Берга з реактивом Ерліха. Для визначення вільного білірубіну сироватку спочатку треба обробити кофеїновим реактивом або спиртом (тому виникла назва «*непрямий*» білірубін). Вільний білірубін не проходить крізь нирковий фільтр. Ця сполука дуже токсична, особливо для мозку. Печінка – центральний орган, який її знешкоджує. Детоксикація вільного білірубіну здійснюється в клітинах печінки шляхом кон'югації з глюкуроновою кислотою та утворенням *білірубін-глюкуроніду*. У нормі вільний білірубін із печінкових капілярів легко проникає в гепатоцити, де за участі ензиму глюкуронілтрансферази при взаємодії з активованою глюкуроновою кислотою (УДФГК) перетворюється на білірубінглюкуроніди. *Глюкуронід білірубіну* (зв'язаний білірубін) добре розчиняється у воді, нетоксичний, виділяється з жовчю в кишечник. З реактивом Ерліха він дає пряму реакцію без попередньої обробки кофеїновим реактивом або спиртом і називається «*прямим*» білірубіном.

У крові визначається передусім «непрямий» (вільний) білірубін (75 % загального білірубіну). Загальний вміст білірубіну коливається від 8,55 до 20 мкМ; вміст «непрямого» білірубіну сягає 17 мкМ, «прямого» (білірубінглюкуроніду) – 2,5 мкМ.

У складі жовчі білірубін (переважно у вигляді глюкуронідів) потрапляє до кишечника, де відновлюється до *стеркобіліногену*, частина якого в товстому кишечнику перетворюється на *стеркобілін* – пігмент калу. За добу з організму виводиться 50–300 мг стеркобіліну. Значна частина стеркобіліну з кишечника всмоктується в кров і потрапляє в нирки, де перетворюється на інший пігмент – *уробіліноген*. З останнього утворюється *уробілін* – пігмент сечі. За добу з організму виводиться із сечею майже 4 мг уробіліну. Деякі дослідники вважають, що в сечу потрапляє стеркобіліноген. Виходить, що метаболізм пігментів крові, жовчі, сечі та калу взаємозв'язаний. У здорової тварини безупинно працює система перетворення «непрямого» білірубину на «прямий», що потрапляє в жовч. Як результат – «прямий» білірубін практично не визначається в межах чутливості методу, а вміст «непрямого» білірубину не перевищує нормальної величини.

Патологія пігментного обміну, яка безпосередньо пов'язана з порушеннями функцій печінкових клітин, може бути обумовлена трьома причинами:

- 1) порушенням надходження «вільного» білірубину з кровоносних капілярів до гепатоцитів;
- 2) порушенням утворення білірубінглюкуроніду з «вільного» білірубину (порушення кон'югації внаслідок зниження активності глюкуронілтрансферази);
- 3) порушення екскреції «прямого» білірубину (глюкуронідів білірубину) з гепатоцитів у жовчні капіляри.

Якщо жовчних пігментів надлишок у крові та інших рідинах організму внаслідок їх надмірного утворення чи недостатнього виведення з організму, вони інтенсивно забарвлюють шкіру. Такий стан називається *жовтяницею*.

Жовтяниця – то не окрема хвороба, а синдром різних патологічних станів, здебільшого печінки. Жовтяниця з'являється, коли концентрація білірубину в крові сягає 35–50 мкМ і вище (за різними джерелами). Якщо вміст білірубину перевищує 340 мкМ, надходження його до головного мозку може спричинити значне ураження (*білірубінову енцефалопатію*), що проявляється неадекватною поведінкою, поступовою втратою свідомості, явищами гострої інтокси-

кації. Це так звана *печінкова кома*. Визначення концентрації жовчних пігментів у крові й сечі має важливе значення для диференційної діагностики жовтяниць різного походження (табл. 3.7).

Таблиця 3.7. – Клініко-біохімічна характеристика жовтяниць

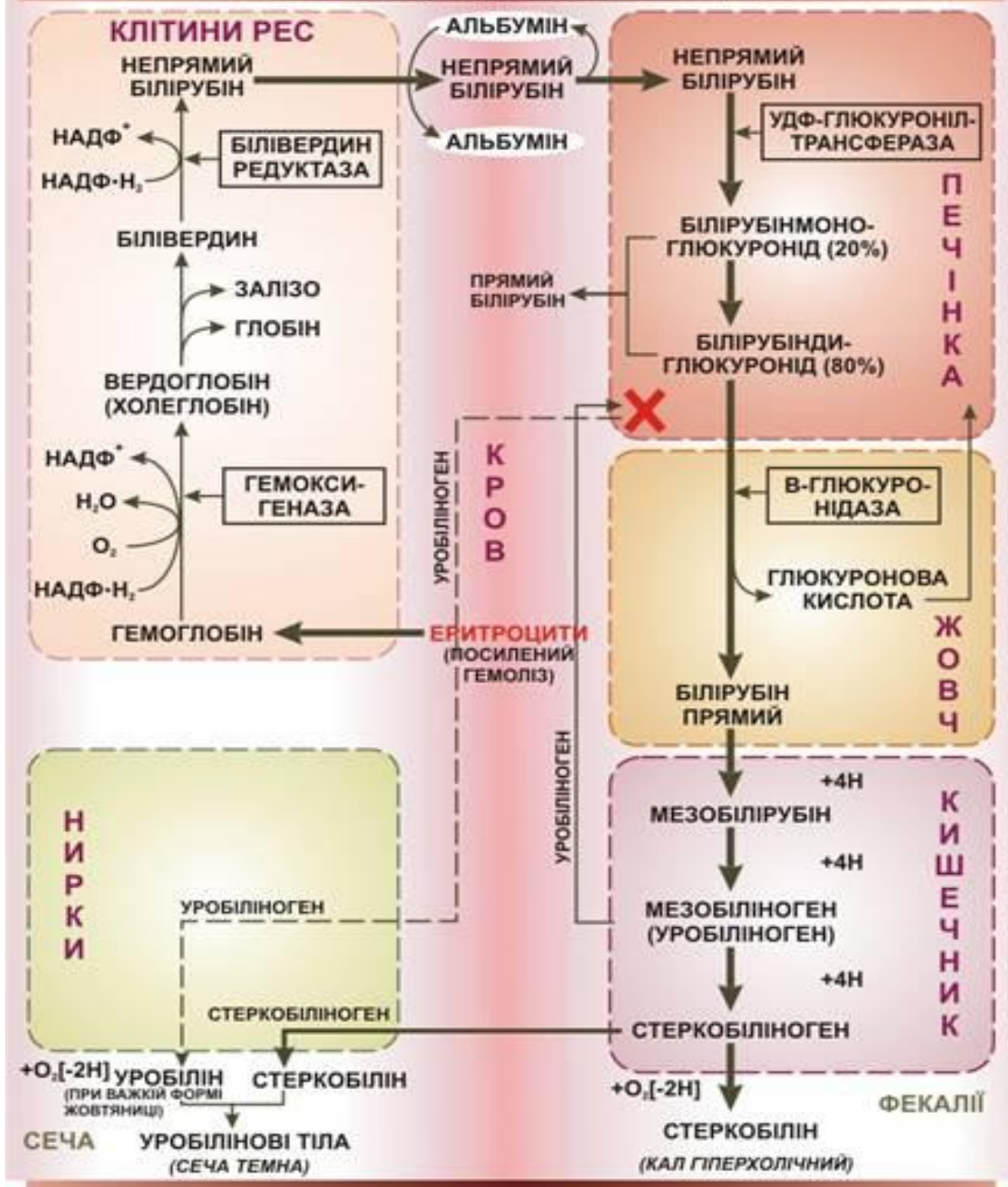
Показник	Вид жовтяниці		
	механічна	паренхіматозна	гемолітична
Вільний білірубін крові	немає змін	незначно підвищений	різко підвищений
Зв'язаний білірубін крові	різко підвищений	значно підвищений	незначно підвищений
Білірубін сечі	значно підвищений	незначно підвищений	не змінюється
Уробілін сечі	не змінюється або знижений	значно підвищений	різко підвищений
Стеркобілін калу	знижений	знижений або не змінюється	різко підвищений

Розрізняють такі форми жовтяниць:

1. Гемолітична жовтяниця, або посилений розпад еритроцитів (гемоліз).

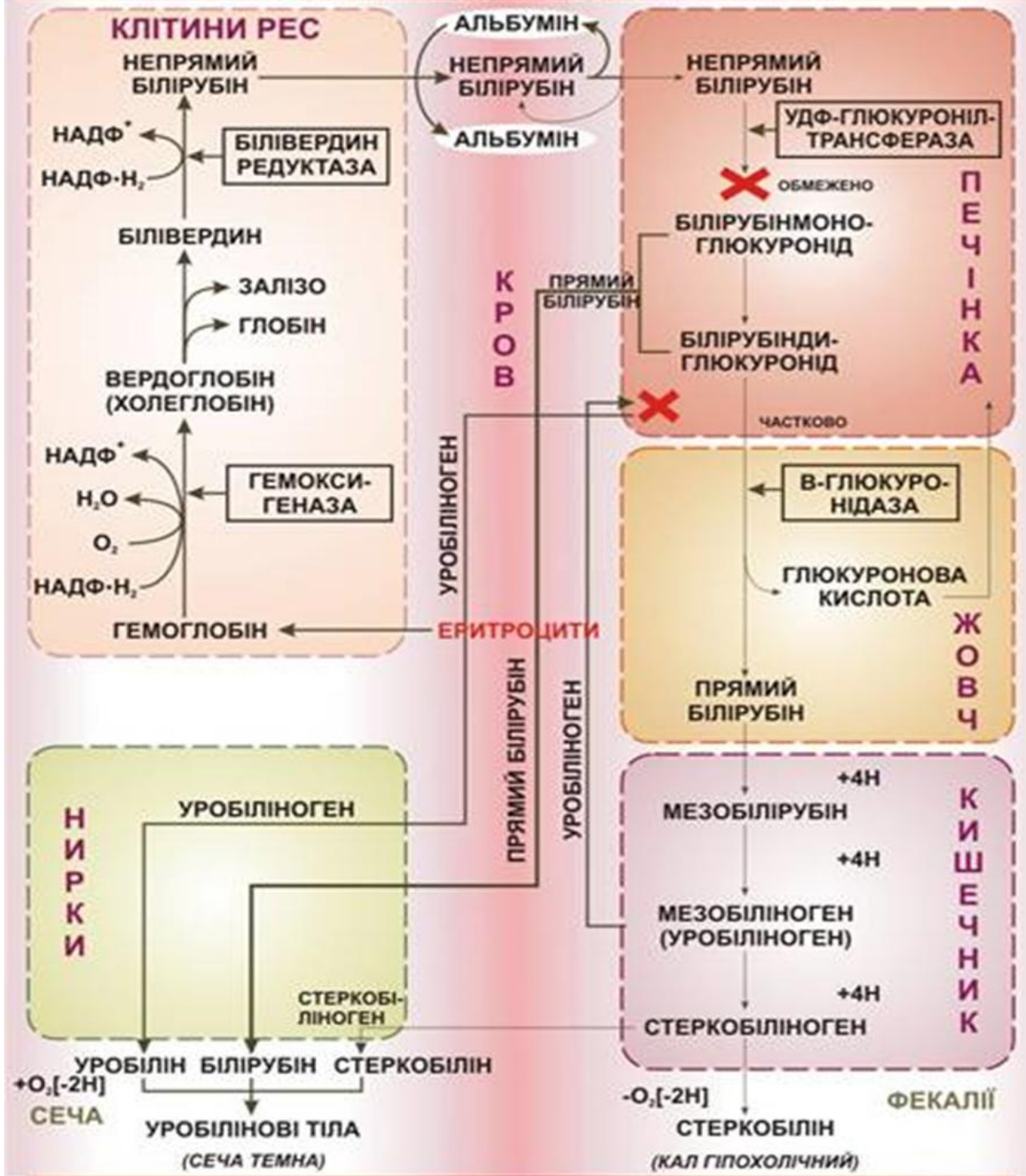
При гемолізі утворюється й потрапляє до печінкових клітин багато «непрямого», вільного білірубину, який не встигає повністю перетворитися на «прямий» (глюкуроніди білірубину). Надлишок білірубину залишається в крові, гіпербілірубінемія розвивається за рахунок «непрямого» (вільного) білірубину. У сечі білірубін відсутній, але різко зростає уробілін. У калі зростає вміст стеркобіліну.

ОБМІН ЖОВЧНИХ ПІГМЕНТІВ ПРИ ГЕМОЛІТИЧНІЙ (НАДПЕЧІНКОВІЙ) ЖОВТЯНИЦІ



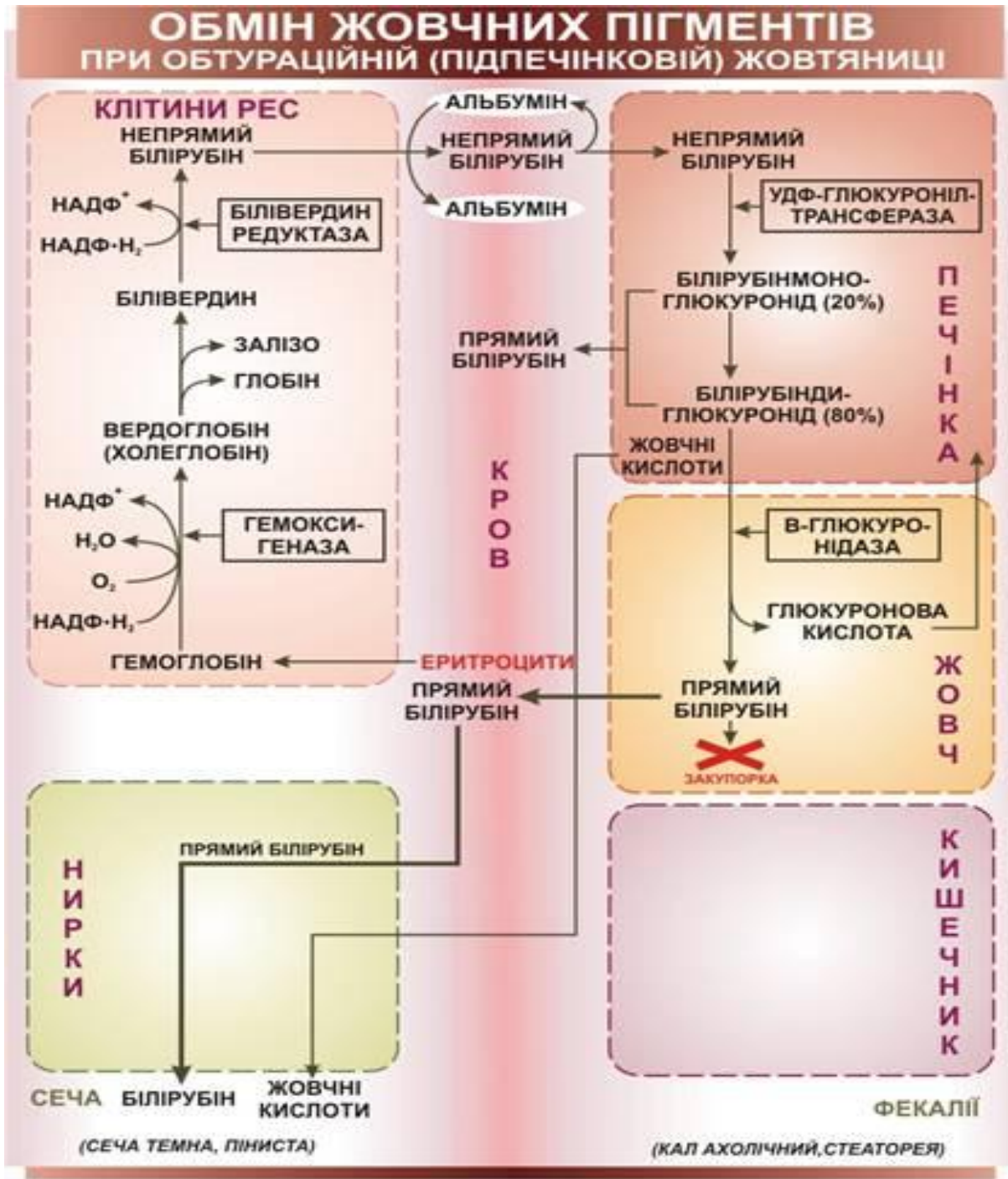
2. *Паренхіматозна (печінково-клітинна) жовтяниця* розвивається при ушкодженні гепатоцитів (вірусна та ін. форми гепатитів, цирози). Унаслідок підвищеної проникності плазматичних мембран у кров потрапляють «прямий» та «непрямий» білірубін, тому розвивається *змішана гіпербілірубінемія*.

ОБМІН ЖОВЧНИХ ПІГМЕНТІВ ПРИ ПЕЧІНКОВІЙ ЖОВТЯНИЦІ



У сечі відзначається значний вміст білі-рубіну, у тяжких випадках відсутній уробілін. Вміст стеркобіліну в калі різко зменшується, і він знебарвлюється.

3. Механічна жовтяниця (підпечінкова)



Розвивається в результаті застою жовчі, коли відбувається розтягнення жовчних капілярів і зростає їх проникність. «Прямий» білірубін, який не має відтоку в жовч, потрапляє в кров, гіпербілірубінемія розвивається за рахунок саме глюкуронидів білірубіну.

У тяжких випадках унаслідок переповнення гепатоцитів білірубін, кон'югація його з глюкуроною кислотою може порушуватися, у крові з'являється і «вільний» білірубін. Падає вміст стеркобіліну в калі, він знебарвлюється (*ахолічний кал*).

Порушення процесу жовчоутворення. Жовчнокам'яна хвороба

Жовчні кислоти забезпечують колоїдну стабільність холестеролу в жовчі. Секреція жовчі та її фізико-хімічні властивості часто порушуються через патологічні зсуви в гормональній регуляції холестерол-фосфоліпідного механізму. Як відомо, холестерол виділяється в жовч разом із жовчними кислотами, жовчними пігментами та фосфоліпідами у вигляді макромолекулярного комплексу, або *жовчної міцели*. Співвідношення цих чотирьох компонентів міцели в нормі досить стале і забезпечує розчинність важкорозчинних компонентів.

Порушення балансу концентрації компонентів у міцелі призводить до зниження колоїдної стабільності жовчі та формування каменів, які складаються на 80 % з холестеролу і на 20 % з кальцію білірубінату. Запальні й дистрофічні зміни паренхіми печінки при багатьох гострих та хронічних захворюваннях також можуть спричиняти значні порушення секреції жовчі, що посилюються ураженням дрібних жовчних ходів, холестазом і утворенням жовчних тромбів. Якщо формування каменів обумовлене холестазом, вони містять 90–95 % холестеролу, а якщо вони утворюються внаслідок інфекції, то переважно складаються з білірубінату кальцію. Панує думка, що при кишкових інфекціях активізується β -глюкуронідаза мікрофлори, яка розщеплює білірубін-глюкуронідний комплекс, унаслідок чого відновлюється «вільний» білірубін, який стає основою утворення каменів у вигляді білірубінату кальцію.

При розвитку холестазу, закупорюванні та ураженні позапечінкових жовчних протоків у сироватці крові зростає активність лужної фосфатази (ЛФ), 5-нуклеотидази, а внутрішньопечінкових – γ -глутамілтранспептидази (γ -ГТП).

У клінічній біохімії печінковий ізоензим ЛФ є маркером холестазу. Це пов'язано з підвищеним синтезом ЛФ клітинами жовчних проток і порушенням виділення ензиму в жовч.

Особливо високою стає гіперензимемія при розвитку патологічного процесу і стазу жовчі в позапечінкових жовчних протоках. При такій патології активність ензиму в сироватці крові зростає в десятки разів, а при ушкодженні внутрішньопечінкових жовчних шляхів та інтрагепатитному холестазі активність ЛФ у крові зростає лише в 2–3 рази. γ -ГТП має найвищу активність у клітинах, які формують жовчні протоки. Гіперензимемія є раннім надійним тестом інтрагепатитного стазу жовчі, ушкодження канікулярних мембран гепатоцитів навколо біліарного полюса та епітеліальних клітин, які покривають просвіти жовчних проток.

Отже, γ -ГТП є найчутливішим тестом порушення жовчовиділення в печінці, який не лише діагностує, а й попереджає про початок ураження, прогнозує його глибину. Отже, якщо розвивається механічна жовтяниця, то розглянутий комплекс ензимів може давати більшу інформацію про патологічний процес, ніж кон'югований білірубін, оскільки перший вказує на локалізацію ураження.

Ензими печінки та їх роль у діагностиці захворювань

У цитоплазмі та органелах печінкових клітин знаходиться понад тисяча різних ензимів. Розміщення їх у субклітинних утвореннях допомагає визначити ступінь деструкції органа без застосування морфологічних досліджень тканин. Так, у цитоплазмі паренхіматозних клітин (гепатоцитів) локалізується *аланінамінотрансфераза (АлАТ)*, в мітохондріях – *сукцинатдегідрогеназа (СДГ)*, ізоензим *аспартатамінотрансферази (АсАТ)*, у рибосомах – *холінестераза (ХЕ)*. Визначення активності ензимів у сироватці (плазмі) крові набуває дедалі більшого значення при патології печінки ще й тому, що зміна їх активності, частіше у вигляді гіперензимемії, настає швидше за інші лабораторні показники (білірубину, альбуміну, колоїдо-осадових проб).

Тому передумовою своєчасного та успішного лікування і профілактики хвороб печінки є рання ензимодіагностика. Вихід

(елімінація) ензимів із печінки в кров є ознакою цитолізу – руйнування клітин або порушення проникності їхніх мембран.

При гострих запальних процесах у печінці активність ензимів швидко зростає, а при переході в хронічну стадію підвищення дещо уповільнюється, однак до фізіологічних меж не повертається.

З гепатоспецифічних (органоспецифічних) ензимів для діагностики хвороб печінки в сироватці крові визначають активність *СДГ*, *аргінази*, *орнітинкарбамоїлтрансферази (ОКТ)*, *печінкового ізоензиму ЛДГ (ЛДГ₅)*.

До *відносно специфічних* для печінки ензимів відносять *глутаматдегідрогеназу (ГДГ)*, *малатдегідрогеназу (МДГ)*, *ізоцитратдегідрогеназу (ЩДГ)*, *лейцинамінопептидазу (ЛАП)*, *урокініназу* та інші. Окрім клітин печінки вони можуть локалізуватися в іншому органі.

У печінці знаходиться велика кількість неспецифічних ензимів (АсАТ, АлАТ, альдолаза, ЛДГ, ХЕ та ін.), які можна виявити також у клітинах інших тканин організму. Тому зважати на них у діагностиці хвороб печінки слід одночасно із гепатоспецифічними ензимами чи іншими показниками, при цьому необхідно обов'язково враховувати симптоми, отримані при клінічному обстеженні хворої тварини.

Серед неспецифічних ензимів привертають найбільшу увагу і мають найважливіше значення для лабораторної діагностики хвороб печінки АсАТ і АлАТ, а для діагностики холестазу – ЛФ, тому їх часто, як і специфічні та відносноспецифічні, називають індикаторними.

Амінотрансферази є досить чутливими та інформативними показниками ураження печінки. Найвища ефективність амінотрансфераз у крові спостерігається при розвитку некрозу печінки й гострому паренхіматозному гепатиті, дещо нижча – при хронічному гепатиті та дистрофії. Зростання активності АсАТ і АлАТ у сироватці крові починається за 3–8 діб до появи клінічних ознак захворювання і досягає максимуму в перші дні патологічного процесу.

У діагностиці захворювань печінки запропоновано визначати коефіцієнт Де Рітіса, що показує співвідношення активності АсАТ до АлАТ (у нормі коефіцієнт Де Рітіса дорівнює 1,33). Зростання

величини коефіцієнта свідчить про тяжкі ураження гепатоцитів, оскільки це є ознакою підвищення активності мітохондріальної фракції АсАТ.

Глутаматдегідрогеназа (ГДГ) локалізується звичайно в мітохондріях клітин печінки. Активність ензиму в сироватці крові незначна. Зростання активності ГДГ у крові свідчить про порушення структури та лізис мітохондрій гепатоцитів. Гіперферментемія може спостерігатися також при гострій закупорці загальної жовчної протоки, коли виникає жовчна гіпертензія.

Холінестераза (ХЕ) синтезується на рибосомах ендоплазматичної сітки гепатоцитів і виділяється з печінки в плазму крові для участі в метаболічних реакціях. На відміну від багатьох інших ензимів діагностичне значення має не підвищення, а зниження її активності. Зниження активності холінестерази в сироватці крові відбувається при тяжких захворюваннях печінки (зокрема цирозі та некрозі), отруєнні фосфорорганічними сполуками (інсектицидами). Гіперхолінестераземія трапляється при патологічних станах, що характеризуються посиленням синтезом дрібнодисперсних глобулінів через подразнення клітин печінки ендо- чи екзотоксинами.

Незначне зростання активності індикаторних цитолітичних ензимів або відсутність гіперензимемії разом із глибоким порушенням функцій печінки є наслідком заміни паренхіматозних клітин сполучною тканиною, що вказує на цироз аж до несприятливого прогнозу. Такі зміни показників можуть спостерігатися при обширному некрозі печінки, оскільки відмерлі клітини не продукують ензимів.

Синдромна класифікація функціональних проб

1. Індикатори цитолізу: підвищення активності аланінаміно-трансферази, аспартатамінотрансферази, γ -глутамілтранспептидази, глутаматдегідрогенази, сорбітолдегідрогенази, ізоензимів лактат дегідрогенази (ЛДГ₄ та ЛДГ₅).

2. Індикатори гепато-депресивного синдрому:

- **бромсульфалеїнова проба.** Це проба на поглинально-видільну функцію печінки. Внутрішньовенно вводиться бромсульфалеїн, який швидко поглинається печінкою і потім поступово

виділяється в жовч. У нормі дуже невелика кількість барвника (не більше 10 %) виділяється через нирки із сечею. При порушеннях поглинання фарби печінкою кількість її в сечі різко зростає;

- **проба на знешкоджувальну функцію (кофеїнова проба).**

Кофеїн вводять у кров і через певний час визначають кліренс кофеїну. Зниження кліренсу кофеїну свідчить про пригнічення біотрансформаційної функції печінки;

- **з біохімічних показників:** загальний білок та його фракції; активність холестеролестерази, антитрипсину, вміст церулоплазміну, холестеролу, фібриногену, протромбіновий індекс, фібринолітична активність.

3. Індикатори мезенхімально-запального синдрому: γ -глобуліни сироватки крові, осадові проби, оксипролін (протеїн вільний та зв'язаний).

4. Індикатори холестази: підвищення активності лужної фосфатази, 5-нуклеотидази, γ -глутамілтранспептидази, вільні та кон'юговані жовчні кислоти, холестерол, β -ліпопротеїни, загальний та зв'язаний білірубін, білірубін сечі та калу.

5. Індикатори шунтування печінки: аміак, феноли, амінокислоти (тирозин, фенілаланін, триптофан, метіонін), жирні кислоти з коротким ланцюгом.

6. Індикатори регенерації та пухлинного росту: α -фетопротеїн сироватки крові.

Алгоритм досліджень функцій печінки

Діагностика захворювань печінки в клінічній практиці здійснюється на комплексній основі, яка складається із загальноклінічних, функціональних та інструментальних методів дослідження.

Біохімічні констеляції деяких захворювань ШКТ і печінки наведені в табл. 3.8.

Таблиця 3.8. – Біохімічні констеляції в діагностиці захворювань печінки

Вид патології	Біохімічний тест
Вірусний гепатит	Лактатдегідрогеназа в крові Аланінамінотрансфераза в крові Аспартатамінотрансфераза в крові Коефіцієнт АлАТ/АсАТ Сорбітолдегідрогеназа в крові Білірубін («прямий» та «непрямий») Уробіліноген та білірубін у сечі Тимолова проба Електрофореграма: альбумін, α_2 - та β -глобуліни, γ -глобуліни
Цироз печінки	Альбуміни в крові γ -Глобуліни в крові Лужна фосфатаза в крові Лейцинамінопептидаза в крові Фібриноген у крові Протромбіновий час у крові Білірубін у крові Аміак у крові та сечі Тимолова проба
Механічна жовтяниця	Білірубін («прямий») у крові та сечі Лужна фосфатаза в крові Лейцинамінопептидаза в крові Глутаматдегідрогеназа в крові Жовчні пігменти в калі Уробіліноген у сечі Холестерол у крові Загальні ліпіди в крові Церулоплазмін у крові

Холецистит	Печінкові проби в крзві Білірубін у крові Білірубін у сечі Уробіліноген у сечі
Хронічний персистуючий гепатит	Альбумін в крові γ-Глобуліни в крові Аланінамінотрансфераза в крові Глутаматдегідрогеназа в крові Тимолова проба в крові Білірубін у крові Лужна фосфатаза в крові Холестерол у крові
Печінкова кома	Альбумін в крові γ-Глобуліни в крові Білірубін у крові Активність «печінкових» ензимів у крові Аміак у крові та сечі Протеїн у сечі Кристали тирозину та лейцину в сечі Аміноацидурія Холестерол у крові Калій, хлориди, Кальцій у крові

Діагностичний процес при захворюваннях печінки можна умовно поділити на три етапи:

Перший етап – встановлення факту ушкодження печінки. Лабораторні методи, які застосовують на першому етапі діагностики, відіграють роль відсіваючих факторів. Вони включають біохімічні та інструментальні методи дослідження.

Загальноприйнятий мінімум біохімічних показників передбачає визнання таких параметрів: білірубін сироватки крові, аланін-та аспартатамінотрансферази, лужна фосфатаза, загальний протеїн та його фракції, тимолова проба, холестерол, протромбіновий час, білірубін та уробілін сечі. Програма-мінімум має бути розширена, якщо результати перелічених тестів нормальні або ненадійні.

На **другому етапі** діагностики головним завданням є уточнення характеру локального або дифузного ушкодження печінки, тобто постановка діагнозу. Методи, які застосовують на цьому етапі, називаються селективними.

Вони передбачають як біохімічні, так і інструментальні дослідження. При наявності гіпербілірубінемії необхідно насамперед провести диференційну діагностику жовтяниць, встановити генезис жовтяниці в конкретному випадку, особливо при нез'ясованій симптоматиці.

Третім етапом діагностики є деталізація діагнозу, тобто уточнення активності процесу, стадії захворювання, наявності ускладнень.

Оцінюють характер та глибину порушень функцій печінки, ступінь печінково-клітинної недостатності, поширеність процесу, ступінь холестазу з використанням синдромної моделі біохімічних зсувів. Цей етап лабораторних досліджень являє собою програму-максимум, що дозволяє як найповніше встановити функціональні порушення та резерви печінки. Біохімічні дослідження, виконані своєчасно (по можливості в початковий період жовтяниці), найбільш ефективні.

Питання для самоконтролю:

1. Порушення процесів перетравлювання та всмоктування поживних речовин при запальних процесах органів травлення.
2. Значення біохімічних аналізів для діагностики захворювань підшлункової залози.
3. Найважливіші функції печінки та їх характеристика.
4. Основні процеси обміну вуглеводів у печінці.
5. Біохімічні показники та функціональні проби, які характеризують обмін вуглеводів у печінці.
6. Біохімічні показники, які характеризують порушення обміну ліпідів при захворюваннях печінки.
7. Біохімічні показники, які відображають обмін протеїнів у печінці, протеїнограми, осадові проби. Значення цих показників у діагностиці захворювань печінки.

8. Ензими, що є індикаторними для характеристики функціонального стану печінки. Роль визначення цих ензимів у діагностиці захворювань печінки.

9. Ензими, що є специфічними для обміну клітин печінки.

10. Основні біохімічні показники, які необхідно досліджувати при запальних захворюваннях печінки.

11. Основні біохімічні показники, які слід досліджувати при порушеннях відтоку жовчі.

3.2.5 Лабораторна діагностика порушень метаболізму в нефроцитах при нефропатіях і функціональних розладах органів сечовиділення

Нирки – це парний орган, призначений для підтримання сталості внутрішнього середовища організму та виділення кінцевих продуктів обміну.

Зупинка функції нирок несумісна з життям: якщо це трапляється, тварина вмирає на 4–6-ту добу. У структурі нирок розрізняють зовнішній (корковий) шар та внутрішній (мозковий). Кожна нирка складається приблизно з мільйона функціональних одиниць – нефронів.

Тканина нирки містить багато води (близько 84 %), що вказує на високий рівень метаболічних процесів. Про високу інтенсивність окиснювальних процесів у нирках свідчить значна їх здатність поглинати Оксиген (до 10 % необхідного організму). Основним енергетичним матеріалом для роботи нирок є вуглеводи, хоча глікогену в тканині нирок дуже мало. У них інтенсивно відбуваються гліколіз, кетоліз, аеробне окиснення і фосфорилювання, що зумовлює найефективніше використання енергії та утворення найбільшої кількості АТФ. У корковій речовині нирок домінує аеробний тип обміну речовин, а в мозковій – анаеробний.

У нирках відбувається інтенсивний обмін протеїнів. Активні також процеси трансамінування й дезамінування, що супроводжуються утворенням амоніаку. Головним джерелом для його утворення є розщеплення глутаміну, який надходить у нирки з різних тканин.

глутаміназа
Глутамін + H₂O → Глутамат + NH₃

Аміак дифундує крізь клітинні мембрани в просвіт канальця (в сечу), де з'єднується з протонами, утворюючи іон аміаку.

Цей механізм є одним із шляхів знешкодження аміаку. У такій формі він вже не може реабсорбуватися мембранами клітин ниркових трубочок і тому екскретується в складі сечі (NH₄Cl).

У результаті взаємодії аргініну та гліцину під впливом трансамідази в нирках утворюється гуанідинацетат, який переноситься через кров у печінку, де перетворюється на креатин. Далі креатин фосфорилується й перетворюється на макроергічну сполуку – креатинфосфат, з якого при дефосфорилуванні утворюється креатинін. У сечі здорових дорослих тварин креатину в нормі немає, а є креатинін – кінцевий продукт, що екскретується із сечею.

Важлива роль у нирках належить ізоформам аланінаміно-пептидази (ААП). Для тканини нирок характерна ААП₃ ізоформа. ААП₃ розщеплює ди- і трипептиди, відщеплюючи N-кінцевий залишок. Поява в крові та сечі ізоензиму ААП₃ вказує на ушкодження тканини нирок. При гострих запальних процесах у нирках насамперед підвищується проникність мембран клубочків, що спричиняє появу в сечі протеїну, зокрема з'являються деякі ензими або зростає вміст інших.

Нирки виконують такі функції:

- екскреторну;
- регулюють водно-сольовий баланс;
- регулюють кислотно-основну рівновагу;
- регулюють осмотичний тиск рідин організму;
- регулюють артеріальний тиск організму;
- стимулюють еритроцитопоез.

В основі утворення сечі лежать три процеси: фільтрація, реабсорбція та секреція (рис. 3.5).

Клубочкова фільтрація води та низькомолекулярних компонентів плазми обумовлена різницею між гідростатичним тиском крові в капілярах клубочків, онкотичним тиском протеїнів плазми

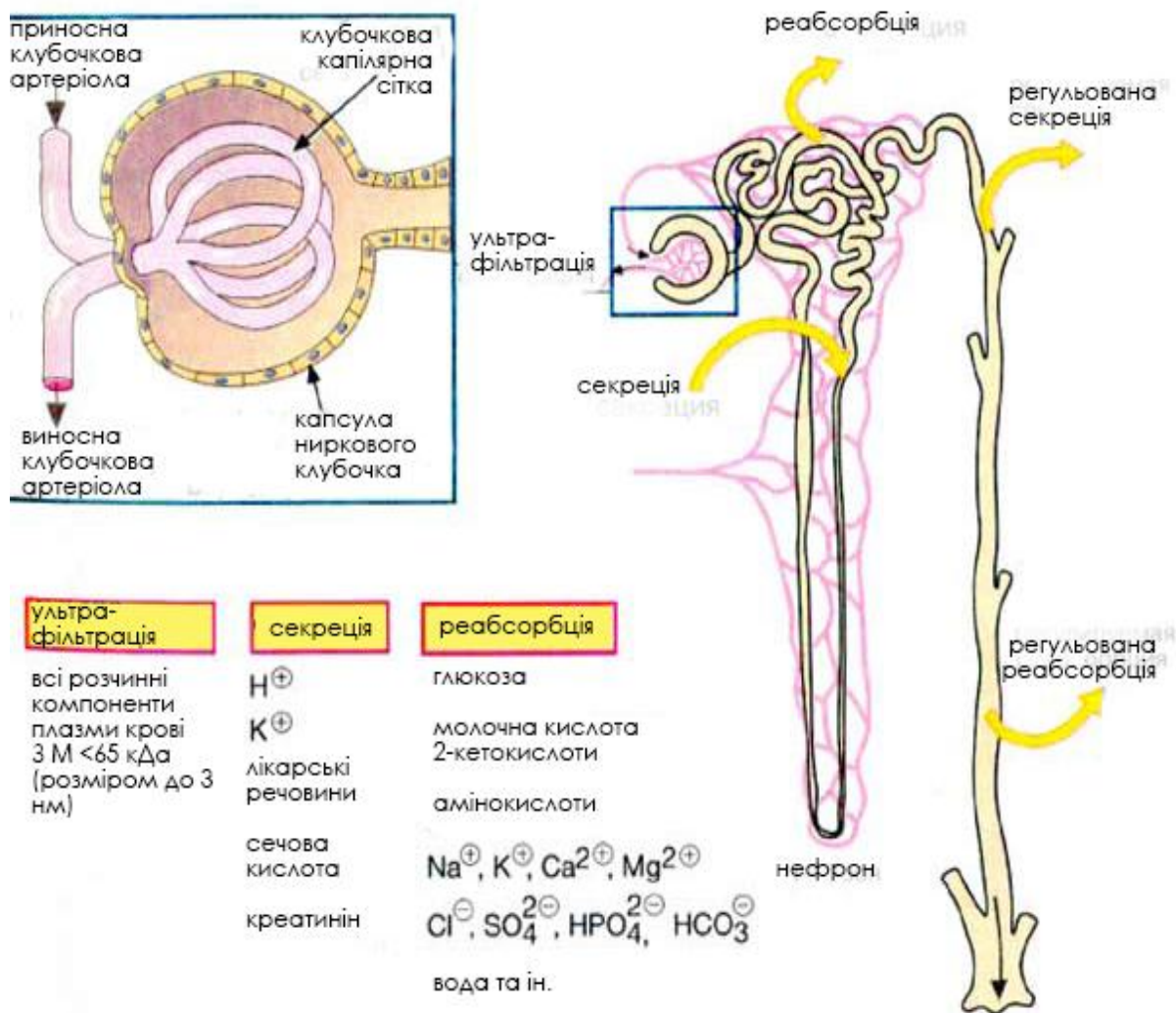


Рис. 3.5. Етапи утворення сечі в нирках

крові та гідростатичним тиском ультрафільтрату плазми крові в капсулі клубочка (пасивний процес).

Клубочковий фільтрат являє собою ультрафільтрат плазми (первинна сеча), тобто практично однаковий з плазмою за складом, за винятком майже повної відсутності протеїнів. Це пов'язано з тим, що ендотелій утворює бар'єр для лейкоцитів та еритроцитів крові, а базальна мембрана, яка проникна для води й низькомолекулярних речовин, непроникна для більшості макромолекул. Протеїни з молекулярною масою меншою, ніж в альбуміну (68000 Да), проходять крізь мембрану.

Швидкість клубочкової (гломерулярної) фільтрації в нормі становить приблизно 120 мг/хв, що еквівалентно 180 дм³/добу. Однак при цьому за добу утворюється лише 1–2 дм³ сечі (залежно від

кількості вжитої рідини); основна кількість фільтрату реабсорбується в нефроні.

За добу епітелій каналців зворотно всмоктує (*реабсорбує*) значну кількість речовин: 179 дм³ води, 1 кг NaCl, 500 г NaHCO₃, 250 г глюкози, 100 г вільних амінокислот.

Зворотного всмоктування не зазнають сечовина, сечова кислота, креатинін, парні сполуки та інші кінцеві продукти обміну, які не потрібні організму. Отже, другим етапом сечоутворення є *реабсорбція*

Крім реабсорбції, у каналцях відбувається ще й *додаткова секреція* лугів, кислот, деяких пігментів, лікарських речовин тощо. Унаслідок цих процесів, тобто зворотного надходження речовин, а також додаткової секреції, первинна сеча поступово перетворюється на вторинну. Ця сеча вже істотно відрізняється за своїм складом від плазми крові. До складу вторинної сечі входить понад 200 речовин (азотистих та безазотистих), зокрема: сечовина, сечова кислота, креатинін, ензими, вітаміни, гормони, пігменти (урохром, урохромоген, уроеритран, уробілін); амінокислоти (глутамінова, аспарагіннова кислоти, глутамін, гістидин); кон'югати (гіпурова, фенацетурова, індоксил-сульфатна кислоти, індикан); солі амонію, натрію, калію, кальцію, магнію; неорганічні (хлористоводнева, фосфатна, сульфатна) та органічні (щавлева, глюкуронова, янтарна) кислоти; солі органічних кислот (оксалати, урати); мікроелементи (Йод, Кобальт, Цинк, Ферум, Купрум), феноли та їх етери; нейтральний Сульфур та ін.

Для оцінки стану очищення організму від цих речовин існує показник клубочкової фільтрації, так званий *кліренс* (очищення).

Кліренс будь-якої речовини виражають кількістю (см³) плазми крові, яка очищується від речовин (зокрема продуктів обміну) за 1 хв при проходженні через нирки.

Речовинами, за якими визначають клубочкову фільтрацію, є сечовина, креатинін, інулін (полімер фруктози), манітол.

Кліренс визначають за формулою:

$$C = K_c / K_{пл} \cdot V, \text{ де}$$

C – кліренс; K_c – концентрація речовини в сечі, мг%; $K_{пл}$ – концентрація речовини в плазмі, мг%; V – кількість сечі, см³ за 1 хв.

Чітке зниження клубочкової фільтрації при запальних захворюваннях нирок (нефритах) супроводжується зменшенням виділення з організму кінцевих продуктів обміну речовин, зокрема сечовини, сечової кислоти, креатиніну та інше, що призводить до так званої азотемії (підвищення концентрації цих компонентів у сироватці крові).

Нирки також виконують внутрішньосекреторні функції. Вони здійснюють контроль рівня артеріального кров'яного тиску (рис. 3.6).

Порушення водно-сольового обміну призводять до змін функціонування ренін-ангіотензинової системи. Синтезовані в нирках простагландини змінюють чутливість ниркових клітин до дії певних гормонів.

У нирках синтезується також еритропоетин, який стимулює кістковомозковий еритроцитопоез. Синтез еритропоетину зумовлюється крововтратами, шоком, гіпоксією тощо.

Значення компонентів системи залишкового Нітрогену для оцінки стану та функціонування нирок

Залишковий Нітроген – небілковий Нітроген, який залишається у центрифугаті сироватки крові (або в іншій біологічній рідині) після осадження протеїнів під дією трихлороцтової кислоти або інших осадників.

До складу залишкового Нітрогену, вміст якого в нормі становить 0,20–0,40 г/дм³ (14–28 мМ), входять Нітроген сечовини, амінокислот, креатину, креатиніну, сечової кислоти та інших продуктів обміну протеїнів.

До низькомолекулярних азотовмісних компонентів плазми відносять і оксид нітрогену (NO), який розглядається як «ендотеліальний фактор релаксації».

Визначення компонентів залишкового Нітрогену широко застосовується для діагностики патології сечовидільної системи, для оцінки характеру і ступеня вираженості азотемії.

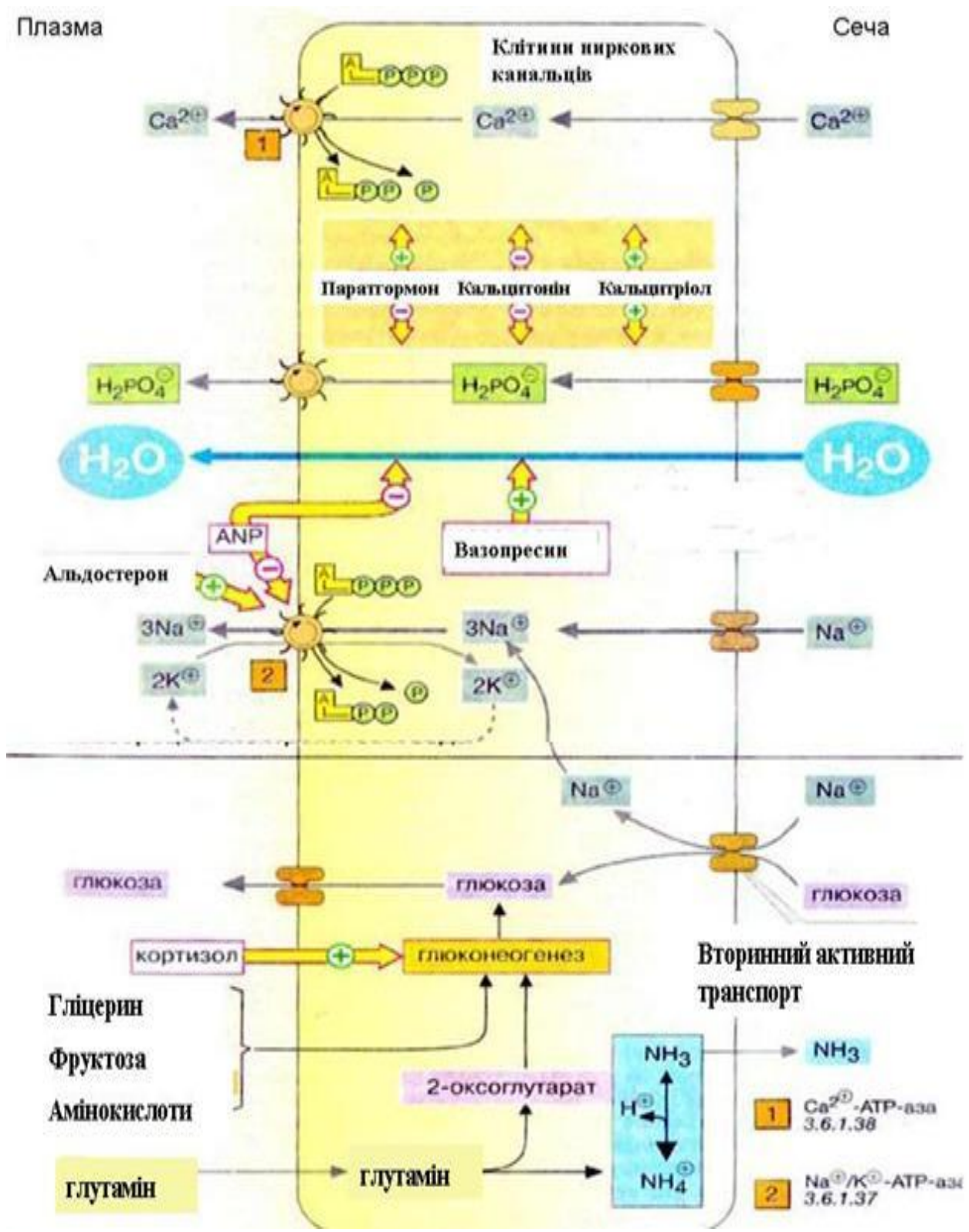


Рис. 3.6. Регуляція процесу сечоутворення в нирках

У порівнянні з іншими фракціями залишкового Нітрогену концентрація сечовини при патологіях нирок зростає швидше, ніж креатиніну.

Ниркова недостатність діагностується лише тоді, коли концентрація сечовини в сироватці крові тривалий час стабільно перевищує верхні межі норми (8,3 мМ).

При ураженні м'язів (міозити, міопатії) можливі низькі показники концентрації сечовини на фоні значно підвищеної концентрації креатиніну. Якщо кількісні характеристики сечовини й креатиніну нерівнозначні, необхідно визначати концентрацію сечової кислоти, підвищення якої вказує на порушення функції нирок.

Розрізняють два види азотемії – абсолютну та відносну. *Абсолютна азотемія* є наслідком накопичення в крові азотистих шлаків.

Абсолютна азотемія буває *ретенційна*, коли із сечею виділяється недостатньо секретованих в кров азотовмісних речовин.

Іншим видом є *продукційна азотемія*, що виникає внаслідок надлишкового надходження продуктів розпаду протеїнів будь-яких тканин. При цьому концентрація сечовини в сироватці крові не перевищує 8–10 мМ, а збільшення її концентрації уповільнюється порівняно з іншими азотовмісними метаболітами (Нітрогеном амінокислот, аміаком, сечовою кислотою, креатином, креатиніном, пептидами).

Азотемії бувають *ниркові* та *позаниркові*. При ниркових азотеміях концентрація сечовини в сироватці крові більш підвищена (>13–14 мМ). Її вміст прямо пропорційний ступеню патології.

Ниркова азотемія спостерігається при «шоковій», «токсичній», «гострій інфекційній» нирці, ураженні капілярів нирок (гострий гломерулонефрит, гострий пієлонефрит), обтурації сечових шляхів.

Хронічний пієлонефрит, хронічний гломерулонефрит, амлоїдоз нирок, нефроангіосклероз характеризуються повільним розвитком азотемій. Важливе значення в таких випадках має прогресуюча азотемія (підвищення концентрації сечовини в 5–10 разів).

Позаниркові азотемії розвиваються при декомпенсації серцево-судинної системи, зневодненні, блюванні, непрохідності, крово-

течах, інфекційному гепатиті, діабеті, шоку, опіках. Проте азотемія при цьому не перевищує 13 мМ.

Характерною рисою ретенційної азотемії є різке підвищення рівня сечовини в складі залишкового Нітрогену. У здорової тварини цей рівень не перевищує 50 %, а при ретенційній азотемії зростає до 90 %.

Відносна азотемія спостерігається при зневодненні організму та згущенні крові внаслідок блювання, проносів, обширних опіків тощо. Істотного діагностичного значення відносна азотемія не має.

Концентрація сечовини в сироватці крові може бути нижчою за норму тільки при важких ушкодженнях печінки (гострому некрозі, комі, цирозі, інтоксикації солями важких металів) та коли гіпоазотемія настає після гіперазотемії за рахунок сечовини. Це означає, що виникає гепаторенальний синдром, тобто до патології нирок приєднується патологія печінки.

Патологічні стани нирок. Захворювання нирок – дуже поширена патологія, яка спостерігається в 7–10 % дорослих тварин. Ураження нирок може бути самостійним або виникає на фоні будь-якого іншого захворювання.

Необхідно зазначити, що при нефрологічних захворюваннях лабораторна діагностика має винятково важливе значення (табл. 3.9).

Найбільш поширені захворювання нирокта їх біохімічні констеляції

Гострий гломерулонефрит – гостре імунозапальне захворювання, при якому насамперед уражений клубочковий апарат обох нирок.

Біохімічні зміни схематично відображають так:

у сироватці – ↑ креатинін, сечовина; холестерол (незначно),

↓ загальний протеїн;

у сечі – ↑ протеїн.

Таблиця 3.9. – Біохімічні тести функцій нирок

№ з/п	Показник	Зміни концентрації (активності) показника при патології	
		у плазмі крові	у сечі
1.	Креатинін*	↑ патологія нирок, гостра та хронічна ниркова недостатність, обтурація сечових шляхів, діабетичне ураження нирок; ↓ зменшення м'язової маси	↑ ретенційна азотемія, недостатність функції нирок; ↓ дегенерація нирок, амілоїдоз нирок, міопатії, міозити, міоглобінурія, кахексія
2.	Сечовина**	↑ патологія нирок, гостра та хронічна ниркова недостатність, ниркова гіпертонія, обтурація сечових шляхів; ↓ порушення всмоктування протеїну	↓ гостра та хронічна ниркова недостатність, уремія, нефрит у період новонародженості, вагітність
3.	Сечова кислота	↑ подагра, ниркова недостатність, полікістоз нирок, хронічна свинцева нефропатія; ↓ гепатоцеребральна дистрофія, деякі злоякісні новоутворення	↑ лейкоз, подагра, цистиноз; ↓ ксантинурія, свинцева інтоксикація
4.	Трансамінідаза	«+» ураження нирок (хронічний пієлонефрит,	-

		хронічний нефрит, нефротичний синдром)	
5.	Аланінаміно- пептидаза (ААП ₃)	«+» ураження ниркової тканини (гломерулонефрит, інфаркт нирки	
6.	Лактатдегідро- геназа (ЛДГ _{1,2})	↑ гостра ниркова недостатність	-
7.	Лужна фосфатаза	↑ хронічний гломерулонефрит і хронічний пієлонефрит	-
8.	γ-Глутаміл- транспепти- даза	↑ хронічний гломерулонефрит і хронічний пієлонефрит	-

Умовні позначення:

↑ – підвищення концентрації (активності);

↓ – зниження концентрації (активності);

«+» – поява в плазмі (сечі);

Примітки:

*1) креатинін не є чутливим показником захворювання нирок на ранній стадії їх ушкодження;

2) на концентрацію креатиніну в плазмі крові не впливає характер корму;

3) збільшення концентрації креатиніну спостерігається пізніше і стабільніше порівняно з концентрацією сечовини;

4) підвищення величини співвідношення піруват/креатинін спостерігається при порушенні функції нирок

**1) концентрація сечовини збільшується з віком та залежить від вмісту протеїну в кормі;

2) ниркова недостатність діагностується тоді, коли вміст сечовини перебуває тривалий час на стабільному рівні, який перевищує 8 мМ;

3) при ураженнях м'язів (міозити, міопатії) може спостерігатися зменшена концентрація сечовини на тлі значного підвищення – креатиніну.

Хронічний гломерулонефрит – запальне захворювання обох нирок, яке виникає внаслідок перенесеного гострого стрептококового нефриту та інших системних захворювань.

Біохімічні зміни:

у сироватці – без суттєвих змін, а в сечі з’являється протеїн.

Хронічний пієлонефрит – інфекційно-запальне захворювання, при якому в запальний процес включаються не тільки миски, а й сама ниркова тканина.

Такі захворювання проявляються у фазах загострення або ремісії.

Біохімічні зміни:

у сироватці – ↑ креатинін, потім ↑ сечовина; залишковий Нітроген, сечова кислота, глюкоза, ↓ Натрій, Хлор;

у сечі – ↓ сечова кислота.

Гостра ниркова недостатність – гостре порушення основних функцій нирок (фільтраційної, екскреторної, секреторної), що виникає внаслідок патологічного впливу на її паренхіму зовнішніх та внутрішніх факторів.

Біохімічні зміни:

у сироватці – ↑ Калій, Магній, аміак; сечова кислота та інди-кан (незначно);

у сечі – ↑ протеїн.

Хронічна ниркова недостатність – прогресуюче захворювання, яке обумовлене погіршенням функції клубочків та каналців до стану, при якому нирки не підтримують гомеостаз (сталість внутрішнього середовища організму).

Біохімічні зміни:

у сироватці – ↑ креатинін, сечовина, сечова кислота; ↑ Калій, Хлор, фосфати, Магній; ↓ Кальцій, рН;

у сечі – ↓ сечовина.

Нефротичний синдром – стан, який характеризується комплексом клініко-лабораторних змін, що спостерігаються як при первинних захворюваннях (гломерулонефриті, пієлонефриті), так і при вторинних ураженнях нирок (колагенозах, цукровому діабеті та ін.).

Біохімічні зміни:

у сироватці – ↓ α -глобуліни; ↑ γ -глобуліни, ліпіди;
у сечі – ↑ протеїн.

Нефроз – захворювання нирок з дегенеративними змінами епітелію ниркових канальців та базальної мембрани капілярних петель клубочків і порушенням обмінних процесів – водно-солькового, протеїнового, холестеринового та ін.

Біохімічні зміни:

у сироватці – ↓ загальний протеїн, альбуміни, α -глобуліни, ↑ γ -глобуліни,
ліпіди; ↑ гіалуронідаза;
у сечі – ↑ протеїн.

Нефросклероз – патологічний процес у нирках, обумовлений склеротичними ураженнями ниркових артеріол, розростанням сполучної тканини, атрофією паренхіми.

Біохімічні зміни:

у сироватці – ↑ ренін, ангіотензин II, ↑ залишковий Нітроген, хлориди;
у сечі – ↑ протеїн (незначно).

Амілоїдоз нирок – захворювання, при якому в усіх структурах нирок відбувається відкладення амілоїду (патологічного протеїну), що викликає порушення їх функцій та розвиток хронічної ниркової недостатності.

Біохімічні зміни:

у сироватці – ↓ загальний протеїн, альбуміни; ↑ холестерол, β -ліпопротеїни, триацилгліцероли;
у сечі – ↑ протеїн, γ -глобуліни, фібриноген, потім глюкозурія; ↑ амінокислоти, Калій.

Лабораторна діагностика при захворюваннях сечовидільної системи є одним із найскладніших видів діагностики і базується на використанні різних методичних заходів, спрямованих на встановлення складових сечі та оцінку загального біохімічного статусу хворого (рис. 3.6).



Рис. 3.6. Моделі автоматичних біохімічних аналізаторів сечі

Патологічні компоненти сечі

До основних патологічних складових сечі належать протеїни, вуглеводи, кетонів тіла, жовчні та кров'яні пігменти.

Протеїни. Здорова тварина за добу виділяє із сечею до 30 мг протеїну, який звичайними лабораторними методами не виявляється. Як правило, із сечею виділяються низькомолекулярні протеїни плазми крові або інших тканин і органів. Підвищення вмісту протеїну в сечі дозволяє визначати їх звичайними лабораторними методами і свідчить про патологічний стан. При цьому вміст протеїну в сечі зростає переважно за рахунок протеїнів плазми крові або клітин сечовивідних шляхів, тобто виникає протеїнурія.

Протеїнурія може бути *ниркова (ренальна)*, яка виникає при органічному ураженні нефрона, та *позаниркова (постренальна)*, яка є результатом ураження сечовивідних і статевих шляхів (поява домішок запального ексудату).

Запальні процеси нирок (гломерулонефрити) супроводжуються підвищенням проникності базальних мембран клубочків нейрона. При нефрозах порушується реабсорбція низькомолекулярних протеїнів (мієлома або макроглобулінемія), що зумовлює вихід протеїнів у сечу.

Незважаючи на впровадження кліренсових, інструментальних та морфологічних методів, лабораторне дослідження сечі відіграє важливу роль у діагностиці й лікуванні ренальної та екстраренальної патології. Одним з найчастіших симптомів захворювання нирок є протеїнурія (поява протеїну в сечі).

Концентрація протеїну в сечі, його якісні характеристики визначаються функціональним станом гломерулярного бар'єру та каналцевого апарату, особливостями геодинаміки, концентрацією та якісним складом протеїнів плазми.

Глюкоза. Сеча здорової тварини містить незначну кількість глюкози, яку звичайними лабораторними методами не виявляють.

Підвищення кількості глюкози в сечі (глюкозурія) може спостерігатися тоді, коли вміст її в крові перевищує 8–9 мМ (нирковий поріг глюкози). Але в деяких випадках глюкозурія може виникати при нормальній концентрації глюкози в крові. Це так звана ниркова глюкозурія, яка є наслідком порушення зворотного всмоктування глюкози в ниркових каналцях.

Розрізняють кілька видів глюкозурії:

- **фізіологічну** (при надходженні з кормом великої кількості вуглеводів, після емоційного напруження);
- **позаниркову** (цукровий діабет, цироз печінки, панкреатит, рак підшлункової залози, тиреотоксикоз, синдром, отруєння чадним газом, морфіном, хлороформом);
- **ниркову** (хронічні нефрити, нефрози, амілоїдоз, гостра ниркова недостатність, отруєння фосфором).

Глюкозурія відзначається при цукровому і стероїдному діабеті, гіперфункції щитовидної залози. У хворих на цукровий діабет вміст глюкози в сечі може зрости до 5–10 %.

Кетонові тіла (ацетон, ацетооцтова та β -оксималяна кислота). У нормі в сечі ці сполуки зустрічаються в дуже малій кількості (не більше 0,01 г за добу) і не виявляються звичайними якісними пробами.

При виведенні великої кількості кетонових тіл якісні проби позитивні – це явище патологічне, бо свідчить про кетонурію.

Кетонурія можлива при цукровому діабеті, голодуванні, надмірному вживанні жирів тощо.

Окрім біохімічних показників, які характеризують стан ниркової тканини, важливе клініко-діагностичне значення має також хімічний показник рН сечі.

Норма рН сечі знаходиться в інтервалі 5,0–7,0 і залежить від виду тварин.

Кисла реакція сечі ($pH < 5,0$) спостерігається:

- за фізіологічних умов (у м'ясоїдних тварин);
- при респіраторному і метаболічному ацидозі (діабетичній комі, серцевій недостатності);
- гострому нефриті;
- подагрі;
- туберкульозі нирки.

Лужна реакція сечі ($pH > 7,0$) спостерігається:

- за фізіологічних умов (у трав'яїдних тварин);
- метаболічному й респіраторному алкалозі (після частого блювання, при розсмоктуванні набряків);
- активних запальних процесах у сечових шляхах;
- хронічній нирковій недостатності.

Лужна реакція сечі спостерігається під час запальних процесів у сечовивідних шляхах. Зміна реакції сечі від слабокислої до слаболужної є сигналом для детального обстеження стану нирок та сечовидільної системи. Слід пам'ятати про те, що лужна сеча може виділятися під впливом лікарських препаратів.

Кислотність сечі визначають за допомогою тест-смужок, наприклад, «рН-тест». Показники глюкозурії, кетонурії, рН сечі легко визначати з використанням тест-смужок «Глюкотест», «Ацетон-тест», «рН-тест».





Сечокам'яна хвороба – захворювання нирок та сечовивідних шляхів, пов'язане з утворенням у нирковій паренхімі, мисці, сечовому міхурі каменів, які формуються із складових елементів сечі.

Спричиняють сечокам'яну хворобу порушення обмінних процесів, вади анатомічного розвитку сечовивідних шляхів, спадкові нефрозо- та нефритоподібні синдроми.

До зовнішніх чинників відносять кліматичні й геохімічні умови, особливості раціону, які впливають на склад сечі та її рН. Існують ензоотичні спалахи, за яких сечокам'яна хвороба зустрічається особливо часто, певне значення має гіперфункція паразитоподібних залоз, які викликають порушення фосфорно-кальцієвого обміну.

Причини виникнення сечових каменів вивчені недостатньо, але кілька факторів, що сприяють їх утворенню, відомі: це вплив мікроорганізмів, застій сечі, наслідок травм нирок або сечовивідних шляхів, результати природжених аномалій, які сприяють затриманню сечі, створюючи тим самим умови для кристалізації солей. Сприяють виникненню каменів висока концентрація в сечі одного або кількох компонентів клубочкового фільтрату, яка обумовлена зменшенням діурезу, високою швидкістю екскреції речовин, що утворюють камінь, або порушенням нормальної реаб-сорбції речовин із фільтрату; зміни величини рН сечі. Важливе значення у формуванні сечових каменів мають утворення органічної основи та кристалізація солей на ній. Такою основою можуть бути уромукоїди, виділені клітинами каналців, гліко- та мукопро-теїни, які

мають лужну реакцію, тому спричиняють розвиток уроциститу. Останні з'єднуються з Кальцієм, утворюючи матрикс, на який потім осідають солі. Утворенню органічної основи нирко-вих каменів сприяють запальні процеси в нирках.

Кристалізація солей на органічному матриксі виникає внаслідок порушення співвідношення між кристалами мінеральних речовин і захисними колоїдами, що містяться в сечі. До останніх належать високосульфатовані глікозаміноглікани, зокрема гепарансульфати і хондроїтинсульфати, муцини й сироватковий альбумін. При патологічних процесах концентрація в сечі речовин, які виконують роль захисних колоїдів, зменшується, що є однією з причин кристалізації солей на органічній матриці.

Спільною в структурі сечових каменів є наявність так званого ядра, навколо якого розташована оболонка, або тіло каменя. Більшість ниркових каменів (у тварин приблизно 70–90 %) є кальцієвими солями фосфатної та щавлевої кислот відповідно. Частина каменів (10–15 %) представлена магнієвими та амонійними солями фосфатної кислоти – струвітами. Приблизно така ж частка натрієвих солей сечової кислоти (уратів).

Уратні камені складаються найчастіше з сечової кислоти, рідше – з її амонієвої або натрієвої солі. Вирішальне значення в їх утворенні має величина рН сечі, оскільки при її зниженні до 5,0 зменшується розчинність сечової кислоти – вона становить лише 60 мг/дм³, а при рН = 7,0–1600 мг/дм³. Уратні камені часто утворюються при лейкопенії та поліцитемії, коли різко зростає ендогенне утворення сечової кислоти в результаті розпаду нуклеопротеїнів.

Утворенню каменів з кальцію, магнію і амонію фосфатів (фосфатні камені), а також кальцію карбонату сприяє зміна величини рН сечі в сечовому міхурі та ниркових мисках у лужний бік, що є наслідком розкладання сечовини до аміаку уреазою деяких мікроорганізмів (синьогнійна паличка, стафілокок).

Дуже важливо досліджувати рН сечі: при уратах реакція – кисла, оксалатах – слабокисла, фосфатурії – лужна. Визначення кристалів у сечі характеризує хімічний склад каменів.

При захворюваннях нирок і сечовивідних шляхів застосовують багато препаратів, які впливають на функцію цієї системи. Особливу увагу слід приділяти дії нефротоксичних речовин, які впливають на структуру й функції нирок (табл. 3.10).

Таблиця 3.10. – Вплив ксенобіотиків на функцію нирок

Ксенобіотик	Дія (ефект)
<i>Лікарські препарати</i>	
Адіурекрин	Антидіуретична
Дезоксикортикостерону ацетат	Затримує рідину, Na ⁺ , СГ, сприяє виведенню K ⁺
Гіпотіазид (тіазидний діуретик) Фуросемід («петльовий» діуретик)	Пригнічують реабсорбцію Na* та води в канальцях нефрона
Верошпірон (діуретик)	Зменшує проникність мембран дистальних канальців, виводить Na ⁺ , затримує K ⁺
Фітолізин (рослинний препарат)	Посилює кровообіг у нирках
Теофілін, еуфілін	Посилюють нирковий кровообіг та процеси клубочкової
Кофеїн	Розширює судини нирок, посилює клубочкову фільтрацію, що призводить до помірного діуретичного ефекту
Карбамід (сечовина)	Знижує реабсорбцію води
Інтерферон	Призводить до протейнурії, зрідка підвищує рівень сечовини та сечової кислоти в плазмі крові

Антибактеріальні препарати (тетрацикліни, стрептоміцин, гентаміцин, бісептол, оксацилін, поліміксини, цефалоспорини, еритроміцин та ін.)	Нефротоксична
Анальгетики (амідопірин, бугадіон, індометацин, саліцилати, фенацетин)	Нефротоксична
Амінокапронова кислота Декстрин Манніт Хінін Рентгеноконтрастні засоби	Нефротоксична
<i>Токсичні речовини</i>	
Важкі метали (Ферум, Аурум, Кадмій, Купрум, Арсен, Олово, Аргентум, Талій, Уран, Меркурій)	Викликають некроз ниркової тканини внаслідок денатурації протеїнів базальної мембрани (наприклад «сулемова нирка»)
Побутова хімія (галогенопохідні інгібітори сполуки – дихлофос, хлорофос, інсектициди, ДДТ (дуст); органічні розчинники – бензол, вуглецю тетрахлорид, тетрафторетилен, етиленгліколь).	Інактивують ензимні системи нирок; виявляють нефротоксичність

Питання для самоконтролю:

1. Структурно-функціональні особливості нирок.
2. Особливості обміну речовин у нирках.

3. Механізм сечоутворення.
4. Кліренс: поняття і практичне значення.
5. Патологічні стани, викликані порушенням функції нирок.
6. Характеристика компонентів залишкового азоту.
7. Ниркова регуляція тиску крові.
8. Біохімічні тести при ниркових патологіях.
9. Властивості й склад сечі.
10. Протеїнурія: визначення, форми, механізм виникнення.
11. Патологічні складові сечі.
12. Глюкозурія: визначення й форми.
13. Значення рН сечі.
14. Клініко-діагностична характеристика сечокам'яної хвороби.
15. Ксенобіотики, що впливають на ниркову функцію.

3.2.6. Порушення водно-електролітного обміну і кислотно-лужного стану організму тварин та їх лабораторна діагностика

Для нормальної життєдіяльності організму, крім органічних речовин, необхідні також неорганічні компоненти. До останніх відносять воду і мінеральні елементи.

Вода – найзначніша щодо кількості складова частина організму. На її частку припадає близько 60 % маси тіла у самців і 55 % – у самок.

Уся вода, що є в організмі, поділяється на внутрішньоклітинну й позаклітинну, кожна з яких існує у вигляді двох фракцій:

- а) фракція води, здатна до обміну;
- б) фракція води, зв'язана в колоїдних системах із молекулами органічних речовин (білків, жирів, вуглеводів).

Близько 66 % усієї води організму входить до складу внутрішньоклітинної рідини і 34 % знаходиться поза клітинами. Позаклітинна вода є основою внутрішньосудинних рідин (лімфи, плазми крові) та міжклітинної рідини.

Вода бере участь:

- у формуванні внутрішньоклітинних структур;

- формуванні просторових конформацій молекул протеїнів (вторинної, третинної);
- багатьох біохімічних реакціях гідролізу, гідратації, окиснення, відновлення та ін.;
- здійснює транспортну функцію за рахунок високої розчинної здатності та текучості;
- бере участь у виведенні з організму продуктів розпаду;
- є середовищем для здійснення майже всіх хімічних реакцій в організмі;
- бере участь у теплорегуляції шляхом випаровування з легень і з поверхні шкіри;
- здійснює механічну функцію – є компонентом змащування тертьових поверхонь у суглобах, додає пружності хрящам і міжхребцевим дискам;
- є компонентом секретів організму: поту, сечі, слини, молока тощо.

Уміст води в різних секретах і тканинах організму дорівнює: у потовій рідині – 99 %, сечі – 97, еритроцитах – 65, крові – 80; м'які тканини містять 75–84, жирова тканина – 40, кісткова – 20–30, зубна емаль – 2–3 %.

Тканини й клітини використовують два види води: екзо- та ендогенну.

Потреба організму у воді залежить від віку, інтенсивності обмінних процесів, м'язової діяльності, функціонального стану нирок, температури навколишнього середовища, складу корму. У дорослих вона складає в середньому 40 г на 1 кг маси тіла, для новонароджених та молодняка тварин ця величина приблизно втричі вища – від 70 до 150 г на 1 кг маси тіла. За добу до організму в нормальних умовах надходить близько 2,5 дм³ води, включаючи екзо- й ендогенну. Остання засвоюється в організмі при розпаді протеїнів, вуглеводів і особливо жирів. При окисненні 100 г жиру утворюється 107 см³ води, 100 г протеїну – 41 см³ води, 100 г вуглеводів – 55 см³ води.

Усмоктування води, що надходить з кормом, відбувається по всьому шлунково-кишковому тракту: невелика кількість води всмоктується в ротовій порожнині й стравоході, частина – у шлун-

ку, частина – у товстому кишечнику, основна маса – у тонкому кишечнику.

Вода з поживними речовинами шляхом дифузії та осмосу, а частково піноцитозу й активного транспорту, проникає всередину епітелію слизових оболонок кишечника. Ендоплазматичною мережею вона переміщується в клітинах і надходить у міжклітинний простір, потім у міжклітинну рідину, капіляри, венули, підепітеліальну і підслизову венозні сітки кишкової ворсинки, ворітну вену, печінку й велике коло кровообігу. Частина води надходить через лімфатичну систему.

Виведення води з організму здійснюється із сечею, калом, потом і видихуванням повітрям.

Нирки є основним органом виведення води й електролітів з організму.

У звичайних умовах за добу виділяється через шкіру та нирки майже 500 см^3 води, через легені – до 400 см^3 і через кишечник – приблизно 100 см^3 . Уся вода організму оновлюється приблизно за 4 тижні. За 1 хв вода крові встигає оновитися на 73 %.

Регуляція водно-мінерального обміну. Забезпечується вона ЦНС, ендокринною системою і нирками, однак провідну роль відіграє ЦНС. Дія гормонів полягає в тому, що вони змінюють проникність клітинних мембран для води, викликаючи її виділення чи реабсорбцію.

Вазопресин – антидіуретичний гормон гіпоталамуса, що депонується в задній частці гіпофіза, а клітинами-мішенями цього гормону є стінки дистальних каналців нирок, де він активізує вироблення гіалуронідази, яка деполімерізує гіалуронову кислоту, підвищуючи таким чином проникність каналців.

Вазопресин зменшує виведення води з організму завдяки реабсорбції її з первинної сечі в ниркових каналцях. Вода, затримуючись, знижує осмотичний тиск, при цьому припиняється секреція вазопресину. Гіперпродукування гормону призводить до накопичення рідини в організмі та набряку, а гіпопродукування викликає посилене виділення рідини з організму, аж до сечовиснаження (нецукровий діабет), коли кількість сечі може досягати 20 дм^3 за добу.

На обмін води впливає також гормон альдостерон, що секретується клубочковим шаром кори надниркових залоз. Його дія пов'язана з впливом на рівень Натрію в плазмі крові. Зниження концентрації Натрію спричиняє падіння осмотичного тиску плазми й посилення втрати води з організму. Гіпонатріємія стимулює секрецію альдостерону; він підсилює зворотнє всмоктування натрію в нирках і, отже, сприяє утримуванню води в організмі. Гіпернатріємія гальмує виділення альдостерону.

Нирки беруть участь у регуляції кількості води в організмі своїми фізіологічними функціями – процесами фільтрації та реабсорбції води й мінеральних солей, синтезом і секрецією ряду речовин.

У нирках продукується ензим ренін. Його секреція підсилюється при зменшенні кількості внутрішньосудинної рідини та зниженні артеріального тиску. Ренін сприяє мобілізації в судинне русло тканинної рідини й нормалізації артеріального тиску, необхідного для фізіологічного проходження процесів фільтрації сечі в нефроні.

Тиск, необхідний для врівноваження осмотичного руху рідини через мембрану, що володіє вибірковою проникністю, носить назву осмотичного тиску. Його величина непрямо відображає вміст води і концентрацію розчинених у ній речовин. Осмотичний тиск прямо пропорційний концентрації осмотично активних частинок у розчині. Осмотичний ефект однієї молекули натрію хлориду вдвічі перевищує такий же ефект молекули альбуміну. Підвищення осмотичного тиску вказує на збільшення концентрації розчинених речовин і зниження концентрації води в розчині. Осмоляльна концентрація розчину називається осмоляльністю і виражається числом осмолей на кілограм води. При визначенні осмоляльності біологічних рідин (плазма, сеча) зазвичай як одиницю використовують міліосмоль (мосм), рівний 1/1000 осмоля. Осмоляльність, що виражається числом осмолей на літр розчину, в разі біологічних рідин повністю відповідає осмоляльності, і обидва терміни взаємозамінні. Осмоляльність визначають для виявлення клінічно важливих змін водного балансу організму в цілому. Осмотичний тиск розчину пропорційний його осмоляльності за рахунок концентрації розчинених речовин. Більш ніж 90 % з них у позаклі-

тинній рідині представлені Натрієм і Хлоридом. Концентрація циркулюючого в крові натрію в цілому є показником осмоляльності плазми. Для розрахунку осмоляльності може бути використане визначення концентрації натрію в кровотоці разом з визначенням двох головних неелектролітів, що впливають на осмоляльність – глюкози і сечовини. Розраховану осмоляльність (мосм/кг) складають: натрій (подвоєна концентрація, ммоль/л) плюс глюкоза (ммоль/л) плюс сечовина (ммоль/100 мл). Концентрацію натрію (у ммоль/л) визначають шляхом ділення вмісту Натрію (виражене в мекв/л) на 1, глюкози (мг/100 мл) на 18 і сечовини (мг/100 мл) на 2,8. Відмінність між виміряною осмоляльністю і розрахованою осмоляльністю відображає присутність невеликої кількості циркулюючих речовин, визначених при прямому вимірюванні, але, які не включаються в розрахунок. Ця відмінність, або дефіцит осмоляльності, відносно стала величина. Відмінність, що перевищує 10 мосм/кг, вказує на присутність чужорідних речовин, з яких за-слуговують на увагу етиленгліколь, етанол і метанол.

Розподіл рідини між внутрішніми і позаклітинними компартментами насамперед визначається осмотичним ефектом електролітів, особливо натрію і хлориду (рис. 3.7). Клітинні мембрани непроникні для цих невеликих іонів, які впливають на переміщення води через мембрани, підтримуючи ізотонічність. Введення ліпотонічних рідин викликає набухання клітин, тоді як гіпертонічні розчини призводять до їх зморщення. Втрата Натрію, блювання або надмірне вживання діуретиків можуть спровокувати зниження об'єму позаклітинної рідини, гіпоосмотичну дегідратацію. Неадекватна секреція антидіуретичного гормону (АДГ) призводить до затримки води і гіпонатріємії – гіпоосмотичної гіпергідратації. При втраті води, порушенні секреції АДГ (нецукровий діабет) або відсутності реакції нирок на АДГ (нефрогенний нецукровий діабет) може виникнути стан гіперосмолярності внаслідок підвищення концентрації іонів натрію в крові – гіперосмотична дегідратація.

Зміни гідростатичного тиску і колоїдно-осмотичний ефект є головними чинниками, що визначають відносну кількість позаклітинної рідини, розподіленої між плазмою і інтерстиціальним простором.

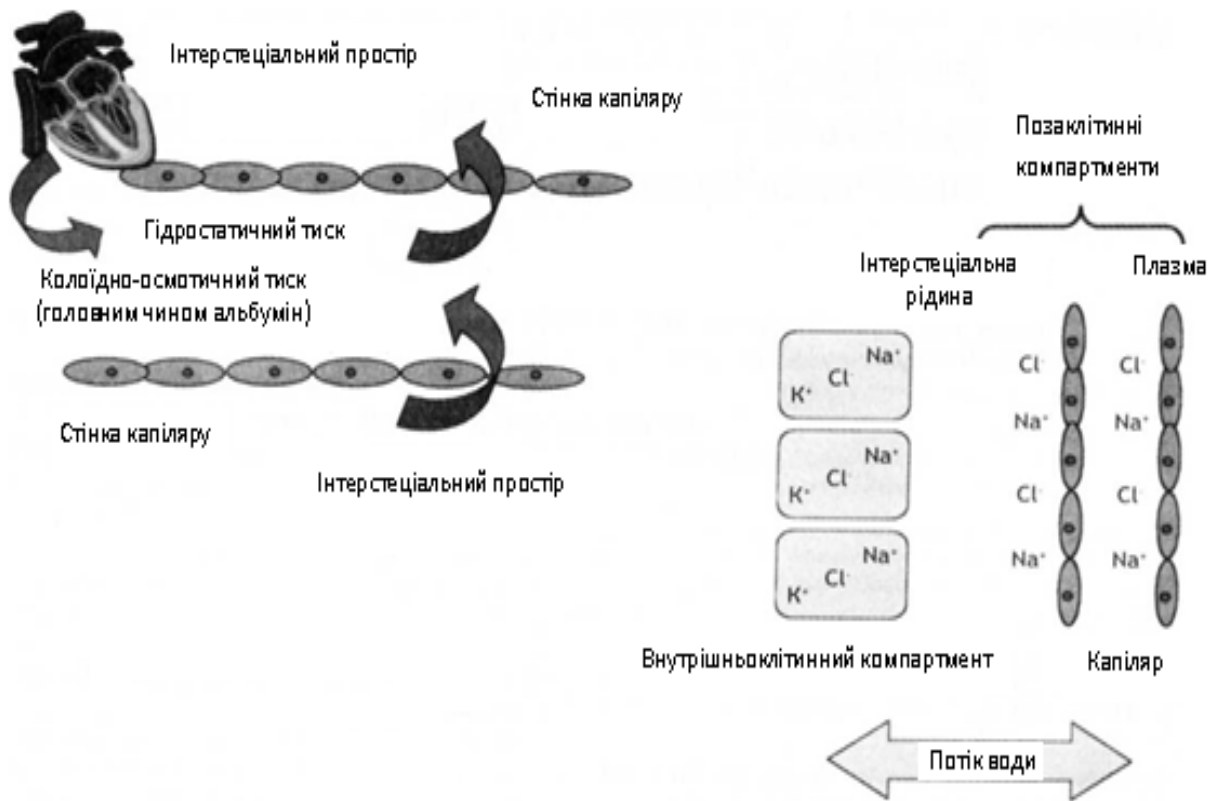


Рис. 3.7. Баланс гідростатичного і колоїдно-осмотичного тиску є головним чинником, що підтримує нормальний розподіл позаклітинної рідини між плазмою та інтерстиціальним простором. Основне значення в створенні колоїдно-осмотичного тиску у кровотоці належить концентрації альбуміну, оскільки молекули цього білка невеликі за розміром і містяться в крові у великій кількості. При збалансованому харчуванні синтез альбуміну в печінці контролюється колоїдно-осмотичним тиском. При зміні гідростатичного тиску, важкій гіпоальбумінемії або порушенні цілісності капілярної мембрани можуть з'явитися набряки

Розподіл рідини між внутрішніми і позаклітинними компартментами залежить головним чином від осмотичного ефекту електролітів, особливо натрію та хлориду. Клітинні мембрани відносно непроникні для цих іонів, але вода легко просочується крізь мембрани, що обумовлює ізотонічність рідини всередині і за межами клітин. Швидкість дифузії води визначається осмотичним ефектом і може змінюватися при захворюваннях, а також у результаті введення рідин. Відносно невеликі зміни концентрації

речовини в позаклітинній рідині, для яких мембрана непроникна, можуть викликати помітні зміни об'єму інтерстиціальної рідини. Набряком є накопичення надмірної кількості води в тканинах. Внутрішньоклітинний набряк у тканинах спостерігається при запаленні або уповільненні кровотоку. Іони натрію, що в нормі надходять до клітин під час метаболічної активності, в результаті зміни функції мембрани або її проникності не можуть ефективно виходити за її межі. Надлишок натрію викликає осмотичне надходження води, що призводить до набрякання тканин. Якщо навколишнє середовище клітини гіпертонічне, вона зморщується, тоді як гіпотонічність позаклітинної рідини створює умови для їх набухання і набрякості тканин. Головний мозок розміщений в черепній коробці і тому, навіть при невеликих змінах об'єму клітин з'являються неврологічні ознаки як перший показник зміни гомеостазу води і натрію.

Підвищений вихід рідкої частини плазми в інтерстиціальний простір через капіляри або ускладнений відтік рідини вздовж лімфатичних судин у кров можуть сприяти розвитку позаклітинного набряку тканин. Прискорений вихід води через капілярну стінку, як правило, обумовлюється зміною проникності судин, зниженням колоїдно-осмотичного тиску або підвищенням гідростатичного тиску. Прикладами кожного з цих порушень можуть слугувати відповідно запалення або реакція гіперчутливості, важка гіпоальбумінемія і серцева недостатність. Іншою важливою причиною виникнення позаклітинного набряку є чинники, що перешкоджають відтоку лімфи. До них відносяться пухлини, що розвиваються в лімфатичних судинах або здавлюють їх зовні, а також природжена відсутність лімфатичних судин. Коли набрякла рідина скупчується в «потенційно» існуючих просторах тіла, наприклад, в плевральній, черевній, перикардіальній порожнинах або усередині суглобової сумки, це явище носить назву ефузії (утворення випоту). Мембрани, або оболонки, що утворюють ці порожнини, не чинять істотної перешкоди у проходженні через них рідини, електролітів або білків, які здатні проникати з «потенційних» порожнин в інтерстиціальний простір навколишніх тканин і повертатися назад. Ефузія може розвиватися як результат захворювання органів, що межують з

порожнинами або тканинами, які оточують органи. З іншого боку, відсутність вибіркової проникності мембран, що вкривають порожнини, дає можливість використовувати черевну порожнину для перитонеального діалізу з метою видалення шкідливих продуктів при уремії або введення ізотонічних рідин і ліків.

Гіпергідрія та дегідратація

Виражається вона в гіпер- та гіпогідратації. Переважання надходження води до організму над її виділенням веде до позитивного водного балансу, збільшення кількості води в організмі – гіпергідратації. Цей стан може спостерігатися при важкій серцево-судинній недостатності, при алергійних і запальних процесах, пухлинах, голодуванні. Проявляється набряками, виникненням трансудатів у порожнинах тіла. При деяких станах у тканинах і органах утруднюється циркуляція води і виникає позитивний водний баланс, особливо при паразитарному захворюванні фасціолюзі, хворобах серця тощо.

Переважає виділення води над надходженням викликає негативний водний баланс, зменшення кількості води в організмі – гіпогідратацію або дегідратацію. Розвивається такий процес при захворюваннях, що протікають з невимримним блюванням і проносом, посиленому потовиділенні, недостатності надниркових залоз, поліурії.

При деяких хворобах тварин (правець, сказ, хвороба Ауескі) ускладнюється вживання води і виникає негативний водний баланс. Такі хвороби, як холера, чума, цукровий і нецукровий діабети, гастрити, ентерити, призводять до сечовиснаження та надмірної втрати води тканинами. Часто причиною порушення водно-іонного обміну є ураження (травми, пухлини) центрів нервової системи й залоз внутрішньої секреції, що причетні до його регуляції.

Для біохімічної діагностики станів дегідратації та гіпергідратації важливо зважати на те, що вони поділяються на інтра- і екстрацелюлярні (Щ і ЕЦ).

Інтрацелюлярна дегідратація пов'язана зі зменшенням кількості води, її називають первинною. Виникає при недостатності питної води, утрудненні надходження води до організму. Клінічно

проявляється спрагою, підвищенням температури тіла; біохімічно – підвищенням умістом Натрію й залишкового Нітрогену в крові, зниженням кількості сечі, збільшенням її питомої ваги, зростанням умісту Калію в сечі. Щ-дегідратація може перейти в ЕЦ-дегідратацію.

Екстрацелюлярна дегідратація проявляється втратою не тільки води, але й електролітів. Спостерігається при діареї, недостатньому надходженні NaCl з кормом, нефритах, рясному потовиділенні, фістулах, свищах шлунково-кишкового тракту, тому що солі й вода втрачаються при виділенні гною. При цьому зберігається внутрішньоклітинна вода. Почуття спраги клінічно відсутнє. Мають місце колапс судин, слабкість, падіння артеріального тиску, температура не підвищується. Біохімічні тести не доказові, тому що солі та вода виводяться в однаковій мірі. Тому при Щ-дегідратації лікування проводять уведенням води, а при ЕЦ-дегідратації – розчину солей.

Інтрацелюлярна гіпергідратація має місце при надмірному введенні рідини, при інфекційних хворобах та захворюваннях головного мозку (гіперпродукція антидіуретичного гормону вазопресину). Лікування проводиться розчинами солей, сечовини, глюкози.

Екстрацелюлярна гіпергідратація характеризується затриманням в організмі не лише води, а й солей, розширюється позаклітинний простір, виникають набряки.

Існує два механізми утворення набряків:

а) судинний. Порушується гідростатичний тиск, особливо в капілярах, наприклад, при серцево-судинній недостатності, падінні кількості протеїну в тканинах. Усе це призводить до зниження онкотичного тиску;

б) нирковий. При зменшенні кровотоку через нирку зменшується фільтрація, підсилюється реабсорбція.

При судинному типі ЕЦ-гіпергідратації збільшується тільки кількість екстрацелюлярної води, а при нирковому – гіпергідратований міжклітинний простір, судини та інтерстицій.

Лікування ґрунтується на обмеженні споживання NaCl, поліпшенні ниркового кровотоку, застосуванні серцевих препаратів, діуретиків, інгібіторів альдостерону.

Клініко-біохімічне значення. Визначається об'єм циркулюючої крові (ОЦК) та об'єм циркулюючої плазми (ОЦП).

Під час діагностики згаданих станів оперують такими показниками: *осмотичний тиск крові, онкотичний тиск крові, кислотно-лужна рівновага і буферні властивості крові.*

Характеристикою концентрації водних розчинів живого організму можна вважати осмотичний тиск розчинів. Осмотичний тиск можна охарактеризувати також величиною осмолярності. *Осмолярність* – це сумарна осмотична концентрація розчинених кінетично активних речовин в 1 дм³ розчину. Кінетична активність характерна як для неорганічних, так і для органічних молекул. Осмолярність визначається на 95 % неорганічними складовими, переважно катіонами натрію та аніонами хлору. Внесок органічних речовин у загальну осмолярність не перевищує 5 %. Із них на протеїни припадає близько 0,5 %.

Тиск, утворений протеїнами, називається *онкотичним*. Незважаючи на низьку питому вагу в загальній осмолярності плазми крові, онкотичний тиск забезпечує значний фізіологічний ефект у підтриманні об'єму циркулюючої крові (ОЦК) і обмінних процесів крізь капілярні мембрани. Онкотичний тиск вищий у крові, ніж у тканинах, і саме тому між ними можливий обмін води.

Осмотичний тиск крові тварини дорівнює 780–820 кПа (7,7–8,1 атм; 1 атм – 760 мм рт. ст.), а онкотичний – 4 кПа (30 мм рт. ст.; 1 мм рт. ст. = 133,3 Па).

Зміни балансу електролітів. Гіпонатріємія, або падіння концентрації натрію в крові нижче за норму, може бути наслідком зменшення його вмісту в позаклітинній рідині або надлишку води (табл. 3.11). Втраті Натрію сприяють тривале блювання, діарея, введення деяких діуретиків і недостатність альдостерону. При цьому виникає гіпоосмотична дегідратація. Надмірна секреція АДГ може підсилити тиск води в нирках, що призведе до гіпергідратації і гіпонатріємії (гіпоосмотична гіпергідратація).

Таблиця 3.11. Причини гіпонатріємії

1.	Надмірне потовиділення
2.	Гіперглікемія (цукровий діабет)
3.	Хронічне захворювання нирок (нефропатія з втратою солей)
4.	Повторний дренаж плевральної порожнини
5.	Секвестрація рідини, або втрата «третього простору» (панк ретит, перитоніт, розрив сечового міхура)
6.	Застійна серцева недостатність (набряк)
7.	Недостатність альдостерону (гіпокортицизм)
8.	Надмірне застосування діуретиків
9.	Надмірна (неадекватна) секреція антидіуретичного гормону

Гіпернатріємія – аномально висока концентрація іонів натрію в циркулюючій крові може виникнути внаслідок надходження води з позаклітинної рідини (табл. 3.12).

Таблиця 3.12. Причини гіпернатріємії

1.	Втрата через шлунково-кишковий тракт (блювання, діарея)
2.	Недостатнє надходження в організм води
3.	Нецукровий діабет, «нефрогенний» нецукровий діабет
4.	Непомітна підвищена втрата води (гарячка, висока температура навколишнього середовища, прискорене дихання)
5.	За захворювання нирок, постобструкційний діурез
6.	Цукровий діабет (після лікування інсуліном)
7.	Осмотичний діурез
8.	Надлишковий прийом солі (сольове отруєння) або внутрішньовенне введення гіпертонічного розчину
9.	Гіперальдостеронізм

Надмірне видалення води нирка-ми відбувається при недостатній секреції АДГ, нецукровому діабеті або неадекватній реакції нирок на звичайний рівень гормону (неф-рогенний нецукровий діабет). Гіпернатріємія, яка обумовлена втра-тою води, призводить до гіперосмотичної дегідратації.

Надходження всередину додаткової кількості солі без достатньої кількості води може викликати гіпернатріємію.

Концентрація позаклітинного Калію регулюється, оскільки фізіологічні функції клітин надто чутливі до кількості змін вмісту цього електроліту. Підвищення його рівня, навіть мінімальне, може викликати серцеві аритмії, небезпечні для життя (табл. 3.13).

Таблиця 3.13. Причини гіперкаліємії

1.	Недостатність альдостерону (гіпокортицизм).
2.	Обструкція сечовивідного каналу.
3.	Розрив сечового міхура.
4.	Ниркове захворювання, що супроводжується анурією або олігурією.
5.	Дифузний некроз тканин.
6.	Гіперкаліємічний періодичний параліч (коні).
7.	Тривале стояння крові, що звернулася, при відокремленні сироватки від згустка; еритроцити, що відрізняються високим вмістом калію, вивільнення якого в сироватку обумовлює помилкову гіперкаліємію; це явище властиве свійським тваринам більшості видів, за винятком собак і котів (не враховуючи собак порід акіта і англійський спрінгер-спаніель).
8.	Використання в якості антикоагулянту калієвої солі гепарину.
9.	Метаболічний ацидоз.

Провідну роль у балансі калію відіграють нирки і альдостерон, що секретується наднирниками, тому ниркова недостатність і гіпо-

кортицизм (гіпоальдостеронізм) можуть бути причинами виникнення гіперкаліємії, тобто збільшення концентрації іонів калію в циркулюючій крові вище за норму. Перерозподіл Калію між чисельними внутрішньоклітинними компартментами і просторами, де присутня позаклітинна рідина, відбувається швидко як компенсаторна відповідь на захворювання. Інсулін є одним з найбільш важливих фізіологічних чинників, які підвищують надходження калію в клітини.

Порушення кислотно-лужної рівноваги змінює баланс внутрішньоклітинного Калію. Метаболічний ацидоз підвищує відтік Калію з клітин, а метаболічний алкалоз дає протилежний ефект. Зміна осмоляльності позаклітинної рідини здатна викликати перерозподіл калію з його виходом із внутрішньоклітинного компартменту. Гіперглікемія при цукровому діабеті підвищує позаклітинну осмоляльність, обумовлюючи клітинну дегідратацію і супутній відтік Калію з клітин в позаклітинну рідину.

Помилкова гіперкаліємія (псевдогіперкаліємія) виникає у тому випадку, коли при вираженому лейкоцитозі або тромбоцитозі сироватку відокремлюють від згустку крові із запізненням (лейкоцити і тромбоцити містять значну кількість Калію). В еритроцитах собак породи акіта кількість Калію більша, ніж у собак інших порід. Тому при тривалому стоянні крові, що згорнулася, вміст калію в її рідкій частині зростає. Еритроцити коней і великої рогатої худоби також багаті на Калій і більш сприйнятливі до гемолізу. Зволікання із видаленням сироватки зі зразка крові може обумовити підвищення рівня в ній калію.

Зменшення концентрації іонів калію в циркулюючій крові (гіпокаліємія) виникає внаслідок недостатнього його надходження в організм, надмірної втрати, розведення або зрушення іонного балансу у бік підвищення внутрішньоклітинної концентрації калію (табл. 3.14).

Важливою причиною дефіциту Калію є його втрата через шлунково-кишковий тракт, що посилюється при відсутності апети-ту. Одночасна втрата хлоридів при частому блюванні або секвестрації у травній сік сичуга жуйних тварин здатні призвести до розвитку гіпокаліємічного, гіпохлоремічного метаболічного алкалозу

Таблиця 3.14. Причини гіпокаліємії

1.	Втрата калію через шлунково-кишковий тракт (блювання, діарея)
2.	Хронічне захворювання нирок або пов'язана з характером раціону нефропатія (кішки)
3.	Постобструкційний діурез
4.	Внутрішньовенне введення бідних на калій рідин
5.	Надмірне застосування діуретиків
6.	Гіпокаліємічний періодичний параліч
7.	Синдром гіпокаліємії у молочної худоби
8.	Парентеральне введення поживних розчинів
9.	Гіперальдостеронізм
10.	Нирковий ацидоз
11.	Цукровий діабет (у зв'язку з лікуванням інсуліном)

Надмірна втрата калію зустрічається при гіперальдостеронізмі (часто разом з гіпернатріємією), нирковому тубулярному ацидозі (нерідко у поєднанні з гіперхлоремічним ацидозом), а також у разі застосування деяких діуретиків.

Введення коням фуросеміду призводить до виснаження пулу катіонів в організмі в такій мірі, що утворюються ехіноцити. Інсулінотерапія при діабеті у тварин може викликати зниження рівня калію в крові, сприяючи його надходженню в клітини разом з глюкозою.

Псевдо-гіперхлоремію називають індуковане штучним шляхом підвищення рівня хлоридів у сироватці тварин, яким для усунення епілептичних судом у якості антиконвульсанта вводять калію бромід.

Різниця, або інтервал між концентраціями головного катіону (натрію) і основних аніонів (хлоридів і бікарбонатів) у циркулюючій крові характеризується відносною видовою сталістю. Вона відповідає кількості аніонів, що не враховуються в крові, головним чином за рахунок від'ємно заряджених білків, які за звичайних умов

не виявляються традиційними методами. У розрахунок аніонного інтервалу включають калій, проте, це нічого не додає до інтерпретації знайдених величин. Якщо використовувати його концентрацію, стандартні величини для аніонного інтервалу трохи збільшуються (табл. 3.15).

Таблиця 3.15. Причини змін аніонного інтервалу

Збільшення	
1.	Ацидоз: лактоацидоз, отруєння етиленгліколем, уремія, діабетичний кетоацидоз, надлишкове згодовування кормів, кетоз, посилене фізичне навантаження, отруєння саліцилатами
2.	Некротизуючий ентероколіт у коней
3.	Введення інгібітору карбоангідрази
4.	Нирковий тубулярний ацидоз
Зменшення	
1.	Гіпоальбумінемія
2.	Поліклональна гамапатія

Метаболічний ацидоз з гіперхлоремією при нормальному або пониженому аніонному інтервалі розвивається як результат втрати організмом. Визначення аніонного інтервалу може виявитися корисним при встановленні можливих причин порушення кислотно-лужної рівноваги. Збільшення аніонного інтервалу у поєднанні з метаболічним ацидозом внаслідок підвищення рівня метаболізуючих і неметаболізуючих кислот у крові. Зростання рівня молочної кислоти може бути обумовлене гіповолемічним шоком, значним фізичним навантаженням або надмірним згодовуванням зернових продуктів. Посилене утворення кетонів, кетоацидоз є наслідком цукрового діабету або кетозу. Затримка сульфатів і фосфатів (неметаболізуючі кислоти) при нирковій недостатності сприяє розвитку уремічного ацидозу. Токсикоз, викликаний етиленгліколем, саліцилатами, метанолом (неметаболізуючі кислі речовини), призводить до ацидозу і збільшення аніонного інтервалу. Зменшення

величини останнього і відсутність порушень кислотно-лужної рівноваги може бути зв'язано з гіпоальбумінемією.

бікарбонатів внаслідок діареї або ниркового тубулярного ацидозу (рис. 3.8). Крім того, при цих розладах виявляють понижений рівень калію. На відміну від зазначеного, збільшення вмісту калію часто зв'язане з гіперхлоремічним метаболічним ацидозом при нормальному або зменшеному аніонному інтервалі, що може спричинюватися недостатністю альдостерону (гіпокортицизм).

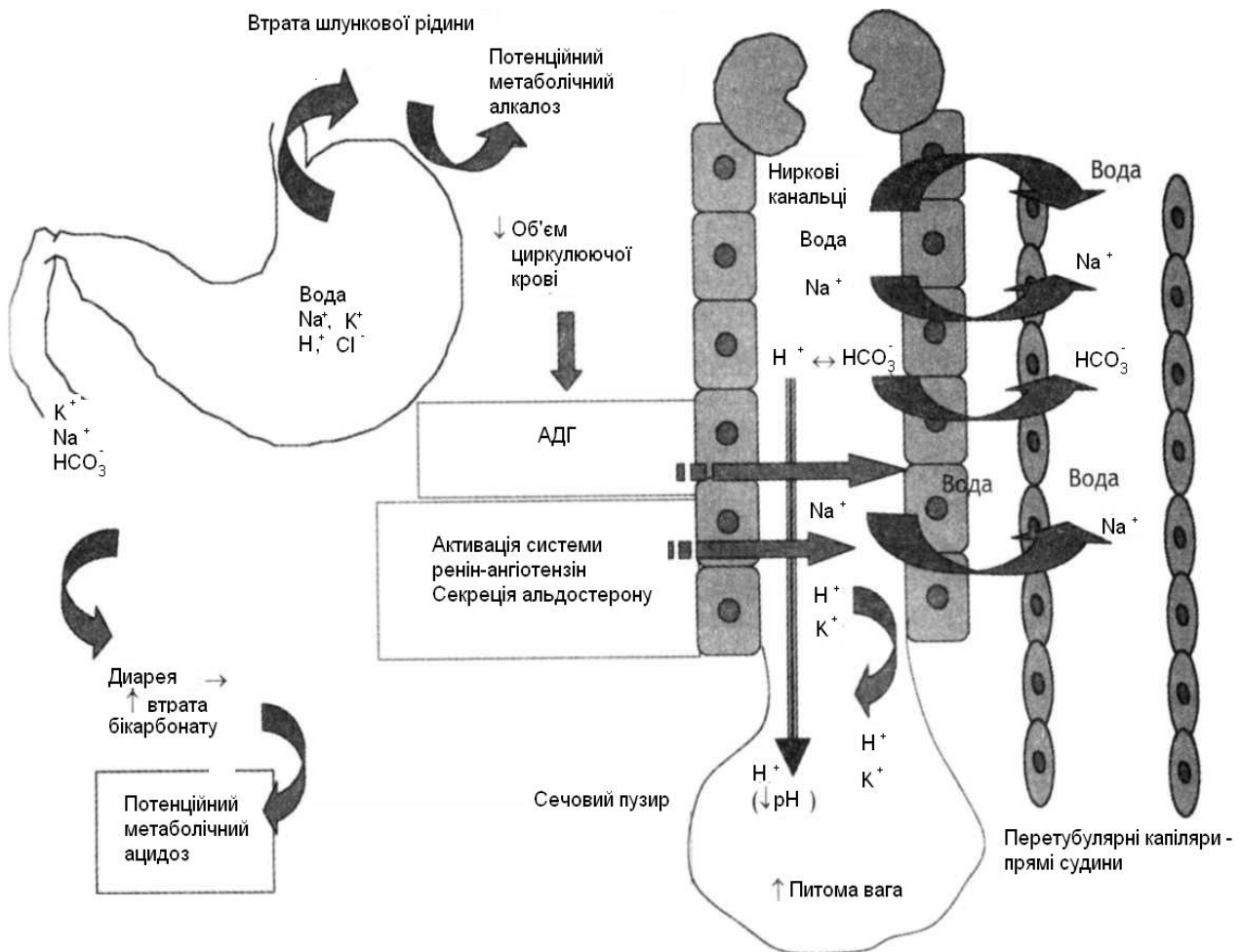


Рис. 3.8. Захворювання органів апарату травлення є частою причиною порушень балансу електролітів. Рідина, що знаходиться в шлунку, складається з води, а також з високої концентрації іонів водню (H^+) і хлориду (Cl^-) і меншим умістом іонів натрію (Na^+) і калію (K^+). Тоді як рідина, що міститься в тонкому кишечнику, багата на іони калію і бікарбонату. Блювання або секвестрація рідини в сичузі жуйних можуть призвести до розвитку метабо-

лічного алкалозу. Головними чинниками, що сприяють його підтримці, є зниження об'єму циркулюючої крові і втрата хлориду та калію. Нирки відповідають за реабсорбцію води в результаті прискорення секреції антидіуретичного гормону (АДГ) і, що найбільш важливе, реабсорбцію натрію. У нормальних умовах на рівні проксимальних каналців аніон хлориду обмінюється на іон натрію, проте у разі дефіциту останнього створюються умови, що сприяють реабсорбції бікарбонатів. У дистальних каналцях натрій в нормі обмінюється на іони Гідрогену або калію. В результаті дефіциту калію обмін Гідрогену підвищується під впливом альдостерону. Затримка бікарбонатів у нирках і підвищений обмін іонів Гідрогену призводять до додаткової їх втрати з сечею. Наслідком є ацидурія, тобто кислотно-лужний парадокс. На відміну від цього, тимчасове підвищення секреції кислоти, що обумовлено хімічним складом корму, призводить до появи надлишку бікарбонатів у крові, явище, що отримало назву *лужного підйому*. Фізіологічна відповідь нирок полягає в прискореній екскреції бікарбонатів (лужна сеча).

Електроліти в сечі визначають шляхом розрахунку величини їх парціальної екскреції (FE):

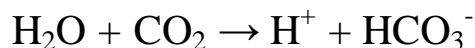
$$FE (\%) = \frac{\text{електроліти в сечі (мекв/л)} : \text{електроліти в сироватці (мекв/л)}}{\text{креатинін в сироватці (мг/100 мл)} : \text{креатинін в сечі (мг/100 мл)}} \times 100.$$

Кислотно-лужна рівновага (КЛР) – це співвідношення концентрації водневих та гідроксильних іонів у біологічних рідинах. Активна реакція рідин організму характеризується концентрацією водневих іонів, вираженою в нМ, або водневим показником *pH* – від'ємним десятковим логарифмом цієї концентрації. У нормі він становить 7,35–7,45. Регуляторними системами, що забезпечують сталість pH крові, є буферні системи крові та тканин й видільні системи організму. До останніх насамперед належать діяльність легень і видільна функція нирок.

Буферна властивість – це здатність протидіяти змінам pH при внесенні до системи лугів або кислот. Середня норма pH крові – 7,4, в еритроцитах – 7,19.

Найважливіші буферні системи крові: бікарбонатна, фосфатна, протеїнова й особливо гемоглобінова.

Бікарбонатна – могутня і найбільш керована система позаклітинної рідини. Їй належить 10 % усієї буферної ємності крові.



При нормальному рН концентрація іонів бікарбонату у плазмі крові перевищує концентрацію CO_2 майже в 20 разів.

Механізм буферної дії цієї системи полягає в тому, що при надходженні в кров великої кількості кислих продуктів водневі іони H^+ взаємодіють з іонами бікарбонату HCO_3^- це сприяє утворенню вугільної кислоти H_2CO_3 , яка дегідратується до вуглекислого газу, що виділяється через легені в результаті їх гіпервентиляції.

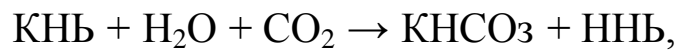
Якщо ж у крові зростає кількість лугів, то вони взаємодіють зі слабкою вугільною кислотою, утворюючи іони бікарбонату й воду. При цьому рН не зрушується. Відбувається затримання в плазмі деякої кількості CO_2 завдяки гіповентиляції легень.

Фосфатна буферна система має значення в тканинах нирок і таких біологічних рідинах, як сеча й соки травних залоз. На її частку припадає лише 1 % буферної ємності крові. Роль кислоти в цій системі виконує однозаміщений фосфат – NaH_2PO_4 , а роль солі – двозаміщений фосфат Na_2HPO_4 (гідрофосфат). У крові відношення NaH_2PO_4 : Na_2HPO_4 складає 1:4 (рН = 7,4). Ця буферна пара здатна впливати на зміни рН в інтервалі від 6,1 до 7,7.

Протеїнова буферна система утворюється завдяки наявності в молекулах протеїнів $-\text{COOH}$ і $-\text{NH}_2$. Ця система ефективна при рН крові – 7,2–7,4. Разом із бікарбонатною білкова буферна система є головною буферною системою організму.

Гемоглобінова буферна система – найпотужніша. Вона сягає 95 % буферної ємності крові. Гемоглобін бере участь у транспортуванні кисню й вуглекислого газу. При насиченні киснем гемоглобін стає сильнішою кислотою (HNB^+O_2), а коли віддає кисень, стає дуже слабкою органічною кислотою (HNB).

Гемоглобінова система складається з донора протонів ННЬ (слабка органічна кислота) і калієвої солі гемоглобіну КНЬ (акцептор протонів).



тобто утворюється бікарбонат і слабка органічна кислота. Саме вони підтримують рН крові. Ця система і нейтралізує CO_2 , якого у венозну кров надходить дуже багато. Потрапляючи в капіляри легень, ННЬ перетворюється на оксигемоглобін ННЬO_2 , що сприяє підкисленню крові і поступовому підвищенню *лужного резерву крові (ЛРК)*, здатності крові зв'язувати CO_2 . При порушенні ЛРК буває два стани:

- 1) ацидоз;
- 2) алкалоз.

Стани ацидозу й алкалозу не обов'язково проявляються змінами рН крові. Це залежить від ступеня виразності компенсаторних реакцій органів виділення. За зміною рН стоять зрушення в кількості вуглекислоти чи лугів, на які необхідно зважати для більш точної характеристики стану кислотно-лужної рівноваги.

Ацидоз і алкалоз бувають дихальний (респіраторний) та метаболічний (нереспіраторний).

Респіраторний ацидоз може спричинитися зменшенням хвилинного об'єму дихання, наприклад, при бронхіті, бронхіальній астмі, емфіземі легень, недостатності кровообігу, асфіксії (табл. 3.16).

Таблиця 3.16. Причини респіраторного ацидозу

1.	Серцево-легенева блокада
2.	Порушення функції легень: обструкція дихальних шляхів, хвороби паренхіми легень, пневмоторакс
3.	Анестезія, застосування агентів, що пригнічують центральну нервову систему

Респіраторний ацидоз може виникати також при захворюваннях, що супроводжуються порушенням дифузії газів через альвеолярну мембрану (хронічний дифузійний інтерстиційний фіброз, альвеолярний протеїноз, легеневий саркоїдоз тощо).

На ранніх стадіях цих захворювань газообмін може бути посилений через компенсаторну гіпервентиляцію, але потім $p\text{CO}_2$ поступово наростає. Ці патологічні стани ведуть до гіповентиляції легень та гіперкапнії (гіперкарбозу), тобто накопичення CO_2 в організмі. Це призводить, у свою чергу, до зменшення спорідненості гемоглобіну до Оксигену тканин, тобто до гіпоксії.

Розвиткові цього стану заважають буферні системи крові, зокрема бікарбонатний буфер. Легені компенсують стан ацидозу прискоренням дихальних рухів – задишкою. Гострий дихальний ацидоз при обмеженні легеневої вентиляції супроводжується збільшенням вмісту CO_2 , зниженням рН і підвищенням концентрації Калію в плазмі крові. При хронічному дихальному ацидозі спостерігається гіперхлоремія, підвищення ЛРК; вміст Натрію може бути зниженим, Калію – нормальним, а рН плазми – на межі або нижче норми.

Нереспіраторний (метаболічний) ацидоз викликається збільшенням у крові вмісту органічних кислот унаслідок порушень проміжного обміну органічних речовин. Часто пов'язаний з первинним порушенням обміну речовин при діабеті, голодуванні, пропасниці, при гіпоксії внаслідок порушення кровообігу (табл. 3.17).

Крім посиленого утворення органічних кислот, причиною нереспіраторного ацидозу може бути недостатнє виділення або нейтралізація цих метаболітів через ураження нирок або кишечника.

При нереспіраторному ацидозі значно знижена концентрація бікарбонату крові, зменшений вміст CO_2 в альвеолярному повітрі; легенева вентиляція прискорена, кислотність і концентрація аміаку в сечі збільшені.

Стан ацидозу нерідко вимагає термінового купірування за допомогою різних засобів, що викликають залуження крові, зокрема бікарбонату.

Таблиця 3.17. Причини метаболічного ацидозу

1.	Лактоацидоз (шок, значне фізичне навантаження)
2.	Отруєння етиленгліколем
3.	Уремія
4.	Гіпокортицизм
5.	Діабетичний кетоацидоз
6.	Кетоз
7.	Надлишковий зерновий корм
8.	Некротизуючий ентероколіт у коней
9.	Отруєння саліцилатами
10.	Отруєння паральдегідом
11.	Діарея
12.	Надмірне вживання інгібіторів карбоангідрази
13.	Нирковий тубулярний ацидоз
14.	Пероральний прийом кислих агентів

Респіраторний алкалоз може бути наслідком збільшення дихальних можливостей легень, наприклад, при вдиханні чистого кисню, при компенсаторній задишці, перебуванні в розрідженій атмосфері, при анемії, отруєнні CO тощо (табл. 3.18). При пухлинах мозку, при керованому диханні може мати місце гіпервентиляція, що призводить до гіпокапнії, і внаслідок зниження вмісту вугільної кислоти в крові відбуваються зрушення в бікарбонатній буферній системі, знижується лужний резерв крові.

При респіраторному (газовому) алкалозі концентрація бікарбонатів крові зменшується, $p\text{CO}_2$ падає, легенева вентиляція прискорюється, сеча має низьку кислотність, кількість аміаку в сечі зменшується, pH – зростає.

Таблиця 3.18. Причини респіраторного алкалозу

1.	Гіпоксемія: застійна серцева недостатність, анемія
2.	Гіпервентиляція: стимуляція центральної нервової системи – ліки (отруєння саліцилатами, ксантином), біль, сепсис, викликаний грамнегативними бактеріями
3.	Надмірна штучна вентиляція

Нереспіраторний (метаболический) алкалоз виникає через втрату кислих метаболітів (невтримне блювання) і відносно збільшення лужних продуктів (табл. 3.19). Він може бути також наслідком надлишкового уведення в організм натрію бікарбонату.

Нейтралізація лужних речовин здійснюється шляхом реакції з вуглекислою. При нирковому механізмі компенсації негазового алкалозу має місце виведення надлишку бікарбонатів та двозаміщених фосфатів.

Таблиця 3.19. Причини метаболического алкалозу

1.	Блювання
2.	Секвестрація рідини в першому або четвертому відділі шлунку (жуйні)
3.	Надмірне вживання діуретиків, тіазидів
4.	Надмірне введення бікарбонату натрію
5.	Підвищене потовиділення у коней
6.	Первинний гіперальдостеронізм

Метаболическі зміни при негазовому алкалозі проявляються в збільшенні концентрації бікарбонатів і pCO_2 . Легенева вентиляція уповільнена, кислотність сечі знижена.

Питання для самоконтролю

1. Біологічна роль води в організмі.
2. Вміст води в різних органах і тканинах організму.

3. Потреба організму у воді.
4. Усмоктування і виділення води.
5. Регуляція водного обміну.
6. Патологія обміну води: гіпер- та гіпогідратація (дегідратація).
7. Позитивний та негативний водний баланс, причини його виникнення.
8. Інтра-, екстрацелюлярна дегідратація, їх характеристика.
9. Інтра-, екстрацелюлярна гіпергідратація, їх характеристика.
10. Осмотичний тиск, його визначення.
11. Причини змін перезполоділу електролітів між внутрішньо- і позаклітинною рідиною.
12. Поняття про КЛР.
13. Характеристика буферних систем крові: гідрокарбонатної, протеїнова, гемоглобінової, фосфатної.
14. Ацидоз та алкалоз, їх характеристика.

3.2.7. Гемоглобінопатії та їх лабораторна діагностика

На сучасному етапі клініко-лабораторних досліджень крові одним із обов'язкових показників, який підлягає визначенню є гемоглобін. Це пов'язано із значним поширенням серед сільськогосподарських тварин різноманітної за етіологією і клінічним проявом гемоглобінопатії, що вдається діагностувати тільки при лабораторному дослідженні крові від таких тварин.

Гемоглобін – це основна складова еритроцитів. Він складається з протеїну *глобіну* (96 %) і простетичної групи – *гему* (4 % маси молекули). Глобін містить чотири поліпептидні ланцюги, які можуть мати різний склад, відрізнятися один від одного співвідношенням амінокислот і їх послідовністю в поліпептидному ланцюзі, а також співвідношенням пептидних ланцюгів. Гем у всіх типах гемоглобіну однаковий. Кожен з поліпептидних ланцюгів глобіну з'єднаний з одним гемом. Отже, молекула гемоглобіну містить чотири поліпептидні ланцюги і чотири геми. Гем за хімічною структурою представлений порфіриновим кільцем, яке

складається з чотирьох пірольних ядер, що з'єднані між собою метиновими містками (протопорфірин IX). У структурі гему порфіринове кільце зв'язане з двовалентним залізом. Слід відзначити, що гем може бути простетичною групою не тільки гемоглобіну, але й міоглобіну (червоної речовини м'язів), каталази, пероксидази та системи цитохромів.

Усе це зумовлює фізіологічні та патологічні різновиди гемоглобінів. До фізіологічних гемоглобінів відносять: *гемоглобін дорослої тварини (HbA)*, *примітивний (HbP)*, *фетальний (HbF)*. Основна його функція – транспорт газів.

Так, у ембріонів еритробласти жовточного мішка, печінки і крові мають однаковий “примітивний” тип гемоглобіну (ξ - і ϵ -ланцюги). Надалі, ξ -ланцюги майже повністю замінюються α -ланцюгами, в той час, як ϵ -ланцюги ще синтезуються у значній кількості. У плідний період онтогенезу еритробласти печінки продукують вже незначну кількість ϵ -ланцюгів, переважає синтез γ -ланцюгів (утворюється фетальний гемоглобін – HbF). Під кінець плідного періоду в еритроблестах печінки починається синтез β -ланцюгів, які входять до складу дорослого типу гемоглобіну (HbA). Отже, у крові плодів переважно міститься фетальний тип гемоглобіну (від. лат. *fetus* – плід), який складається із двох α - і двох γ -поліпептидних ланцюгів. У крові дорослої тварини його вміст становить не більше 1,5 % від загального гемоглобіну. У новонароджених тварин він досягає 80 % від загального гемоглобіну. До кінця першого місяця життя HbF майже повністю замінюється на HbA (від лат. *adultus* – дорослий), який складається із двох α - і двох β -поліпептидних ланцюгів.

Як відомо, здатність крові до зв'язування Оксигену залежить в основному від фізико-хімічних властивостей молекули гемоглобіну і її оточення, які визначають кисневу місткість гемоглобіну і характер *кривої дисоціації оксигемоглобіну (КДО)*.

Важливою особливістю гемоглобіну як дихального пігменту крові є його здатність змінювати свою функціональну активність при зміні концентрації іонів водню. Як відомо, залежність спорідненості гемоглобіну до Оксигену від рН середовища називається *ефектом Бору ($\Delta \log P50 / \Delta pH$)*, причому у діапазоні

pH від 6,0 і вище розміщений лужний ефект Бору, а при pH менше 6,0 – кислий. Встановлено, що ефект Бору для розчинів з HbF і HbA при pH 7,2–6,5 становить 0,48. Однак у більш кислому середовищі при pH 7,2–6,5 ефект Бору для розчинів, які містять HbF, є вище та відповідно становить 0,51 і 0,43 для HbA.

Особливості зв'язування Оксигену мають відповідне фізіологічне значення для плоду. Так, внаслідок газообміну із материнською, величина pH у вені пуповини змінюється від 7,24 до 7,32, що забезпечує зсув КДО ліворуч і зв'язування Оксигену внутрішньо-еритроцитарним HbF, який має високу до нього спорідненість. І, навпаки, під час проходження крові у тканинних капілярах плоду відбувається зсув pH у кислий бік. Завдяки підвищеному ефекту Бору в умовах низької артеріовенозної різниці за Оксигеном HbF додатково звільнює від 19 до 38 % Оксигену. Вказане ний характер дисоціації оксигемоглобіну крові плоду має адаптивне значення в плані забезпечення переходу Оксигену через плацентарний бар'єр і його утилізацію в тканинах. У відповідь на нові умови, в яких опиняється організм після народження, відбуваються різкі кількісні і якісні зміни гемоглобіну крові.

В організмі новонароджених тварин у ранній постнатальний період розвитку відмічається цілий ряд метаболічних закономірностей та становлення багатьох фізіологічних функцій які сприяють адаптації тварин до умов зовнішнього середовища. Особливо інтенсивно функціонують у цьому напрямі метаболічні механізми, спрямовані на підтримку кислотно-лужного гомеостазу в тканинах, оскільки ссавці народжуються у стані респіраторно-метаболічного ацидозу. Це проявляється у перші години життя високою інтенсивністю функціонування ензимів мембран еритроцитів, які забезпечують надходження із тонкої кишки у кров'яне русло лужних катіонів, бікарбонатів, імунних білків, активацією окиснення вуглеводів у трикарбонному циклі в умовах переходу на легеневий тип дихання; збільшенням активності ферментів антиоксидантного захисту; транзиторною гіперволемією і поліцитемією; інтенсивною заміною ембріонального гемоглобіну на фетальний. Із стану ацидозу, наприклад, телята виходять протягом перших 24–36 год життя і в подальшому в їх крові спостерігають високий

рівень буферної ємності. Важливу роль у забезпеченні газообміну і, загалом, у підтримуванні кислотно-лужного гомеостазу в тканинах відіграє гемоглобін. Зміна співвідношення кислої та лужної його форм в умовах ацидозу і алкалозу сприяє утримуванню величини рН крові на фізіологічному рівні. Зниження вмісту гемоглобіну і величини pO_2 в крові здорових тварин на 3–5-ту добу порівняно з першою добою після народження, очевидно, зумовлено розвитком гемолітичної анемії, спричиненої розпадом фетального гемоглобіну. Депонування мінеральних речовин у тканинах плоду перед родами, в т. ч. і тих, які беруть участь у синтезі гемоглобіну і контролюють його, інтенсивне надходження пластичного матеріалу з молозивом в організм новонароджених телят та висока буферна ємність крові сприяють завершенню процесу заміни гемоглобіну типу F на тип A. Збільшення вмісту гемоглобіну і насиченості крові Оксигеном у здорових тварин відмічається на 20-ту добу після народження.

У нормі гемоглобін крові становить, г/дм³: велика рогата худоба – 95–125, коні – 90–135, свині 90–110, собаки – 110–170 і коти – 100–140.

Зниження рівня гемоглобіну в крові спостерігають при анеміях, найчастіше при залізодефіцитній. Це характерно для гострої крововтрати, гіпопластичній анемії на стадії гемолітичного кризу.

Підвищення вмісту гемоглобіну в крові при мієлопроліферативних захворюваннях і симпатичних еритроцитозах.

Перетворення гемоглобіну в організмі тварин

Середня тривалість життя еритроциту становить 120 діб, після чого він руйнується із вивільненням гемоглобіну, котрий підлягає подальшому розпаду. Розпад гемоглобіну переважно відбувається в клітинах системи мононуклеарних фагоцитів (СМФ), а саме, купферових клітинах печінки та селезінки. Цей процес можливий і в гістіоцитах сполучної тканини будь-якого органу. Тому гемоглобін перетворюється у жовчні пігменти скрізь, де є місце виходу крові з кров'яного русла.

Хімізм руйнування гемоглобіну в організмі тварин є добре вивченим. Початковим етапом розпаду гемоглобіну є розрив одного

метинового містка протопорфіринового кільця і перехід атома Феруму з двовалентного стану у тривалентний. При цьому утворюється сполука зеленого кольору, яку називають *вердоглобін*. У подальшому від молекули вердоглобіну відщеплюється атом Феруму і глобін. Утворюється безбарвна сполука – *білівердин*, який являє собою ланцюг з чотирьох кілець, зв'язаний метиновими містками. Білівердин відновлюється шляхом приєднання атомів Гідрогену за місцем вільних подвійних зв'язків біля атома Карбону та Нітрогену третього пірольного кільця і утворюється власне *білірубін*. Ця речовина червоно-коричневого кольору, нерозчинна у воді, дуже токсична для організму, особливо нервових клітин. Білірубін, який утворюється у клітинах СМФ на периферії, зв'язується з білком плазми крові – альбуміном і током крові транспортується у печінку для подальших перетворень. Ця транспортна функція альбуміну у відношенні до білірубіну дуже суттєва для видалення білірубіну з тканин і загалом з організму. Будь-які, процеси, що спричиняють зниження концентрації альбуміну в крові, викликають порушення у доставці білірубіну до печінки і накопичені його в тканинах та у крові. Зв'язок білірубіну з альбуміном не знижує його токсичність, а лише забезпечує транспортну функцію білірубіну в крові. Така форма білірубіну називається вільним, некон'югованим або непрямим білірубіном. Назва «непрямий» білірубін обумовлена типом хімічної реакції, якою визначають концентрацію білірубіну в крові. Ця фракція білірубіну не вступає у безпосередню взаємодію з діазореактивом. Реакція відбувається тільки після обробки вільного білірубіну будь-яким реагентом, який переводить його у розчинний стан (наприклад, спирт або кофеїн).

У печінці вільний білірубін вибірково поглинається гепатоцитами з крові, втрачає зв'язок з альбуміном і взаємодіє (кон'югує) з глюкуроновою кислотою утворюючи білірубінглю-куроніди. Цей процес відбувається у гладких мембранах ендоплазматичного ретикулума гепатоцитів за участю ензиму УДФ-глюкуронілтрансферази і є високоенергозалежним. Кон'югацією здійснюється переведення нерозчинного білірубіну у розчинний стан, що сприяє надходженню білірубіну у складі жовчі до кишечника. Лише незначна частина білірубінглюкуроніду реекскретується в кров, де

становить не більше 25 % від загальної кількості білірубіну. В нормі білірубінглюкуронід є тією формою, яка постійно видаляється з організму. Білірубінглюкуронід називається зв'язаним, кон'югованим або прямим білірубіном, оскільки розчинність у воді сприяє його безпосередній взаємодії з діазореактивом.

Розпізнають такі види похідних гемоглобіну – *оксигемоглобін* (HbO_2), *карбгемоглобін* (HbCO_2), *карбоксихемоглобін* (HbCO) та *метгемоглобін* (MetHb).

HbO_2 – утворюється в легенях за рахунок приєднання Оксигену до гему гемоглобіну без зміни валентності Феруму.

HbCO_2 – зв'язок з вуглекислим газом утворює глобін за рахунок вільних аміногруп амінокислот.

HbCO – це стійка сполука гемоглобіну з окисем Карбону. При отруєнні чадним газом виникає смерть від задухи (не здатний зв'язувати Оксиген).

MetHb – утворюється при окисненні двовалентного Феруму у тривалентний (перехід забарвлення від червоного у коричнево-зелене). У нормі утворюється за рахунок процесів аутоокиснення (не більше 2 %). Збільшення його вмісту відмічають при отруєнні окисами Нітрогену, ціанідами. Смерть настає від асфіксії.

Вплив гіпоксії на фізико-хімічні та функціональні властивості гемоглобіну. З'ясовано, що стан гіпоксії призводить до зміни дихальної функції гемоглобіну через зміни у взаємодії його з органічними фосфатами. При цьому характерне зміщення кривої дисоціації оксигемоглобіну, свідчить про поліпшення умов для віддачі Оксигену у глибини тканин. Водночас виявлено, що за такої ситуації спостерігається перебудова у гетерогенній системі гемоглобіну, внаслідок викиду до кровотоку з кісткового мозку незрілих еритроїдових клітин, причому співвідношення гемоглобіну та органічних фосфатів у таких клітинах відрізняється від функціонально зрілих еритроцитів. Можливе також посилення синтезу фетального типу гемоглобіну та різноманітні посттрансляційні модифікації поліпептидних ланцюгів.

Незважаючи на вірогідно встановлений факт існування індукованих гіпоксією різного характеру змін фізико-хімічних влас-

тивостей гемоглобіну, питання про молекулярні механізми цих перетворень залишається відкритим.

Отже, під впливом гіпобарійної гіпоксії у системі гемоглобіну можливі два типи змін, механізм утворення яких є принципово різним.

Один з них відображає структурно-функціональний стан гемоглобіну, зумовлений конформаційними перебудовами у молекулі цього білка. Такі зміни належать до первинних і неглибоких, порівняно з тими, що мають місце за подальшого розвитку гіпоксії. У такому разі до адаптаційного процесу залучаються механізми, які пов'язані із диференціацією еритроцитів та експресією окремих глобінових генів. Водночас відмічаються швидкі (тимчасові) і стійкі зміни у конформації білка, які забезпечують модуляцію його функціональної активності. Одним із чинників швидкої структурно-функціональної модуляції гемоглобіну є зміни кислотно-лужної рівноваги крові та вуглеводного обміну в еритроцитах, насамперед рівня 2,3-дифосфогліцерату.

Гемоглобінопатії. Аномалії гемоглобінів (гемоглобінози) поділяють на *гемоглобінопатії*, в основі яких лежать спадкові зміни структури гемоглобіну і *таласемії*, що зумовлені порушенням синтезу одного з ланцюгів молекули гемоглобіну.

Гемоглобінопатії — це спадкові аномалії, пов'язані з порушенням глобіну за нормальної структури гему. Аномальні гемоглобіни різняться за своїми фізико-хімічними властивостями (електрофоретичною рухливістю, стійкістю до дії основ, розчинністю, ізоелектричною точкою).

Появу аномальних гемоглобінів пояснюють мутаційною теорією, а передавання нащадкам аномального гена здійснюється за законами спадковості. Встановлено понад 200 аномальних гемоглобінів: В (S), С, В, Е, К, L, М, N, О, Р, Q тощо, а також можливі їх комбінації (SC, SD тощо)

Гемоглобінопатії у гетерозиготній і гомозиготній формі поширені в Екваторіальній Африці, країнах Середземномор'я, на Аравійському півострові, у Південній Індії, на острові Шрі-Ланка, у Південному Китаї, південних районах США. Причину появи аномаль-

них гемоглобінів пояснюють за допомогою малярійної гіпотези, згідно з якою мутації в гені, що контролює утворення гемоглобіну, виникли в країнах зі значним поширенням тропічної малярії. Було встановлено, що наявність аномального гена в гетерозиготній формі підвищує стійкість людей до захворювання, створює імунітет до малярії, оскільки зміни молекули гемоглобіну запобігають використанню його малярійним плазмодієм.

При гемоглобінопатіях молекулярний дефект полягає у змінах первинної структури поліпептидних ланцюгів, які формують α - або β -субодиниці молекул гемоглобіну (амінокислотні заміни, делеції або вставки) з утворенням аномальних форм гемоглобінів. Такі аномальні гемоглобіни позначають великими літерами латинського алфавіту, або за місцем, де був вперше виявлений даний дефект.

HbS – мутантний гемоглобін, відкритий в 1949 році Полінгом і Утано, відрізняється від нормального гемоглобіну А тим, що в шостому положенні двох β -ланцюгів місце глутамінової кислоти займає валін. Внаслідок таких відносно невеликих змін редукована форма гемоглобіну S слабкіше і повільніше зазнає оксигенації і гірше (майже в 25 разів) розчиняється, ніж HbA.

У капілярах під час віддавання кисню гемоглобін S випадає в осад у формі веретеноподібних кристалоїдів (тактоїдів). Це породжує осмотичну нестійкість еритроцитів, зміну їх форми з двоввігнутої в серпоподібну. Серпоподібні еритроцити легко гемолізуються вже в судинному руслі. Клінічні прояви цієї хвороби змінюються від ледь помітних (гетерозиготна форма серпоподібноклітинної анемії) до тих, що спричинюють летальний кінець в ранньому віці (гомозиготні форми).

HbC – аномальний гемоглобін, у молекулі якого існує заміна залишку глутамінової кислоти в 6-му положенні β -ланцюга на лізин. Еритроцити, що містять такий аномальний гемоглобін, здатні до гемолізу, що також супроводжується розвитком анемії. Наявність гена C в гомозиготному стані призводить до розвитку вираженої спленомегалії, помірної мікроцитарної анемії. За наявності комбінації гемоглобінів C і S анемія виявляється в тяжчій формі.

HbM — існує група гемоглобінів M, в поліпептидних ланцюгах яких залишок гістидину, який бере участь у зв'язуванні гему з залізом, заміщений на іншу амінокислоту.

У гемоглобінах, які містять такий молекулярний дефект, залізо (Fe^{3+}) не може відновлюватися *метгемоглобінредуктазою* до Fe^{2+} , у зв'язку з цим в еритроцитах накопичується *метгемоглобін*, який не здатний до нормального транспорту кисню. Така метгемоглобінемія найбільш виражена в гомозиготному стані, внаслідок чого хворі гинуть в умовах тяжкої гіпоксії.

HbA_{1C} — глікозильований гемоглобін, який з'являється в еритроцитах за умов некомпенсованого цукрового діабету. Цей гемоглобін — стабільний комплекс глюкози з мінорною A_{1C} фракцією гемоглобіну, який утворюється між аміногрупою валіну - N-кінцевою амінокислотою β -глобіну і карбоксильною групою вуглеводу.

У нормі концентрація глікозильованого гемоглобіну становить 5–7 % від загальної кількості, тобто 8–10 г/л. Гіперглікемія впродовж 10–12 год сприяє збільшенню кількості глікозильованого гемоглобіну. Глікозилювання гемоглобіну підвищує його спорідненість до кисню в тканинах, крім цього, утруднює приєднання 2,3-дифосфогліцерату. У клініці показник рівня глікозильованого гемоглобіну використовують для діагностики цукрового діабету та інших порушень вуглеводного обміну.

HbD спричинює мікроцитоз, слабкий анізо - та пойкилоцитоз і зміну еритроцитів.

HbE зумовлює мікроцитоз, який компенсується розвитком еритроцитозу (до $7-8 \cdot 10^{12}/\text{л}$).

Інші гемоглобінози поширені значно менше, а їх клінічні прояви слабо виражені. У разі тяжких форм гемоглобінопатій морфологічні зміни в печінці, що виникають унаслідок гемохроматозу, можуть істотно впливати на кровоплин і супроводжуватися порушенням механізмів регуляції гемостазу.

Таласемія — спадкове захворювання, спричинене порушенням синтезу одного з ланцюгів гемоглобіну.

Якщо пригнічено синтез α -ланцюгів, то спостерігається α -таласемія, при генетичному дефекті синтезу β -ланцюгів — β -таласемія.

При всіх видах таласемій порушується продукування еритроцитів кістковим мозком і насичення гемоглобіну киснем.

В основі *α -таласемії* лежать порушення синтезу α -ланцюга, що призводять до порушення утворення всіх фізіологічних видів гемоглобіну. Ланцюги β і γ , які з'являються в надлишку, не можуть взаємодіяти з α -ланцюгами, внаслідок виникає два види гемоглобінів – $\text{Hb}\beta_4$ (HbH) і $\text{Hb}\gamma_4$ (Hb Бартса). Ці дві форми нестабільні й мають низьку спорідненість до кисню. У гомозигот гемоглобін представлений здебільшого Hb Бартса (загибель настає вже в період внутрішньоутробного розвитку). У гетерозигот наявна суміш Hb Бартса – HbH (прояви захворювання зводяться до незначного гемолізу без істотних наслідків для загального стану).

β -Таласемія зумовлюється порушенням синтезу β -ланцюгів, що призводить до відносного надлишку α -ланцюгів і посиленого утворення HbF ($\alpha_2\gamma_2$) і HbA_2 ($\alpha_2\delta_2$).

σ -Таласемія пов'язана з гальмуванням синтезу β - і σ -ланцюгів і підвищеним утворенням HbF .

Часто зустрічаються комбіновані форми гемоглобінозів, які можуть поєднуватися з дефіцитом глюкозо-6-фосфатдегідрогенази в еритроцитах, що ще більше посилює розвиток захворювання (анемії).

Лабораторна діагностика гемоглобінопатій ґрунтується на обов'язковому спеціальному електрофорезному дослідженні гемоглобіну. Це дослідження проводиться не тільки для хворого, але і для найближчих родичів. Дані електрофорезу гемоглобіну дозволяють поставити діагноз таласемії. Для α -таласемії характерно виявлення гемоглобинов гомотетрамерів HbH і Hb -Bart. Для β -таласемії характерним є підвищений вміст гемоглобіну A_2 .

Питання для самоконтролю:

1. Дослідження у крові вмісту гемоглобіну?
2. Клінічне значення гемоглобінурії?
3. Онтогенетичні зміни гемоглобіну.
4. Буферні властивості гемоглобіну.
5. Вплив гіпоксичної гіпоксії на фізико-хімічні й функціональні властивості гемоглобіну.

6. Перетворення гемоглобіну в організмі тварин.

7. Форми молекулярної патології гемоглобінів та їх лабораторна діагностика?

3.2.8. Біохімічні механізми імунної відповіді організму. Експрес-діагностика імунодефіциту в новонароджених тварин

Імунна система – анатомо-функціональна система організму вищих тварин і людини, яка виконує захисні функції щодо підтримання внутрішнього *антигенного гомеостазу*. Антигени – це високомолекулярні сполуки, які є генетично чужорідними для даного організму і викликають специфічну імунну реакцію, спрямовану на їх відторгнення та елімінацію. Антигенні властивості мають переважно біомакромолекули – білки, нуклеїнові кислоти, деякі полісахариди та, у низці випадків, синтетичні полімери. Імунна система за допомогою клітинних і гуморальних механізмів забезпечує розпізнавання, зв'язування та руйнування антигенів як інфекційного, так і неінфекційного походження.

Морфологічним синонімом імунної системи є *лімфоїдна система*. Вона складається з загруднинної залози (тимуса), селезнічки, лімфатичних вузлів і фолікулів, лімфоцитів кісткового мозку та крові. Крім лімфоцитів, у реакціях імунітету беруть участь численні білки та пептиди, що є ефекторами імунних процесів, – імуноглобуліни, компоненти системи комплементу, гормони та медіатори імунітету.

Попередниками лімфоцитів є ембріональні стовбурові клітини кісткового мозку, що утворюються на ранніх етапах внутрішньо-утробного розвитку. Вони поділяються на В- та Т-лімфоцити, останні включають *Т-кілери* (*T_k*), що зумовлюють процеси клітинного імунітету; *Т-хелпери*, що індукують проліферацію, трансформацію В-лімфоцитів; *Т-супресори* (*T_s*), що пригнічують розвиток реакцій гуморального та клітинного імунітету, сприяють формуванню стану імунологічної толерантності.

В-лімфоцити є ефекторами гуморального імунітету, попередниками антитілоутворюючих плазматичних клітин, – основних продуцентів антитіл (імуноглобулінів). Рецепторами для антигенів

на поверхні В-лімфоцитів слугують специфічні поверхневі імуноглобуліни. Взаємодія цих рецепторів з антигеном супроводжується диференціацією В-лімфоцитів у плазматичні клітини та генними транслокаціями, що призводять до формування ділянок ДНК, відповідальних за транскрипцію відповідних антитіл. Розглянута система є специфічною відносно хімічної природи антигенів і формується внаслідок взаємодії організму з чужорідними макромолекулами, тобто в процесі "імунологічного навчання".

Розрізняють також вроджену систему неспецифічного імунітету або *систему неспецифічних факторів захисту* організму, яка зумовлює однотипні клітинні та біохімічні реакції на будь-які чужорідні антигени. До неспецифічних факторів захисту належать фагоцити (макрофаги тканин, нейтрофіли та моноцити крові), система комплементу і білки "гострої фази" запалення. Ті з них, що мають бактерицидні властивості, виступають у ролі інгібіторів бактеріальних протеїназ (лізоцим, пропердин, *α*-макроглобулін, *α*₁-інгібітор протеїназ тощо) і беруть участь у реалізації реакцій фагоцитозу.

Імуноглобуліни – складні глобулярні протеїни глікопротеїдної природи, здатні специфічно зв'язуватися з антигеном, який стимулює їх утворення, тобто виявляють властивості антитіл і забезпечують гуморальний імунітет. Переважна їх кількість міститься в глобулярній фракції сироватки крові, лімфі, слині, інших рідинах організму або на поверхні клітинних мембран, де вони виконують роль рецепторів чи беруть участь у нейтралізації/руйнуванні чужих, а іноді і власних антигенів. Становлять до 20% від маси всіх білків плазми крові.

Імуноглобуліни синтезуються плазматичними клітинами, які є продуктами трансформації В-лімфоцитів, що відбувається при стимуляції імунної реакції організму на надходження чужорідних білків, клітин (мікроорганізмів, найпростіших), при інфекційних захворюваннях, за умов вакцинації, переливання крові, злякисного перетворення клітин власного організму.

Молекули імуноглобулінів – глікопротеїни, білкова частина яких є тетрамером, що складається з чотирьох поліпептидних ланцюгів: двох тяжких Н-ланцюгів (від англ. heavy – тяжкий), та

двох легких L-ланцюгів (від англ. light – легкий). У кожній окремій молекулі імуноглобуліну важкі та легкі ланцюги попарно однакові, тобто умовна формула будь-якого імуноглобуліну має вигляд H_2L_2 .

H-ланцюги імуноглобулінів складаються приблизно з 220 амінокислотних залишків, їх молекулярна маса становить 50–70 кДа, а L-ланцюги – із 110 амінокислотних залишків, їх молекулярна маса – 20–25 кДа. Окремі поліпептидні ланцюги в молекулах імуноглобулінів сполучаються між собою дисульфідними зв'язками.

Олігосахаридні залишки, що складаються з залишків манози та N-ацетилглюкозаміну, зв'язані з H-ланцюгами з боку C-кінців.

У кожному з H- або L-ланцюгів молекул імуноглобулінів можна виділити окремі *домени*, що відрізняються за структурою та мають певне функціональне значення.

Константні ділянки (C-ділянки) – домени, що характеризуються сталістю амінокислотного складу в різних класах імуноглобулінів. Вони розміщуються з C-кінців L- та H-ланцюгів і займають $\frac{1}{2}$ довжини L-ланцюга та $\frac{3}{4}$ довжини H-ланцюга (ділянки C_{H1} , C_{H2} , C_{H3}) (рис. 3.9).

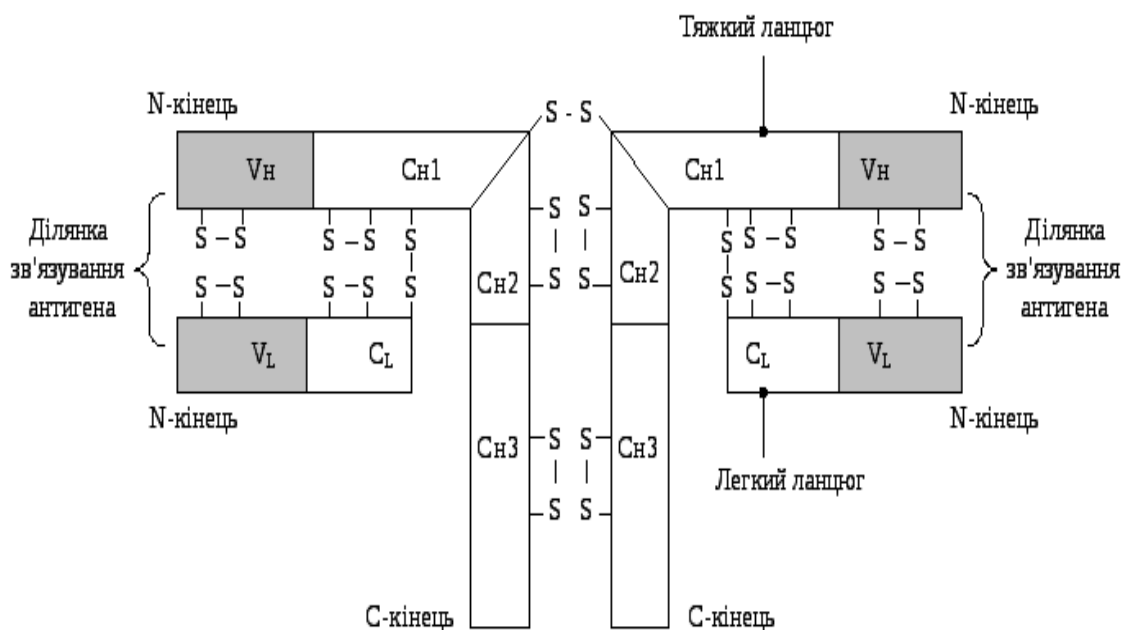


Рис. 3.9. Схема будови імуноглобуліну

Варіабельні ділянки (V-ділянки) розміщуються з N-кінців L- та H-ланцюгів. Вони займають приблизно $\frac{1}{2}$ довжини L-ланцюга (V_L) та $\frac{1}{4}$ довжини H-ланцюга (V_H) і характеризуються мінливістю амінокислотного складу. За допомогою амінокислотних залишків своїх гіперваріабельних кінцевих ділянок вони беруть участь у формуванні активного центру молекули імуноглобуліну, який за своєю конформацією комплементарний детермінантним групам антигену і забезпечує зв'язування з ним, тобто специфічність імуноглобуліну.

За умов розщеплення імуноглобулінів папаїном, яке відбувається в шарнірній частині молекули, утворюються два антигензв'язуючі фрагменти Fab (antigen binding fragment) та фрагмент, що кристалізується, – Fc.

Різні типи тяжких і легких ланцюгів у молекулах імуноглобулінів позначають літерами грецького алфавіту. Відповідно до такої номенклатури розрізняють п'ять типів H-ланцюгів (α , γ , μ , δ , ϵ) і два типи L-ланцюгів (χ , λ). Залежно від типу важкого ланцюга виділяють п'ять класів імуноглобулінів (IgA, IgD, IgE, IgG, IgM), у складі кожного з яких певний тип H-ланцюга сполучається з одним із двох типів L-ланцюга.

У біологічних об'єктах (сироватці крові, інших біологічних рідинах, тканинах) окремі класи імуноглобулінів утворюють надмолекулярні комплекси ($n = 2-5$). Основними класами імуноглобулінів крові тварин, що реалізують гуморальну імунну відповідь на вторгнення чужорідного антигену, є імуноглобуліни G та M. Імуноглобуліни A відіграють роль антитіл у складі інших біологічних рідин та секретів, а імуноглобуліни класів D та E є менш важливими компонентами сироватки крові, що виконують додаткові спеціалізовані функції в комплексі імунних та алергічних реакцій.

Імуноглобуліни класів G, A, M, D, E різняться між собою молекулярною масою, електрофоретичною рухомістю, вмістом вуглеводів та імунологічною активністю. Взаємодіючи з відповідними антитілами, імуноглобуліни утворюють імунні комплекси.

Імуноглобуліни G (IgG) – основний клас сироваткових імуноглобулінів. Із ними пов'язаний процес гуморального захисту організму від багатьох бактерій і вірусів, а також їх токсинів. Активно

транспортуються через плаценту та відіграють важливу роль у захисті організму від інфекції.

Імуноглобуліни А (IgA) синтезуються в плазматичних клітинах слизової оболонки дихальних шляхів і травного тракту та майже у всіх екскреторних залозах. Значна кількість його міститься в молозиві, слині, слюзах, а також у носовому і бронхіальному секреті. Локальний синтез IgA зумовлює місцевий імунітет (цим пояснюється висока ефективність аерозольних і пероральних імунізацій). Рівень секреторного IgA в організмі новонародженого вже через 3 тижні наближається до рівня його в дорослої тварини.

Імуноглобуліни М (IgM) – потужний активатор системи комплементу. Імуноглобулінами цього класу є холододі аглютиніни, ізогемаглютиніни. IgM першими з'являються в процесі формування імунної відповіді. Вони мають властивості бактерицидних антитіл до грамнегативних мікроорганізмів, ізогемаглютинінів, холододі аглютинінів. Вміст IgM у сироватці крові збільшується відразу після народження, досягає значного рівня в місячному віці.

Імуноглобуліни D (IgD) у низьких концентраціях виявлено в сироватці крові здорових тварин. Відомості про специфічні функції цих імуноглобулінів відсутні. Припускають, що їх поява блокує активність імуноглобулінів інших класів за конкурентним механізмом.

Імуноглобуліни E (IgE). У сироватці крові здорових тварин виявляють їх сліди. IgE плазматичними клітинами виробляється з певною специфічністю. До складу цієї фракції входять реагени, які беруть участь в алергійних реакціях. Тривалість перебування в організмі сироваткового IgE – 3 доби, мембранозв'язаних IgE – 14 діб:

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

Гіпогаммаглобулінемія виникає внаслідок виснаження іменної системи при тривалих хронічних інфекціях, лімфолейкозі,

лімфогранулематозі, мієломі, ентериті, дистрофії печінки, хворобах нирок, опіках. Після лікування цитостатиками, імунодепресантами, кортикостероїдами, хіміотерапії, опромінення розвивається *агаммаглобулінемія*.

Цитокіни. Існує значна кількість фізіологічно активних сполук, що синтезуються в імунній системі та відіграють роль міжклітинних хімічних сигналів, регулюють її активність та реалізують процеси міжклітинних комунікацій. Ці речовини отримали загальну назву *цитокінів*, або *лімфокінів*.

Цитокіни продукуються активованими лімфоцитами, макрофагами, лейкоцитами, іншими клітинами крові та сполучної тканини, які беруть участь у реакціях імунітету та неспецифічної резистентності організму в процесі запалення. Вони контролюють процеси дозрівання, функціонування та взаємодії між лімфоцитами та іншими клітинними ефекторами імунітету. Специфічними мішенями для лімфокінів є лімфоцити та макрофаги, що мають на своїй поверхні чутливі рецептори.

Гормональну внутрішньосистемну функцію виконує також загруднинна залоза (тимус), яка секретує біологічно активні субстанції (тимозини, тимопоетини, тимостимуліни тощо), що забезпечують дозрівання Т-лімфоцитів.

За хімічною природою медіатори та гормони імунної системи є білками, глікопротеїнами, низько- та високомолекулярними пептидами, які знаходяться в плазмі крові людини і здійснюють свої регуляторні функції в пікомолярних (10^{-12}) концентраціях. Значна кількість речовин, що виконують функції лімфокінів, до цього часу недостатньо охарактеризовані як індивідуальні хімічні сполуки.

На сьогодні цитокіни прийнято поділяти на інтерлейкіни, інтерферони, фактори некрозу пухлин, колонієстимулівні та трансформувальні фактори росту.

Інтерлейкіни (IL) – це група розчинних пептидів, які виконують функції імунорегуляторів локальної дії. На сьогодні виділено близько тридцяти окремих типів інтерлейкінів (IL-1 – IL-30), які різняться за структурою, фізико-хімічними властивостями та спектром біологічної активності.

Інтерферони (IFN) – група низькомолекулярних глікопротеїнів, які чинять протівірусну дію та регулюють імунні реакції. Молекулярна маса IFN в межах 16 000 – 25 000 Да.

Фактори некрозу пухлин (TNF) – цитокіни, що регулюють імунну відповідь. Володіють цитотоксичними та цитостатичними властивостями, підсилюють кілінг пухлинних клітин, активують НК-клітини, що продукуються моноцитами-макрофагами. До TNF належать TNF-a і TNF-b.

За впливом на імунну систему поділяють на два типи:

1. Цитокіни, що регулюють клітинний імунітет (ІЛ-2, ІЛ-12, ІФН- γ , ФНП- α);

2. Цитокіни, що стимулюють переважно гуморальний імунітет і послаблюють клітинний (ІЛ-4, ІЛ-5, ІЛ-6, ІЛ-10 і ІЛ-13).

3. За біологічною дією цитокіни умовно поділяють на прозапальні (ІЛ-1, ІЛ-2, ІЛ-6, ІЛ-1 β , ІЛ-12, ІФН- γ , ФНП- α) та антизапальні (ІЛ-4, ІЛ-10, ІЛ-13).

Колонієстимулюючі фактори (КСФ) – цитокіни, що стимулюють ріст кровотворних клітин (гранулоцитів, моноцитів, попередників еритроїдних клітин). Вони продукуються Т-лімфоцитами, макрофагами, моноцитами, ендотеліальними клітинами.

Трансформуючі фактори росту (ТФР) – білки, що продукуються різними класами лімфоцитів, тромбоцитами, плацентою, деякими пухлинами. Вони стимулюють процеси проліферації фібробластів, синтезу колагену та фібронектину, беруть участь в ангиогенезі, загоюванні ран. Разом із цим, ТФР пригнічують проліферацію Т- та В-лімфоцитів, активність цитотоксичних та кіперних клітин.

Слід зазначити, що активовані лімфоцити та інші імунокомпетентні клітини синтезують пептидні фактори росту, зокрема епідермальний (ЕФР), нервовий (ФРН), а також соматомедини (інсуліноподібні фактори росту ІФР-1 та ІФР-2), і різні білково-поліпептидні гормони, що свідчить про надзвичайно важливу роль імунної системи в регуляції процесів росту, проліферації та клітинного диференціювання.

Введення цитокінів у організм підвищує кількість циркулюючих лейкоцитів і температуру тіла, зумовлює метаболічні зрушен-

ня та низку інших процесів. Лікарські препарати на основі цитокінів знайшли застосування в терапії низки захворювань (наприклад, у лікуванні хворих на злоякісні новоутворення, аплазію кровотворення, різноманітні види імунопатології). Так, наприклад, введення препарату ІІ-2 при інфекційних захворюваннях відновлює здатність імунної системи адекватно здійснювати регуляторні та захисні функції (пероральне введення рекомбінантного інтерлейкіну-2 при гострих кишкових інфекціях і місцеве використання при хламідіозі та герпесі демонструє позитивні наслідки).

Молекулярні механізми протівірусної дії інтерферонів

1. Зв'язування інтерферонів із рецепторами клітин-мішеней.

Інтерферони, які секретуються в зовнішньоклітинне середовище клітинами-продуцентами, взаємодіють із специфічними рецепторами на мембранах чутливих клітин, що є передумовою генерування хімічного сигналу та його трансмембранної передачі.

2. Активація внутрішньоклітинної 2',5'-олігоаденілатсинтетази. Хімічний сигнал за допомогою внутрішньоклітинних месенджерів досягає геному зараженої вірусом клітини й індукує синтез ферменту, який утворює з молекул АТФ 2',5'-олігоаденілову кислоту (2',5'-оліго-А-синтетази). 2',5'-олігоаденілат є активатором РНКазы I, яка розщеплює односпіральні вірусні РНК (мРНК) та рибосомальні РНК, що необхідні для трансляції вірусних білків.

3. Активація внутрішньоклітинних протеїназ. Трансмембранний хімічний сигнал, генерований інтерфероном, спричиняє також активацію протеїнази, що фосфорилує білковий фактор ініціації трансляції ІІ-2. Фосфорилування фактора ініціації ІІ-2 призводить до його інактивації та блоку рибосомального синтезу вірусних білків.

Біохімічні компоненти системи комплементу. Система комплементу – одна з найважливіших складових природженого імунітету. Її компоненти включаються в низку процесів, спрямованих на забезпечення нормального розвитку та функціонування імунної системи: антибактеріальний захист, фагоцитоз, виведення імунних комплексів, контроль запалення, хемотаксис лейкоцитів, участь в

автоімунних процесах і реакціях гіперчутливості. За хімічною природою ця система належить до термолабільних сироваткових білків, які становлять 5–10 % від загальної кількості білків плазми крові. Вони синтезуються здебільшого в печінці. Для позначення всіх компонентів комплементу (інгібіторів, регуляторів і рецепторів) запроваджена єдина класифікація. Дев'ять основних білків комплементу позначені літерою «С» (від англ. Complement) і цифрою (С1 – С9; причому С1 складається з трьох білків: С1q, С1r і С1s), а пептиди, що від них відщеплюються літерою «b» (основний, має два центри зв'язування: один для з'єднання з рецептором на клітинній мембрані, інший володіє активністю фермента для розщеплення наступного компонента) і «a» (мінорний, забезпечує хемотаксис і слугує медіатором запалення). Інактивовані компоненти мають префікс «i». Компоненти формують активні ферменти, для позначення яких використовують риску над назвою фактора.

Активація системи комплементу реалізується за одним із механізмів: класичним, альтернативним чи лектиновим.

Класичний шлях запускається імунними комплексами (аг-ат), на яких агреговані IgM або IgG. Процес розпочинається зі зв'язування Ca^{2+} -залежного компонента С1q з молекулою імуноглобуліну, що сприяє почерговому активуванню С1r і С1s. Останній розщеплює компонент С4 на дві частини (С4a і С4b), з яких перша деградує, а друга утворює комплекс з С1. Далі відбувається розщеплення компонента С2 на активний фрагмент С2a (конвертазу) і залишок С2b, який деградує. Утворений комплекс С1 С4b С2a приєднує компонент С3, який теж розпадається на С3a (сприяє вивільненню гістаміну з гранул різних клітин) і С3b. Так утворюється асоціат С1 С4b С2a С3b з протезною активністю, в якому С3b може взаємодіяти з мембраною мікроорганізму. Така взаємодія викликає приєднання лейкоцитів і фагоцитоз. Далі відбувається зв'язування С5, який розпадається на анафілаксин С5a і приєднувану частину С5b. Після послідовного зв'язування С6 і С7 утворюється комплекс С5b,6,7, який послідовно асоціюється з С8 і С9 і вбудовується в ліпідний шар мембрани мікроорганізму, викликаючи її локальне ушкодження та порушення осмотичної рівноваги, що призводить до загибелі клітини.

Альтернативний шлях ініціюють полісахариди мембран бактерій, дріжджів, рослин. Він розпочинається з С3 компонента комплексу, необхідною за цих умов є участь білків пропердинової системи, яка складається з білка пропердину, збагаченого гліцином фактора В і протеази D. У результаті низки біохімічних перетворень утворюється комплекс пропердину, С3b і фактора В, який являє собою С3-конвертазу і послідовно зв'язує С5 – С9, як описано в класичному шляху.

Лектиновий шлях системи комплексу здійснюється через лектин. Активування розпочинається з взаємодії останнього з манозною групою, яка входить до складу полісахаридів мембрани мікроорганізму з подальшою активацією серинових протеїназ і залученням компонентів класичного каскаду.

Система комплексу бере участь не лише в реалізації імунної відповіді, їй також належить провідна роль у розвитку таких імуннопатологічних реакцій, як анафілаксія (С3а), автоімунні захворювання.

Колонієстимулюючі фактори (КСФ) – цитокіни, що стимулюють ріст кровотворних клітин (гранулоцитів, моноцитів, попередників еритроїдних клітин). Вони продукуються Т-лімфоцитами, макрофагами, моноцитами, ендотеліальними клітинами.

Трансформуючі фактори росту (ТФР) – білки, що продукуються різними класами лімфоцитів, тромбоцитами, плацентою, деякими пухлинами. Вони стимулюють процеси проліферації фібробластів, синтезу колагену та фібронектину, беруть участь в ангиогенезі, загоюванні ран. Разом із цим, ТФР пригнічують проліферацію Т- та В-лімфоцитів, активність цитотоксичних та кіперних клітин.

Слід зазначити, що активовані лімфоцити та інші імунокомпетентні клітини синтезують пептидні фактори росту, зокрема епідермальний (ЕФР), нервовий (ФРН), а також соматомедини (інсуліноподібні фактори росту ІФР-1 та ІФР-2), і різні білково-поліпептидні гормони, що свідчить про надзвичайно важливу роль імунної системи в регуляції процесів росту, проліферації та клітинного диференціювання.

Введення цитокінів у організм підвищує кількість циркулюючих лейкоцитів і температуру тіла, зумовлює метаболічні зрушення та низку інших процесів. Лікарські препарати на основі цитокінів знайшли застосування в терапії низки захворювань (наприклад, у лікуванні хворих на злоякісні новоутворення, аплазію кровотворення, різноманітні види імунопатології). Так, наприклад, введення препарату ІЛ-2 при інфекційних захворюваннях відновлює здатність імунної системи адекватно здійснювати регуляторні та захисні функції (пероральне введення рекомбінантного інтерлейкіну-2 при гострих кишкових інфекціях і місцеве використання при хламідіозі та герпесі демонструє позитивні наслідки).

Імунодефіцитні стани. Порушення у функціонуванні імунної системи – імунодефіцитні стани – розвиваються за умов пошкоджень окремих ланок клітинного або гуморального імунітету. За механізмом походження виділяють *первинні* та *вторинні імунодефіцити*.

Первинні імунодефіцитні стани (ПІД). Первинні імунодефіцитні стани (ПІД) – це група тяжких генетично детермінованих захворювань, викликаних порушенням одного або декількох імунних механізмів захисту. Більшість цих станів дебютують в ранньому віці підвищеною схильністю до інфекційних захворювань. У даний час у медицині описано понад ста форм ПІД, частота їх виникнення становить в середньому 1:10000.

Розрізняють чотири класи первинних імунодефіцитів, що характеризують неповноцінність окремих основних компонентів імунної системи:

1. В-клітинна недостатність (дефіцит антитіл).
2. Т-клітинна недостатність.
3. Патологія клітин, які фагоцитують.
4. Патологія системи комплементу.

Вторинні імунодефіцити Вторинні імунодефіцити – патологічні стани, що розвиваються внаслідок ушкодження окремих ланок клітинного або гуморального імунітету патогенними факторами біологічного, хімічного або фізичного походження. Найчастіше

вони розвиваються при дії на організм тварини лімфотропної вірусної інфекції, токсичних факторів, іонізуючої радіації.

Полімеразна ланцюгова реакція (PCR) – найсучасніший метод діагностики лейкозу в тварин, що базується на ампліфікації РНК вірусу. Його головною перевагою є висока чутливість, що дозволяє визначити мінімальну кількість нуклеїнових кислот. Проте висока чутливість не дозволяє застосовувати цей метод для дослідження проб, забруднених іншими мікроорганізмами. У зв'язку з цим PCR проводять тільки у високоспеціалізованих лабораторіях із суворим дотриманням умов стерильності. PCR належить до кількісних методів дослідження вірусного генома, тому може використовуватись для оцінки ефективності лікування.

Спадкові дефекти нейтрофілів

До спадкових дефектів нейтрофілів відносяться синдром Чедіака-Хігасі у деяких видів тварин, дефіцит молекул адгезії (β_2 -інтегринів) у собак і великої рогатої худоби, недостатність бактерицидної активності нейтрофілів у собак і циклічний гемопоез у сірих коллі.

Тяжкий комбінований імунодефіцит

Синдроми тяжкого комбінованого імунодефіциту (ТКІД) характеризуються недостатністю продукції Т- і В-лімфоцитів. У арабських коней ТКІД успадковується за аутосомно-рецесивним типом. У хворих лошат число лімфоцитів в крові різко понижене або вони відсутні, спостерігається гіпоплазія первинних і вторинних лімфоїдних органів, здатність продукувати антитіла втрачено унаслідок відсутності зрілих Т- і В-лімфоцитів. Дефект утворення зрілих лімфоцитів обумовлений мутацією в гені, що кодує каталітичну субодиницю ДНК-залежної протеїнази (ДНК-ПК). Ця протеїназа необхідна для процесу перебудови генів, в результаті якої формуються антигенспецифічні рецептори Т- і В-лімфоцитів. Сироватка здорових новонароджених лошат, отримана до першого годування, містить деяку кількість IgM, але у лошат з ТКІД IgM не визначається. Якщо такі лошата незабаром після народження починають нормально харчуватися молозивом, то вони

отримують імуноглобуліни від матері і в цілому виглядають здоровими. Але після руйнування материнських імуноглобулінів в їх організмі, уражені ТКІД лошата, стають сприйнятливими до найрізноманітніших інфекцій і як наслідок гинуть у віці 4-6 місяців.

Нещодавно з'явилися відомості про ТКІД у джекрассел-терьерів. Як і при ТКІД у лошат арабських коней, хворі цуценята також мали спадковий аутосомно-рецесивний дефект каталітичної субодиниці ДНК-ПК. У цих цуценят виявлені глибока лімфопенія, зниження концентрації сироваткових імуноглобулінів і гіпоплазія всіх лімфоїдних органів. Хворі ТКІД цуценята зазвичай гинуть, досягнувши віку 8-14 тижнів.

У собак порід бассет і кардиганвельш-коргі описаний Х-зв'язаний синдром ТКІД. Хворі пси не ростуть, проявляють підвищену чутливість до бактерійних і вірусних інфекцій, у них відсутні пальповані периферичні лімфовузли і тварини як наслідок гинуть у віці 4 місяців, якщо їх не утримувати в стерильному приміщенні. Тварини не продукують IgG і IgA, проте вміст IgM в їх сироватці нормальний. Абсолютне число лімфоцитів в крові зменшене або знаходиться в нижній межі норми. Відсоток В-лімфоцитів зазвичай не змінений, а відсоток Т-лімфоцитів варіює від нуля до норми. Лімфоцити крові не відповідають на Т-клітинні мітогени. Встановлено, що причиною Х-зв'язаного ТКІД у собак є мутації гена, що кодує загальний γ -ланцюг, важливий компонент рецепторів різних інтерлейкінів – ІЛ-2, ІЛ-4, ІЛ-7, ІЛ-9 і ІЛ-15.

Недостатність сироваткових імуноглобулінів

Зниження концентрації імуноглобулінів в сироватці людини і тварин може бути обумовлене різними розладами. Варіабельний некласифікований імунодефіцит у людини (ВНІ) характеризується зниженням рівня сироваткових імуноглобулінів (IgG, IgA і/або IgM) і підвищеною чутливістю до інфекцій. Число В-лімфоцитів в крові, як правило, знаходиться в нормі, але у деяких пацієнтів виявляють дефект дозрівання В-лімфоцитів до плазматичних клітин. У інших випадках відзначають дефіцит Т-хелперів або надлишок цитотоксичних Т-лімфоцитів. Симптоми захворювання зазвичай з'являються в ранньому віці.

Описаний випадок ВНІ у 12-річного скакового коня, який характеризується персистою множинною опосередкованою бактерійною інфекцією і значним зниженням змісту IgG, IgG(T), IgM і IgA в сироватці. Загальне число лімфоцитів було нормальним, проте в крові В-лімфоцити не визначалися, а їх число в лімфовузлах і кістковому мозку було помітно знижене. Відсутність зміни загального числа лімфоцитів в крові може бути зв'язане з тим, що В-лімфоцити складають лише незначну їх частину. У коней описані імунодефіцитні стани з падінням рівня IgG одного або декількох типів, що відображає існування різних варіантів ВНІ. Це захворювання було зареєстроване у 7 молодих (вік менше 1 року) карликових такс з пневмонією. З порушень імунного статусу у цих тварин відмічені відсутність В-лімфоцитів в лімфовузлах, зниження концентрації імуноглобулінів усіх класів в сироватці крові і аномальна відповідь лімфоцитів крові на мітогени. Схожі порушення виявлені у молодого бордоського дога.

Є дані про подібний ВНІ у собак породи шарпей. Підвищена чутливість до інфекцій у цих собак виникає приблизно з трирічного віку. У них виявлені порушення з боку В- і Т-лімфоцитів і зниження концентрації імуноглобулінів одного або більше класів (IgG, IgM або IgA) в сироватці. Подібний же дефіцит сироваткових IgA і IgG відмічений у цуценят веймаранерів і ротвейлерів.

Х-зв'язана агаммаглобулінемія виявлена у лошат чистокровних і упряжних коней, у яких була відсутня визначена кількість В-лімфоцитів. У домашніх тварин описані імунодефіцитні стани з вибірковою недостатністю імуноглобулінів того або іншого класу. Таких як дефіцит IgM у коней і собак, дефіцит IgG у лошат, дефіцит IgG у великої рогатої худоби і дефіцит IgA у собак.

Транзиторна гіпогаммаглобулінемія може виникнути у тварин раннього віку, якщо зникають отримані від матері антитіла. Це відбувається приблизно до 2 місячного віку, продукція власних IgG і IgM у них затримується. Тварини стають сприятливими до бактерійних інфекцій до тих пір, поки їх імунна система не досягне повного розвитку (приблизно до 6-місячного віку).

Дефіцит комплементу

У англійських спанієлів описаний дефіцит третього компоненту комплементу (С3), успадкований як аутосомно-рецесивна ознака. У гомозиготних за цим дефектом тварин розвиваються рецидивуючий сепсис, пневмонія і ранові інфекції. У собак з дефіцитом С3 понижена гуморальна імунна відповідь як на Т-залежні, так і незалежні антигени.

Недостатність антивірусного імунітету

У тварин виявлено ряд розладів, обумовлених недостатністю антивірусного імунітету, і тут ми назвемо лише небагато з них. Це, перш за все, синдром придбаного імунодефіциту кішок, що викликається FIV. Симптоми інфекції у тварин можуть не виявлятися протягом місяців і декількох років, а потім виникає важке хронічне запальне захворювання, що характеризується підвищеною чутливістю до інфекції. Такий стан обумовлений нейтропенією, лімфопенією або поєднанням обох розладів, а також зниженням числа CD4⁺-Т-лімфоцитів. Подібний же синдром відомий у приматів, у яких збудником захворювання є вірус імунодефіциту мавп, SIV (англ. simian immunodeficiency virus).

Котячий вірус лейкозу FeLV, володіє вираженою імуносупресивною дією. У хронічно інфікованих кішок часто виявляють нейтропенію, лімфопенію або і те і інше. Важко уражені функції Т-лімфоцитів, але функція В-лімфоцитів лише слабо порушена. FeLV-позитивні кішки схильні різноманітних вторинних інфекцій. З вірусних інфекцій, які індукують вторинний імунодефіцит з падінням числа Т-лімфоцитів, В-лімфоцитів або клітин обох типів, можна назвати собачу чуму, інфекцію плодів, що викликається вірусом кінського герпесу і вірусну діарею великої рогатої худоби у телят.

Колостральний імунітет новонароджених

Сутність терміну «колостральний імунітет» заключається в тому, що з молозивом (colostrum) матері, у перші години життя, новонароджена тварина отримує максимальну кількість антитіл, які є природними факторами захисту і нагадують пасивну пероральну імунізацію. У молозиві (порівняно з молоком) у 3 рази більше протеїну, 80 % якого складають імуноглобуліни (материнські антитіла). Останніх у молозиві у 10–12 разів більше, ніж у крові. Частина антитіл надходить у молозиво з крові, а інша – виробляється плазматичними клітинами молочної залози. Впродовж перших 1–3 днів життя у травному тракті новонароджених імунні білки молозива не піддаються ензимному гідролізу. Протягом перших годин життя у шлунковому соці відсутня вільна хлористоводнева кислота, що обумовлює виокі значення його рН 6,0–6,5, аналогічні активній реакції кишкового соку (через знижений вміст бікарбонатів), а тому пептидази травних соків залишаються неактивними, внаслідок дефіциту їх активаторів і специфічної дії інгібіторів молозива. Це сприяє засвоєнню антитіл у тонкому кишечнику в нативному вигляді. Антитіла матері руйнуються в організмі новонароджених ссавців упродовж перших місяців життя. Продукти їх розщеплення ініціюють розвиток власної імунної системи організму, що відбувається впродовж перших чотирьох – п'яти місяців життя.

Нині вже неодноразово підтверджено дані 80–90 рр. про те, що формування імунорезистентного стану організму розпочинається ще у пренатальний період розвитку тварин. Трансплацентарна передача імуноглобулінів (Ig) від матері до плоду в тварин різних видів залежить, перш за все, від епітеліохоріального типу плацентарного бар'єра.

Згідно матеріалів зарубіжних та вітчизняних науковців, у гризунів і приматів, зокрема людини, пасивний імунітет формується внаслідок прямого переходу антитіл матері з крові крізь плацентарний бар'єр до плода, а після родів – у складі молозива до новонародженого. Проникність плаценти для антитіл різних класів неоднакова. Ig класів М та Е практично не проходять крізь плаценту, а класу А – лише частково. Водночас Ig G (особливо субклас G₁)

має високу здатність транспортуватися через плацентарний бар'єр, що зумовлено особливою будовою Fc-фрагмента його молекули. У великої рогатої худоби наявність епітеліохоріального типу плаценти передбачає інший, особливий шлях імунізації новонародженого організму, який полягає у передачі їм нативних Ig із молозивом матері. Тому молозиво є єдиним джерелом материнських Ig, що забезпечують захист новонароджених телят у неонатальний період розвитку. Макси-мальна концентрація антитіл у ньому виявляється в перші дні після отелу, а потім швидко знижується. Це може бути пов'язано з активним розвитком імунної системи телят у ранній постнатальний період та експресією імуноглобулінових генів імунокомпетентними В-лімфоцитами. У молозиві корів уміст Ig G переважає над Ig A і M, оскільки клітини епітелію альвеол молочної залози мають вищу щільність Fc- γ -рецепторів.

У тварин деяких видів сліди Ig виявляються вже в ембріонах, на початку їх розвитку. Так, ще у 1969 році F. Brambell висловив гіпотезу про те, що окремі материнські глобуліни проникають через плаценту завдяки прикріпленню до специфічних рецепторів на поверхні плазматичної мембрани. Різні автори повідомляють про склад та особливості розповсюдження Fc- γ -рецепторів епітеліальних клітин мишей, щурів і людини. Показана значна гетерогенність поліпептидів цих рецепторів. Стимуляція Fc- γ -рецепторів індукує клітинну відповідь у самих різних типах клітин. Незважаючи на те, що антитіла не проникають через плаценту корів, існують дані, які свідчать про появу імунокомпетентних лімфоцитів і наявність власних Ig у жуйних у плідний період онтогенезу.

Fc- γ -рецептори є не лише в плаценті, але і на плазматичній мембрані епітеліальних клітин тонкої кишки плодів різних видів тварин, у т. ч. і у великої рогатої худоби, завдяки яким пасивний імунітет підтримується материнськими антитілами, що надходять з молозивом. Це може бути пов'язано також з тим, що Ig G властива бактеріостатична дія, і вони є найефективнішими у пренатальному захисті організму від інфекцій.

Виявлені Fc- γ -рецептори в апікальних і базолатеральних ділянках мембран ентероцитів свідчать про активний рециклінг цих рецепторів. Існують дані, які вказують на те, що рециклінг Fc- γ -ре-

цепторів індукується специфічними лігандами, а саме – Ig G. Доведено, що трансцитоз за участю Fc- γ -рецепторів ентероцитів шурів індукується Ig G різних біологічних видів з подібною, але не еквівалентною активністю. Цей факт підтверджує відносну видо-неспецифічність спорідненості Fc- γ -рецепторів до γ -ланцюгів. Оскільки антитіла матері не проходять крізь плаценту, існуючі дані вказують на наявність Ig G та імунокомпетентних клітин, які здатні їх синтезувати на 3–5 місяці розвитку плода великої рогатої худоби.

Припускається важливе значення Fc- γ -рецепторів не лише в транспорті Ig G, але й у багатьох механізмах регуляції захисних реакцій у плідний період онтогенезу жуйних. Нині досить детально вивчено структуру та фізико-хімічні властивості багатьох рецепторних протеїнів. Існують розрізнені дані про функції Fc- γ -рецепторів різних клітинних ліній, які включають тромбоцити, нейтрофіли, еозинофіли, моноцити, макрофаги, гранулярні лімфоцити і В-лімфоцити. У всіх цих типах клітин стимуляція Fc- γ -рецепторів викликає певну клітинну відповідь, яка виявляється у вигляді ендцитозу, фагоцитозу, антигеннезалежної клітинної взаємодії, генерації супероксидних радикалів, секреції лізосомальних ензимів і цитокінів. Відомо, що Fc- γ -рецептори сумісно діють з іншими гуморальними і клітинними рецепторами, які регулюють імунну відповідь.

Припускається, що збільшення концентрації Fc- γ -рецепторів на апікальній мембрані (АМ) ентероцитів упродовж перших двох триместрів пренатального періоду розвитку з піком їх вмісту у плодів 7-місячного віку пов'язане з наявністю специфічних індукторів в амніотичній рідині. Загальний вміст Fc- γ -рецепторів значно більший на базолатеральній мембрані (БМ) майже протягом усього плідного періоду, на відміну від апікального домену, з найвищою його експресією у 5-місячних плодів. Визначені зміни експресії Fc- γ -рецепторів асоційовані зі зміною фосфоліпідного складу плазматичних мембран (базолатерального полюсу) саме у цей період пренатального онтогенезу, особливо фосфатидилінозиту (ФІ), який є вторинним месенджером внутрішньоклітинної сигналізації.

Встановлене зниження вмісту рецепторів у фракціях АМ і БМ на 9-му місяці плідного періоду пояснюється тим, що в організмі плода на цей час розвитку вже є власні імунокомпетентні лімфоцити, які здатні відповідати на антигенну стимуляцію утворенням специфічних антитіл.

Отже, зміни експресії Fc- γ -рецепторів та їх гетерогенність в апікальних і базолатеральних макродоменах ентероцитів великої рогатої худоби у плідний період розвитку свідчать про певні особливості розвитку та формування імунних механізмів у плода, починаючи з 3-го місяця пренатального онтогенезу. Імунні реакції за участю Fc- γ -рецепторів забезпечують потенційні адаптивні можливості внутрішньоутробного функціонування організму та готують його до антигенного пресингу після народження.

Співробітниками кафедри біохімії ім. акад. М. Ф. Гулого НУБіП України встановлено, що у плодів і новонароджених телят, порівняно з дорослими, ліпідний склад АМ і БМ ентероцитів характеризується низьким вмістом холестеролу (ХС), загальних фосфоліпідів (ЗФЛ), вищим рівнем ФІ, моноенових жирних кислот (ЖК) і наявністю міристинової кислоти. АМ ентероцитів, порівняно з БМ, має значно нижчу величину ліпід/протеїнового співвідношення та вищу густину.

У плазматичній мембрані ентероцитів тонкого кишечника новонароджених телят відкрито протеїни з молекулярними масами 120, 100, 87, 75 та 24 кДа (Цвіліховський М. І., 1998), які зникають у перші дні постнатального онтогенезу та відсутні в дорослих тварин. Встановлено, що ці протеїни проявляють здатність до рецепції Ig. Запропонована гіпотеза рецепторно-ендоцитозного механізму формування колострального імунітету у великої рогатої худоби.

Спектр ліпідів і протеїнів визначає активність ензимів плазматичної мембрани ентероцитів. У період формування колострального імунітету в новонароджених телят питома активність Na⁺, K⁺-АТФази, Ca²⁺, Mg²⁺-АТФази і Mg²⁺-АТФази плазмолемі ентероцитів тонкого кишечника в кілька разів вища порівняно з іншими періодами постнатального онтогенезу жуйних (Цвіліховський М. І., 1998). Це пояснюється необхідністю забезпечення у новонароджених потужної системи для відкачування Na⁺ з цитоплазми

клітин для інтенсивного всмоктування амінокислот і вуглеводів, підтримання іонного гомеостазу та високою інтенсивністю метаболічних процесів в епітелії слизової оболонки кишечника.

Функціонування кишечного епітелію в перші доби постнатального онтогенезу жуйних представляє інтерес з точки зору дослідження механізмів всмоктування нативних Ig та формування локального і загального імунітету в новонароджених ссавців. На сьогодні доведено тісний взаємозв'язок між параметрами КЛС крові та формуванням резистентного стану організму в новонароджених телят (Грищенко В.А., 1998, рис. 3.10). Обґрунтована необхідність швидкої стабілізації КЛС в організмі телят після народження як важливого регулятора рецепторно-ендоцитозного механізму формування колострального імунітету.

За допомогою регресійного аналізу в телят перших 36-ти год життя виявлено високу кореляційну залежність між показниками КЛС (рН, HCO_3^- , ЗБО) і рівнем у плазмі крові протеїнів γ -глобулінової фракції: $r(\text{pH}) = 0,85$; $r(\text{HCO}_3^-) = 0,74$; $r(\text{ЗБО}) = 0,82$). Це дозволило побудувати з використанням комп'ютерної техніки математичну модель цих процесів (Грищенко В.А., 1998)).

$$y = b_1 + b_2 x_3 + b_3 x_4 + b_4 x_6 + b_5 x_1 + b_6 (x_6^3) + b_7 x_4 x_6 + b_8 x_6^2 + b_9 x_4^2 + b_{10} \frac{1}{x_4} + b_{11} \frac{1}{x_6}, \quad (3.1)$$

де y – залежна змінна (рівень γ -глобулінів, г/л);

x – незалежна змінна (показники КЛС крові);

$b_1 - b_{11}$ – коефіцієнти регресії.

Розраховані на персональному комп'ютері за допомогою пакетів прикладних програм МATHCAD невідомі коефіцієнти рівняння регресії мають такі значення:

$b_1 = 1588,56$; $b_2 = -1,413$; $b_3 = -16,638$; $b_4 = -19,415$;

$b_5 = -127,16$; $b_6 = -0,0176$; $b_7 = 0,9229$; $b_8 = -0,5741$;

$b_9 = 0,1112$; $b_{10} = -5774$; $b_{11} = 0,4$.

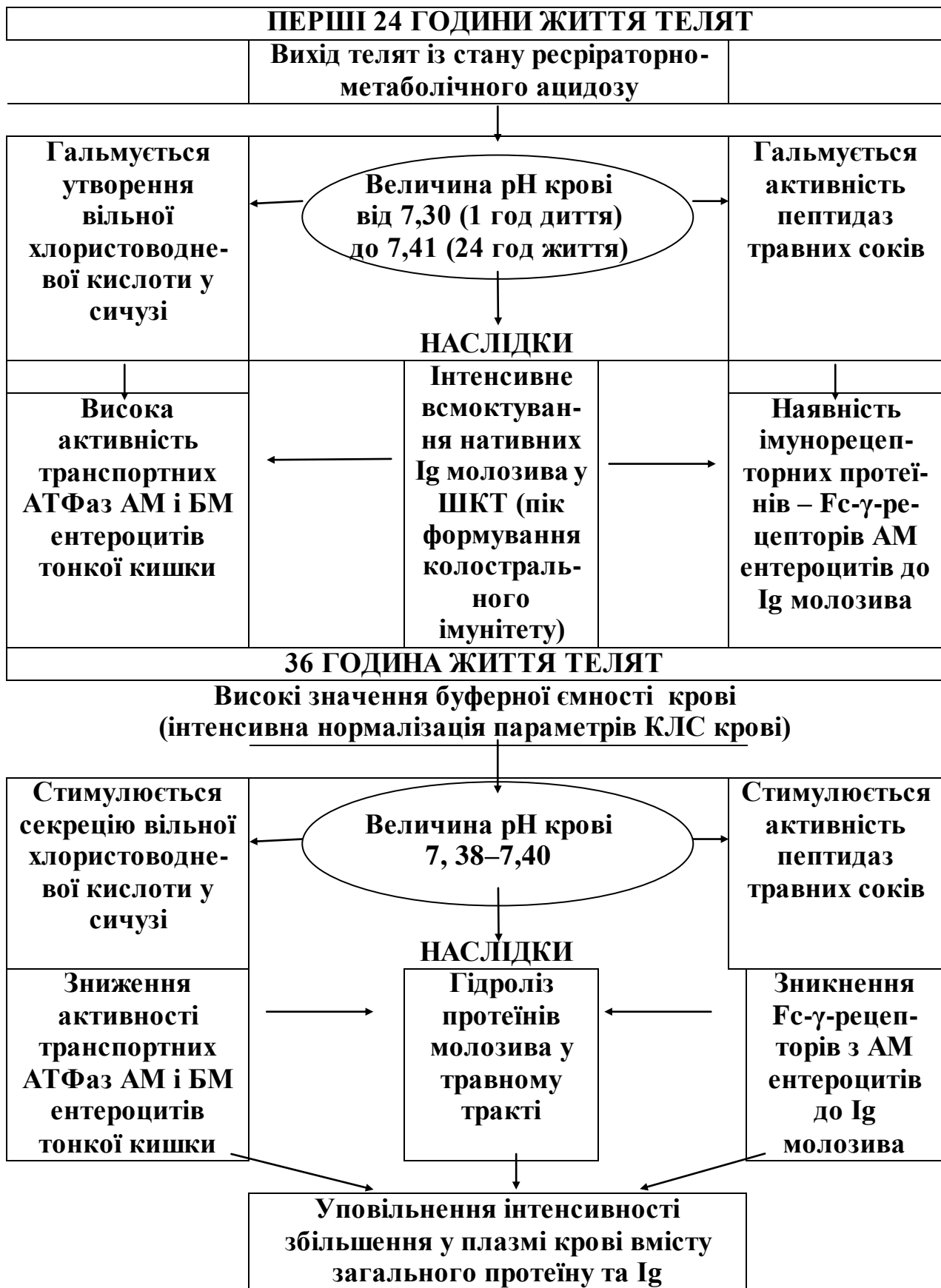


Рис. 3.10. Взаємозв'язок між показниками КЛС і формуванням колострального імунітету в новонароджених телят перших 36-ти год життя

Підставляючи їх у рівняння (3.1), одержуємо:

$$y = 1588,56 - 1,413x_3 - 16,638x_4 - 19,415x_6 - 127,16x_1 - 0,0176(x_6^3) + 0,9229x_4x_6 - 0,5741x_6^2 + 0,1112x_4^2 + 57,74 + 0,004. \quad (3.2)$$

Таку модель можна розглядати як експрес-метод розрахунку концентрації імунних протеїнів у плазмі крові новонароджених телят у період інтенсивного формування колострального імунітету. Вона дозволяє прогнозувати та швидко діагностувати формування у новонароджених телят стану гіпогаммаглобулінемії. З'являється можливість вчасно коригувати розвиток у них недостатнього рівня в плазмі крові захисних факторів, що особливо актуально у період становлення імунного статусу організму.

Таким чином, представлені дані свідчать про пренатальне становлення механізмів імунологічної реактивності у великої рогатої худоби, що є підґрунтям для рецепторно-ендоцитозного механізму формування колострального імунітету в умовах зміни кислотно-лужного балансу в організмі щойно народжених тварин.

Формування колострального імунітету в новонароджених телят

Дослідження динаміки протеїнів крові дозволяє простежити поетапне становлення імунітету у новонароджених телят разом із виявленням факторів, які його забезпечують. Формування резистентності організму тварин відбувається ще у пренатальний період розвитку за одночасної взаємодії між гальмуючими (імуносупресори) і забезпечуючими (імуноглобуліни) імунітет факторами.

Встановлена зворотна кореляційна залежність між вмістом ембріоспецифічних імуносупресорних протеїнів та імуноглобулінами у плазмі крові телят на ранніх етапах розвитку.

Печінка великої рогатої худоби в антенатальний період онтогенезу синтезує імуносупресорні протеїни плазми крові, дія яких викликає послаблення функції імунної системи шляхом їх впливу на процеси, що пов'язані з поділом імунокомпетентних клітин. Запуск механізму пасивної передачі антитіл потребує спеціальної

підготовки організму матері та новонародженого до цього процесу (рис. 3.11).

Відомо кілька груп факторів, які забезпечують формування колострального імунітету у новонароджених тварин. Це мобілізує організм новонародженого теляти і, особливо його шлунково-кишковий тракт, для сприйняття за короткий час імунних протеїнів молозива від корів-матерів.

Найбільш інтенсивно формування колострального імунітету у телят відбувається протягом перших 24–36-ти год життя. Під час першої доби життя у крові новонароджених телят відмічається швидке зростання рівня загального білка (на 43 %, порівняно з першою годиною життя). Максимальної величини вміст загального білка набуває на 36-ту год життя телят.

Разом зі змінами рівня загального протеїну в крові новонароджених телят на 24- і 36-ту год їх постнатального життя спостерігається вірогідне підвищення концентрації імуноглобулінів (у 4,3 та 5,0 рази відповідно часу).

Імуноглобуліни у крові новонароджених телят переважно представлені класами G і M. Вказані протеїни мають важливе значення у формуванні загального і місцевого імунітету.

Важливо, що у період інтенсивного наростання у крові новонароджених тварин рівня загального протеїну та імуноглобулінів, досліджено збільшення концентрації протеїнів-інгібіторів протеаз (імуносупресора – α_2 -макроглобуліну на 74 % і сумарної фракції α_1 -антихімотрипсину на 93 %). На 36-ту год життя телят концентрація цих протеїнів знижується відповідно на 47 і 50 %.

Отже, зростання у крові новонароджених телят концентрації імуноглобулінів супроводжується поступовим зниженням вмісту в ній інгібіторів протеаз та імуносупресорних протеїнів. Це свідчить про існування гомеостатичного механізму контролю за формуванням фізіологічного рівня імуноглобулінів у крові цих тварин

Молозиво є основною проміжною ланкою у механізмі здійснення пасивної передачі антитіл від корів до новонароджених телят. Особливо високі імунобіологічні властивості має молозиво корів першого удою, які визначаються як кількістю, так і співвідношенням окремих класів імуноглобулінів.

КОЛОСТРАЛЬНИЙ ІМУНІТЕТ		
I ГРУПА ФАКТОРІВ	II ГРУПА ФАКТОРІВ	III ГРУПА ФАКТОРІВ
Якісні і кількісні особливості протеїнового спектра крові і молозива	Структурно-функціональні особливості і фізико-хімічні властивості епітелію слизової оболонки травного каналу	Метаболічний профіль організму новонароджених тварин
<ul style="list-style-type: none"> • відсутність або низький рівень імуноглобулінів у плазмі крові до першої годівлі молозивом; • висока концентрація імунних протеїнів у молозиві та висока активність інгібіторів протеолітичних ензимів у крові та молозиві; • низький вміст загального протеїну в плазмі крові; • оптимальне для всмоктування нативних протеїнів молозива значення величини рН кишкового соку, що становить 6,0–6,5. 	<ul style="list-style-type: none"> • висока активність транспортних АТФ-аз та інших мембранозв'язаних ензимів; • відсутність секреції залозами сичуга вільної НСІ протягом перших годин життя; • низька активність протеолітичних ензимів травних соків; • вищий вміст загальних фосфоліпідів, холестеролу, жирних кислот у т.ч. сфінгомієліну, відношення холестерол/фосфоліпідів і менша кількість жирних кислот у БМ на відміну від АМ; • збільшення у плазмолемі лізофосфатидилхоліну, зниження – холестеролу, збільшення – моноєнових і зниження – тетраєнових жирних кислот; • більш низьке значення ліпід/протеїнового співвідношення у БМ та АМ ентероцитів; 	<ul style="list-style-type: none"> • народження тварин у стані респіраторно-метаболічного ацидозу, який нормалізується на 24–48-му год життя • висока інтенсивність окисно-відновних процесів у тканинах і підвищення продукції АТФ; • переважання анаболічних процесів у тканинах; • посилене утворення глюкози в реакціях глікогеннолізу і глюконеогенезу.

	рецепторно-ендоцитозний механізм абсорбції імунних протеїнів у тонкому кишечнику.	
--	---	--

Рис. 3.11. Закономірності формування колострального імунітету у новонароджених телят

На наступну добу відбувається різке зниження у молозиві рівня загального білка до 45 г/дм^3 зі зменшенням концентрації імуноглобулінів класу G до 20 г/дм^3 і класу M до $0,16 \text{ г/дм}^3$. На 3–10-ту добу кількість загального протеїну в молозиві (молоці) становить $20\text{--}25 \text{ г/дм}^3$ із поступовим зниженням вмісту імуноглобулінів G- і M-класів ($13\text{--}16 \text{ г/дм}^3$ та $1,4\text{--}1,5 \text{ г/дм}^3$ відповідно).

Потрапивши з молозивом у тонкий відділ кишечника новонародженої тварини, імуноглобуліни утворюють комплекс із специфічними Fc-рецепторними протеїнами з молекулярними масами (120, 100, 87, 75 та 24 кД), які розміщені на апікальних мембранах епітеліальних клітин тонкого відділу кишечника. Вони відсутні на плазмолемі ентероцитів вже у телят 3-добового віку. Отже, транспорт імунних білків молозива у травному каналі новонароджених жуйних відбувається рецепторно-ендоцитозним шляхом.

Значна роль у забезпеченні поживними речовинами організму новонароджених телят належить транспортним аденозинтрифосфатазам апікальної та базолатеральної мембран епітеліальних клітин тонкого кишечника. Характерно, що їх активність у тварин першої години життя набагато вища за таку у телят старшого віку.

Тривалість колострального імунітету становить 5–6 тижнів. Якщо протягом перших 2–3 діб життя новонароджені телята не отримують достатньої кількості захисних протеїнів, то це сприяє зниженню їх імунобіологічної резистентності. На думку багатьох дослідників, гіпогаммаглобулінемія є основною причиною виникнення у новонароджених телят гострих розладів травлення та інших системних патологій. Знання закономірностей формування імунного статусу організму новонароджених телят, особливо в ранній постнатальний період, має важливе значення у розробці методів профілактики та ранньої діагностики імунодефіцитного

стану їх організму та його своєчасної корекції з метою попередження розвитку неонатальних захворювань.

Коефіцієнт інтенсивності змін рівня імуноглобулінів у плазмі крові телят у прогнозуванні розвитку імунодефіцитного стану організму

Своєчасність виявлення новонароджених тварин із порушенням фізіологічного процесу становлення рівня імуноглобулінів (γ -глобулінів) сироватки крові у новонароджених телят перших 36-ти год життя і раннє прогнозування формування імунодефіцитного стану їх організму має важливе значення для забезпечення ефективності превентивних і терапевтичних технологій при неонатальній патології телят з метою збереження і вирощування здорового поголів'я продуктивних тварин.

Для розв'язання цього питання пропонується (Грищенко В.А., 2015) визначати коефіцієнт інтенсивності (ІЗІК) змін рівня імуноглобулінів у плазмі крові новонароджених телят перших 36 год життя.

На момент народження телят до першого випоювання молозива у сироватці крові відмічається низький рівень загального протеїну ($48,70 \pm 0,76$ г/л) і слідовий вміст γ -глобулінової фракції (табл. 3.20).

Впродовж першої доби життя спостерігається інтенсивне підвищення рівня загального протеїну (на 43 %) порівняно з вихідними даними, що у телят на 24-ту год життя, як відомо, зумовлено інтенсивним всмоктуванням протеїнів молозива у травному каналі (особливо високі імунобіологічні властивості у молозива першого удою), наявністю інгібіторів протеаз і особливим рецепторним механізмом абсорбції нативних протеїнів у кишечнику. Максимальної величини рівень загального протеїну набуває на 36-ту год життя телят ($72,70 \pm 0,20$ г/л). Разом зі змінами рівня загального протеїну, у сироватці крові телят на 24- і 36-ту год життя в нормі спостерігається вірогідне підвищення концентрації імуноглобулінів у 4,3 і 5 разів відповідно до часу спостережень. За даними літератури ендогенний біосинтез антитіл відмічається лише з 8–16-тої

доби після народження телят, а Ig A – на 64-ту добу. Тому у випадках розвитку в новонароджених тварин неонатальної патології або порушення режиму вигоювання молозива в їх крові формується недостатній рівень імуноглобулінів.

КЛС організму суттєво впливає на швидкість і напрям перебігу метаболічних процесів у тканинах. В умовах експериментального метаболічного ацидозу, як і в інтактних тварин, рівень загального протеїну в сироватці крові телят упродовж перших 36-ти год життя характеризується тенденцією до підвищення (див. табл. 3.20).

Однак, в перших цей процес відбувається повільніше і тому його значення на 24- і 36-ту год життя на 11 % нижче за контрольні. Цьому можуть сприяти погіршення процесів всмоктування протеїнів молозива у шлунково-кишковому тракті телят у стані ацидозу. Крім того концентрація протеїнів γ -глобулінової фракції у плазмі крові телят у стані експериментального ацидозу на 24-ту год життя була на 13 %, а на 36-ту – на 19 % нижче, ніж у тварин контрольної групи.

Таким чином, підвищення концентрації іонів Гідрогену у внутрішньому середовищі організму новонароджених телят негативно впливає на формування рівня γ -глобулінів сироватки крові.

Респіраторно-метаболічний ацидоз в організмі телят періоду новонародженості у процесі стабілізації кислотно-лужних параметрів закономірно переходить у незначно виражений компенсований алкалоз. В експерименті на інтактних тваринах такий стан виявляється на 24-ту год їхнього постнатального життя. Цьому сприяє інтенсивне наростання буферної ємності крові. Одночасно, цей період характеризується інтенсивним підвищенням у сироватці крові тварин рівня загального протеїну.

Переведення новонароджених телят у стан експериментального метаболічного алкалозу призводить до зростання рівня вуглекислоти й концентрації бікарбонатних іонів у сироватці крові таких телят, а також підвищенню вмісту загального протеїну як на 24-, так і на 36-ту год життя (відповідно на 5 і 4 % порівняно з контролем і на 18 та 16 % – із телятами у стані ацидозу), див. табл. 3.20.

Таблиця 3.20 – Інтенсивність змін концентрації імуноглобулінів у сироватці крові здорових телят упродовж перших 36-ти год життя та при моделюванні у них стану метаболічного ацидозу й алкалозу, $M \pm m$; $n = 12$

Період дослідження	C_{Ig} , г/л	$C_{ЗП}$, г/л	Коефіцієнт ІЗК (діапазон значень)
інтактні телята			
Через 1 год після народження (до першого випоювання молозива)	$2,23 \pm 0,53$	$48,70 \pm 0,76$	$0,05 \pm 0,01$ (0,04–0,06)
На 24 год життя	$9,63 \pm 0,14^*$	$69,80 \pm 0,25^*$	$0,14 \pm 0,01^*$ (0,13–0,15)
На 36 год життя	$11,17 \pm 0,73^*$	$72,70 \pm 0,20^*$	$0,15 \pm 0,01^*$ (0,14–0,16)
телята у стані штучного ацидозу			
Через 1 год після народження (до першого випоювання молозива)	$2,22 \pm 0,54$	$48,90 \pm 0,70$	$0,05 \pm 0,01$ (0,03–0,06)
На 24 год життя	$8,38 \pm 0,34^*$	$61,80 \pm 3,40$	$0,14 \pm 0,01^*$ (0,13–0,15)
На 36 год життя	$9,01 \pm 0,47^*$	$65,0 \pm 3,10$	$0,14 \pm 0,01^*$ (0,13–0,15)
телята у стані штучного алкалозу			
Через 1 год після народження (до першого випоювання молозива)	$2,23 \pm 0,52$	$48,80 \pm 0,77$	$0,05 \pm 0,01$ (0,04–0,06)
На 24 год життя	$11,56 \pm 1,81^*$	$73,0 \pm 2,30^*$	$0,16 \pm 0,01^*$ (0,14–0,18)
На 36 год життя	$13,82 \pm 0,24^*$	$75,50 \pm 0,22^*$	$0,18 \pm 0,01^*$ (0,17–0,19)

П р и м і т к а. * $p < 0,05$ достовірна різниця динаміки вмісту протеїнів крові порівняно з вихідними результатами.

Крім того, в їхній сироватці спостерігається порівняно високий рівень протеїнів γ -глобулінової фракції ($11,56 \pm 1,81$ і $13,82 \pm 0,24$ г/л відповідно на 24- і 36-ту год життя). Цей факт доводить позитивний вплив змін показників КЛС в сторону алкалозу на функціонування механізмів, які забезпечують формування резистентного стану організму, що впливає також і на транспорт протеїнів молозива у кров.

Встановлені закономірності інтенсивності змін рівня загального білка та імуноглобулінів у сироватці крові телят упродовж перших 36-ти год життя, в яких також штучно викликали стан ацидозу й алкалозу, стало основою у розрахунку запропонованого нами показника інтенсивності змін імуноглобулінів крові (коефіцієнта ІЗК) (див. табл. 3.20).

Його розрахунок передбачає визначення співвідношення концентрації імуноглобулінів (C_{Ig}) і загального протеїну ($C_{зп}$) у сироватці крові новонароджених телят на першу годину життя (до випоювання молозива) та на 24- і 36-ту год життя згідно формули:

$$ІЗК = \frac{C_{Ig} \text{ (г/л)}}{C_{зп} \text{ (г/л)'}}$$

де ІЗК – коефіцієнт, що характеризує інтенсивність зміни імуноглобулінів крові по відношенню до концентрації загального протеїну сироватки крові новонароджених телят перших 36-ти год життя; C_{Ig} – концентрація імуноглобулінів у сироватці крові телят (г/л); $C_{зп}$ – концентрація загального протеїну сироватки крові (г/л). Фізіологічні значення цього коефіцієнта для телят на 1 год життя (до випоювання молозива) – 0,05 (0,04–0,06), на 24 год життя – 0,14 (0,13–0,15), на 36 год життя – 0,15 (0,14–0,16), табл. 3.20 та рис. 3.12.

У результаті аналізу отриманих величин коефіцієнта ІЗК можна стверджувати, що перебування телят упродовж перших 36-ти год життя у стані штучного ацидозу супроводжується формуванням дефіцитного рівня імуноглобулінів у сироватці крові і свідчить про тенденцію до формування імунодефіцитного стану організму, а отже схильність цих тварин до виникнення неонатальної патології.

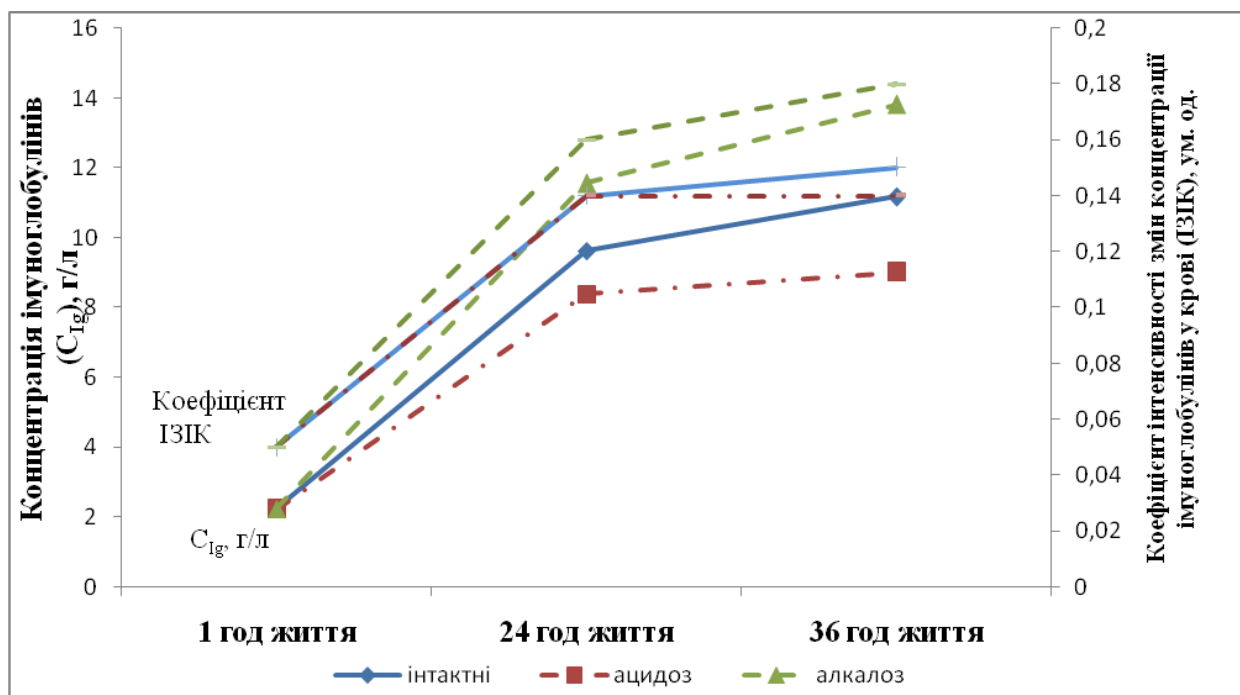


Рис. 3.12. Інтенсивність змін концентрації імуноглобулінів у сироватці крові (коефіцієнт ІЗК) здорових телят упродовж перших 36-ти год життя та при моделюванні у них стану метаболічного ацидозу й алкалозу

Примітка: коефіцієнт ІЗК, ум.од. – інтенсивність змін концентрації імуноглобулінів у сироватці крові; C_{Ig} , г/л – концентрація імуноглобулінів у сироватці крові.

І навпаки, у телят, які перебували зазначений вище період у стані штучного алкалозу, встановлено підвищення рівня імунозабезпечення організму та високі значення цього коефіцієнта.

Отже, визначення величини коефіцієнта ІЗК пропонується для використання у прикладній ветеринарії з метою діагностики, прогнозування і профілактики розвитку імунодефіцитного стану організму в новонароджених телят та у превентивних і терапевтичних технологіях неонатальної патології для збереження і вирощування здорового поголів'я продуктивних тварин.

Питання для самоконтролю:

1. Що собою являє імунна система організму?
2. Види імуноглобулінів та їхні функції?

3. Що таке імунодефіцитний стан та його види?
4. Що на сьогодні відомо про формування колострального імунітету в новонароджених ссавців?
5. Особливості формування колострального імунітету у новонароджених телят?
6. Математична модель розрахунку рівня протеїнів γ -глобулінової фракції за відомими показниками кислотно-лужного стану крові?

3.3. БІОХІМІЧНІ АНАЛІЗАТОРИ У ЛАБОРАТОРНИЙ ДІАГНОСТИЦІ

3.3.1 Біохімічні аналізатори: принципи роботи та сфери використання

Сучасні автоматичні аналізатори дають можливість визначати цілий ряд важливих параметрів, дані про які сприяють швидкій постановці правильного діагнозу.

Одним з найбільш незамінних у діагностиці пристроїв виступає біохімічний аналізатор. Цей прилад дозволяє оперативно виконувати як біохімічні, так і клінічні дослідження біологічних рідин.

Перелік найпоширеніших показників клініко-біохімічних досліджень крові при використанні у лабораторній діагностиці біохімічних аналізаторів:

- **ензими:** аланінамінотрансфераза, аспартатамінотрансфераза; амілаза, гаммаглютамілтранспетидаза, креатинкіназа, креатинкіназа-МБ, лактатдегідрогеназа, ліпаза, холінестераза, лужна фосфатаза;

- **іони:** залізо, кальцій, магній, мідь, фосфат, цинк;

- **субстрати:** альбумін, білок загальний, білок у сечі, білірубін загальний, білірубін прямий, глюкоза, креатинін, сечова кислота, сечовина, триацилгліцероли, холестерол загальний, холестерол ЛПВЩ, холестерол ЛПНЩ.

- **специфічні білки:** аполіпопротеїн А, аполіпопротеїн В, гемоглобін глікозильований, трансферин, С-реактивний білок, С3, С4, IgA, IgG, IgM.

Отримання точних результатів за допомогою біохімічних аналізаторів засновано на поєднанні передових оптичних, механічних та комп'ютерних технологій в єдиному діагностичному приладі.

Ключові характеристики біохімічного автоаналізатора:

- принцип роботи – автоматичний/напіваавтоматичний;
- продуктивність;
- кількість проб і реагентів, що розміщуються “на борту” приладу;

- можливість роботи з наборами реагентів різних виробників (відкритість системи);
- витрата реагентів і проб на один аналіз;
- надійність приладу;
- ергономічність, користувальницький інтерфейс;
- вимоги до умов експлуатації.

Біохімічні аналізатори використовуються в оснащенні діагностичних лабораторій будь-якого рівня, що викликано необхідністю впровадження в практику сучасних методів ранньої лабораторної діагностики потенційно фатальних патологій для їх своєчасної профілактики та ефективної терапії.

Аналітичні характеристики

Відтворюваність результату біохімічного аналізу залежить від:

- відтворюваності дозування проби;
- дозування реагентів;
- фотометричного вимірювання.

Більшість сучасних біохімічних аналізаторів дозволяє виконувати фотометричні і турбодиметричні дослідження «по кінцевій точці» і в кінетичному режимі. Математичне забезпечення біохімічного аналізатора залежить від його класу і програмного забезпечення. Більшість сучасних аналізаторів вже містять програми роботи з нелінійними калібруваннями і верифікацію результатів за правилами Вестгарда, побудова карт Леві-Дженнінгса.

Для ефективної роботи лабораторії, необхідно, щоб робочий простір було організовано компактно і зручно. Не в усіх приладів є можливість дозавантаження тестів під час роботи.

Режим доступу до тестів:

• система «тест за тестом» – пакетний доступ, при якому для всіх зразків система визначає спочатку один параметр, потім наступний і т.д. (подібна система характерна для аналізаторів, обладнаних проточною кюветою);

• система «пацієнт за пацієнтом» і/або «тест за тестом» – вільний доступ (RandomAccess), при якому можна обрати режим «визначення всіх параметрів для одного зразка», або, як і при пакетному режимі, визначити один і той же параметр в усіх зразках. Ця систе-

ма володіє всіма перевагами. Пакедна система дозволяє проводити екстрене визначення будь-якого параметра (Stat-дослідження), однак вимагає кваліфікованого призначення черговості тестів або ретельної специфічної промивки між певними типами аналізів. У найсучасніших аналізаторах ця проблема вирішена шляхом введення списків тестів, заборонених до послідовної постановки, або за допомогою одноразових реакційних кювет.

Конструкція блоків для реагентів, проб і реакційного вузла:

• Перший тип – це “лінійний” реагентний блок, що представляє собою стрип з гніздами для кювет з реагентами. Серйозним недоліком такої конструкції є необхідність перенесення реагентів з промислових ємностей в спеціальні кювети: по-перше, на цьому етапі можливе забруднення реагентів, по-друге – частина реагенту завжди залишається в кюветі та не підлягає поверненню в основну ємність.

• Другий тип блоку реагентів – “карусель”, в яку поміщають реагенти в “промислових” флаконах. При такій конструкції паркан реагенту здійснюється практично повністю, помилки, забруднення реагенту і його втрати на цьому етапі виключені. У найсучасніших моделях реагентна карусель охолоджується до 10–15° С.

Аналізатори можна розбити на кілька основних класів:

1. Прилади компакт-класу. Це невеликі прилади невисокої продуктивності – 80–120 тестів на годину, як правило, з одним дозатором, деякі ще з проточною кюветою, з 10–30 позиціями для проб, мінімальним об’ємом дозування реагентів до 500 мкдм³ (для приладів застарілої конструкції), хоча самі сучасні мають непогані показники в 200–300 мкдм³. Таким приладом можна обладнати КДЛ з кількістю тестів – 200–400 за добу.

2. Прилади середнього класу. Це аналізатори з реальною продуктивністю 120–250 тестів за годину. Може бути як один, так і два дозатора, 30–50 позицій для проб і реагентів, мінімальний обсяг дозування – 180–250 мкдм³. Фотометричні вимірювання в аналізаторах такого класу зазвичай здійснюється безпосередньо в реакційних кюветах. Це розумний вибір для КДЛ з необхідністю виконання 400–1000 тестів за добу.

3. Прилади високого класу. Це прилади з продуктивністю в 250–400 тестів за годину. Два, а іноді і три дозатори, 60–100 позицій для проб і реагентів. Такі аналізатори вкрай рідко управляються вбудованими комп'ютерами, принтер, як правило, теж зовнішній. На такому приладі можна легко виконувати до 2000 тестів за добу.

4. Прилади вищого класу. Продуктивність в 400–800 тестів на годину, три дозатори, робота тільки на реагентах виробника – це основні риси подібних машин, призначених для обробки величезного потоку пацієнтів. Устаткування такого рівня ставлять в лабораторії великих діагностичних центрів, що виконують кілька тисяч тестів за добу.

Принцип вибору аналізатора в залежності від клінічної задачі і потреб лабораторії: по-перше, необхідно визначити передбачуване завантаження приладу (потік пацієнтів); по-друге – врахувати можливості штатного розкладу та кваліфікацію персоналу; у третій – визначити, які саме тести і в якій кількості передбачається проводити.

Таким чином, напівавтоматичний біохімічний аналізатор може бути оптимально використаний при незначному потоці пацієнтів, або у разі проведення численних аналізів одного або декількох схожих показників. Повністю автоматизована система необхідна при потоці більше 10 пацієнтів за добу, особливо – при широкому профілі призначуваних тестів, або при проведенні тестів, що вимагають додаткового обрахунку і верифікації

Серед поширених біохімічних аналізаторів крові, які сьогодні активно використовуються фахівцями діагностичних лабораторій, слід виділити, в першу чергу, напівавтоматичні і автоматичні прилади, а також ручні спектрофотометри.

Напівавтоматичні аналізатори (рис. 3.13)

Дозволяють звести роботу фахівця до мінімуму. В основні завдання фахівця при використанні напівавтоматичного аналізатора входить лише приготування проб і підготовка реагентів. Решта робіт, включаючи розрахунок результатів, виконуються біохімічним аналізатором автоматично, згідно заданого лаборантом алго-

ритму. При цьому необхідна інформація відображається на дисплеї приладу.

A) GBG Stat Fax 3300



B) Stat Fax 1904 Plus



Рис. 3.13. Біохімічні напівавтоматичні аналізатори – компактна фотометрична, керована мікропроцесором система, що дозволяє проводити дослідження клінічних біохімічних показників крові (сироватки/плазми), сечі, спинномозкової рідини та інших біорідин, а саме: концентрації гормонів, імуноглобулінів, активності ензимів тощо

Примітка: А) Біохімічний напівавтоматичний аналізатор відкритого типу **GBG Stat Fax 3300** – компактна фотометрична, керована мікропроцесором система, що дозволяє проводити дослідження клінічних біохімічних показників крові (сироватки/плазми), сечі, спинномозкової рідини. Призначений для визначення концентрації гормонів, імуноглобулінів, активності ензимів тощо. Може використовуватися для розрахунку абсорбції або концентрації на основі стандартних крапок чи розрахунку швидкості процесу реакції; В) Аналізатор біохімічний напівавтоматичний відкритого типу **Stat Fax 1904 Plus** – апарат для визначення хімічного складу крові, концентрації субстратів у досліджуваному біоматеріалі за допомогою оптичних, механічних та комп'ютерних технологій. Основними показниками для визначення у сучасній медицині виступають ензими, метаболіти, субстрати, ліпіди, електроліти.

Аналізатори автоматичні біохімічні (рис. 3.14)

Відносяться до категорії найбільш прогресивних, зручних для повсякденного використання приладів. Застосування пристроїв

даного типу практично не потребує участі спеціаліста. У ході досліджень лаборант залишає за собою лише настройку приладу, яка передбачає підбір необхідних профілів, програмування тестів, згідно з якими визначаються потрібні параметри в аналізованих пробах.

A) Sapphire 800



B) Chemray 360



Рис. 3.14. Біохімічні автоматичні аналізатори – система нового покоління з відкритим доступом для клінічної хімії та імунотурбідиметрії

П р и м і т к а: А) **Sapphire 800** – система нового покоління з відкритим доступом провідного європейського виробника реагентів і лабораторного обладнання компанії «Audit diagnostics» (Ірландія) Розрахований на потужні та середні лабораторії з великою кількістю хворих при широкому спектрі призначених аналізів. Серед конкурентних переваг слід відмітити: економічність; низькі витрати реактивів на реакцію; довговічні електроди з можливістю індивідуальної заміни; надійні кювети, ефективна промивна система; розширені аналітичні горизонти; максимальна кількість одночасно виконуємих тестів; постійно зростаючий спектр досліджень; зручність у роботі: сучасний графічний інтерфейс, передове програмне забезпечення, мінімальний об'єм щоденного обслуговування; В) **Chemray 360** – автоматичний біохімічний аналізатор нового покоління для клінічної хімії та імунотурбідиметрії, що дозволяє проводити до 360 досліджень на годину. Повністю

відкрита система для реагентів різних виробників з високою пропускнуою здатністю і відтворюваністю результатів дослідження. Система відрізняється високою економічністю, дозволяючи додавати нові зразки у процесі роботи (у т.ч. STAT проби).

Спектрофотометр (рис. 3.15)

Такий біохімічний аналізатор призначений для реєстрації показників оптичної щільності плазми крові, на основі яких виробляються найпростіші цифрові обчислення отриманих відомостей. Використання спектрофотометрів потребує виконання більшості операцій в ручному режимі. До завдань лаборанта тут відноситься приготування реагентів, встановлення порядку проведення тестів, внесення досліджуваних зразків. Зведені результати дослідження в цьому випадку можуть виводитися як на електронний дисплей, так і на друковану стрічку.

У медико-біологічних дослідженнях спектрофотометри використовуються не тільки для кількісного визначення різних компонентів у біологічних пробах, але і для стандартизації біологічно важливих речовин. Так, наприклад, кращим способом стандартизації гемоглобіну крові вважається спектрофотометричний. Спектрофотометри використовуються у наукових дослідженнях для вивчення будови речовин та їх ідентифікації. Для цього знімаються характеристичні спектри поглинання чистих речовин, які є індивідуальними для кожної речовини. Отримані при дослідженнях записи спектрів поглинання, при порівнянні з уже відомими дозволяють не тільки ідентифікувати речовину, але і виявити наявність домішок, що важливо при дослідженні різних біологічних препаратів. Основними видами досліджень біологічних важливих речовин є: визначення ензимів, гормонів, вітамінів, білків, азотистих речовин, нуклеїнових кислот, вуглеводів, спиртів, фенолів і кетонів, органічних кислот, ліпідів, пігментів, неорганічних речовин. Володіючи високою чутливістю і вибірковістю, спектрофотометри дозволяють проводити визначення ряду речовин у сумішах, без їх відділення, що значно спрощує аналіз. Ряд продуктів азотистого обміну визначають за специфічним поглинанням в ультрафіолетовій області.

А) Спектрофотометр ULAB102



В) Спектрофотометр S261uv



Рис. 3.15. Спектрофотометри – спектральні оптичні прилади, призначені для виміру коефіцієнта пропускання, оптичної щільності досліджуваних твердих і рідких проб при проведенні різного роду аналізів і обчислення оптичної щільності.

П р и м і т к а: А) **Спектрофотометр ULAB 102** – спектральний оптичний прилад, призначений для виміру коефіцієнта пропускання, оптичної щільності досліджуваних твердих і рідких проб при проведенні різного роду аналізів і обчислення оптичної щільності. Застосовується в аналітичних лабораторіях різного профілю для визначення вмісту широкого спектру речовин у твердих і рідких пробах, а саме для аналізу води (питна, природна, стічна, технологічна), технологічного контролю сировини і готової продукції різних галузей промисловості (харчова, хімічна, фармацевтична, металургійна, нафтохімічна та інших аналітичних завдань); В) **Спектрофотометр S 261UV** – двопроміневий із смугою пропускання 1,8 нм. Модель має два незалежні детектори, що істотно підвищує точність отримуваних результатів аналізу. Забезпечує високоточні виміри в діапазоні 190–1100 нм. Використовуються в клінічних лабораторіях, фармакології та біохімії, а також для рутинних вимірів при ДНК/протеїнаналізі (<http://kiev.etov.ua/product/1007379-spektrofotometr-ulab-102.html>).

Особливості завантаження біохімічних аналізаторів

Загальним правилом, яке впливає на економічність роботи біохімічних аналізаторів, є можливість застосування мінімального

обсягу проб і препаратів для отримання найбільш об'єктивних результатів.

Особливу увагу більшості дослідницьких лабораторій приваблює, насамперед, такий прилад, як аналізатор автоматичний біохімічний. У порівнянні з напівавтоматичними моделями, автоматичні пристрої здатні значно заощадити час фахівця. Нарівні з виконанням практично всіх операцій в автоматичному режимі такі прилади забезпечують найбільш точними, легко відтворюваними діагностичними результатами.

Основна маса інноваційних моделей аналізаторів, без сторонньої допомоги виробляють піпетування реагентів і зразків, виконують їх підігрів, змішування, аналіз, обробку отриманих даних і видають готові результати.

Біохімічний аналізатор автоматичний здатний продемонструвати найвищу продуктивність, самостійно вимірюючи десятки і сотні параметрів протягом години. Застосування більшості моделей таких пристроїв вимагає лише участі фахівця при програмуванні режимів вимірювань.

Біохімічний аналізатор автоматичного типу має наступні переваги:

- найвищу точність і об'єктивність результатів;
- виконання вражаючих обсягів обробки проб і реагентів за одиницю часу;
- повну автоматизацію процесів біохімічного аналізу;
- високу швидкість отримання необхідних результатів;
- роботу зі зручним функціоналом і зрозумілий інтерфейс.

Напівавтоматичний біохімічний аналізатор, так само як і спектрофотометр, здатний стати вкрай важливим приладом для дослідницьких лабораторій і медичних установ з відносно невеликим потоком пацієнтів і необхідністю багаторазового тестування схожих параметрів.

Оптимальним вибором для дослідницьких центрів найширшого профілю, які потребують проведення різноманітного спектра тестів, є виключно автоматичні моделі аналізаторів.

3.3.2. Модернізація спектроскопічних методів дослідження і лабораторної діагностики хвороб тварин

Сучасні біохімічні технології розвиваються в напрямі інтеграції і мініатюризації декількох стадій хімічної обробки, реакцій, процесів поділу і детектування в єдиному приладі. З введенням інтегральних мікросхем в електроніці і подальшою заміною дискретних елементів на високопродуктивні чипи, мікропроцесори та мікроконтролери, в галузях хімії та біології розвивається інтегрування біохімічних і біоаналітичних процесів. У цій галузі істотним поштовхом став розвиток *мікроелектро-механічних систем* (МЕМС), зокрема рідинних і оптичних. Крім очевидних переваг мініатюризації аналітичних систем, таких як зменшення габаритів, ваги, витрат реагентів і відходів, інтегрування в одному чипі кількох реакторів, змішувачів, екстракторів, насосів, дозаторів, їх застосування дозволяє реалізувати всі стадії пробопідготовки, дозування, змішування реагентів, очищення, розділення та аналізу проби в одному пристрої. Розмір таких систем становить декілька квадратних сантиметрів. Створюються умови для появи цілого класу нових пристроїв з новими функціональними та аналітичними характеристиками.

Розвиток аналітичної техніки відкриває перед хіміками-аналітиками і біохіміками широкий вибір мікрочипів залежно від різних завдань.

«Лабораторія-на-чипі» (lab-on-chip, LOC) – це пристрій, який об'єднує одну або кілька функцій лабораторного аналізу на одному чипі розміром до декількох сантиметрів квадратних. Вона має справу з обробкою надзвичайно малих об'ємів рідини і може бути інтегрована з напівпровідниковими приладами, обробляти лабораторні дані (рис. 3.16)

Лаб-чипи підвищили чисельність випробувань, які передбачають змішування, аналіз і розділення зразків, що зазвичай складаються із суспензії клітин, нуклеїнових кислот, білків тощо.

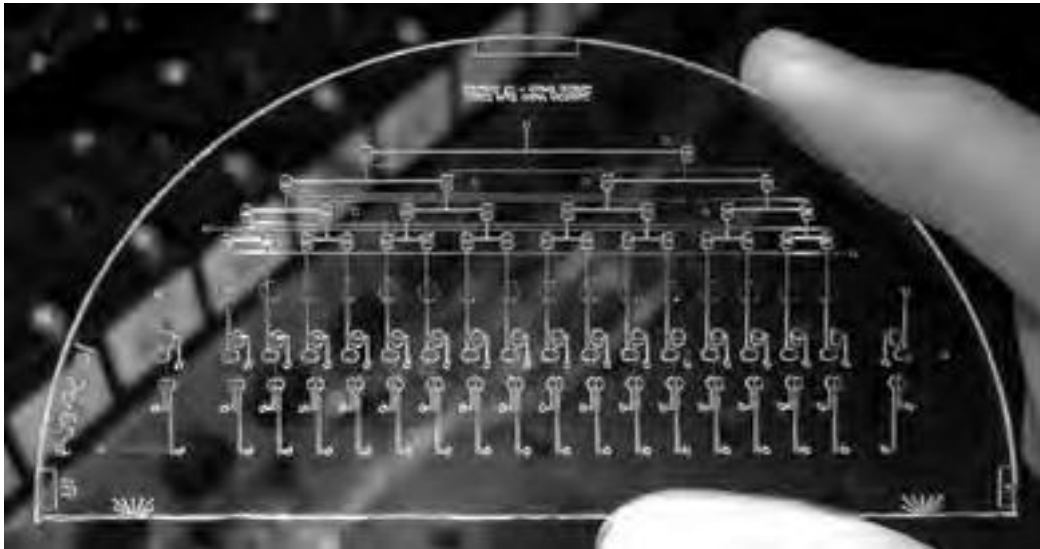


Рис. 3.16. «Лабораторія-на-чипі»

Можливі аналітичні або оптичні методи їх визначення. Електричні методи ідентифікації залежать виключно від полярних властивостей молекул рідини зразків. Більшість оптичних методів вимагають маркування, що потребує застосування хемілюмінесценції, флуоресценції або радіоактивних маркерів.

Як правило, лаб-чипи складаються з мережі каналів, побудованих на основі напівпровідникової технології.

Ці пристрої можуть бути виготовлені з багатьох видів матеріалів: полімерів, скла, кремнію або комбінацій цих матеріалів.

Лаб-чипи мають низку переваг порівняно з традиційним аналізом:

- низькі обсяги споживання рідини (знижені витрати реагентів і менші обсяги проб для проведення досліджень);
- швидкий аналіз і час відгуку через коротку відстань дифузії;
- паралелізм;
- краще управління процесом через швидший відгук системи (наприклад, тепловий контроль для екзотермічних хімічних реакцій);
- компактність системи;
- дослідження проводяться з вищим рівнем безпеки;
- висока відтворюваність даних.

Незважаючи на всі переваги, лаб-чипи мають деякі недоліки порівняно зі звичайними лабораторними аналізами:

- багато аспектів ще не повністю вивчено;
- відбите від стінок світло джерела випромінювання впливає на якість отриманого спектра;
- поєднання фізичних і хімічних процесів ускладнює виготовлення лаб-чипів.

Структура «лабораторії-на-чипі» принципово не відрізняється від будови спектрометрів. Висока продуктивність, легша інтеграція, знижене енергоспоживання робить відповідні матриці найкращими для використання в лаб-чипах.

Лаб-чипи виготовляються, як правило, з використанням фотолітографії. Спочатку в лаб-чипах планували кремнієву підкладку, але пізніше її замінили чипами на скляну. У сучасних моделях передбачені полімерні матеріали замість кремнію і скла.

Прикладом таких портативних лаб-чипів є Qstick. Це usb-спектрометр, з випромінюванням в діапазоні 360–740 нм з кроком 1 нм. Такий лаб-чип можна використовувати для хімічного аналізу, світлового аналізу, судово-медичної експертизи.

З бурхливим розвитком комп'ютерних технологій та мереж, класифікація зображень широко використовується в багатьох областях. Основна мета класифікації зображень полягає у створенні принципів, за яким вдається розрізнити класи схожих зображень. Щоб розрізнити різні класи зображень, необхідно спочатку отримати деякі особливості основних властивостей зображень. Потім використовують класифікатор для досягнення класифікації за допомогою подібності інформації в класі зображень.

Найпоширенішими методами є використання графів, кластеризації, нейронних мереж, байєсової ймовірності тощо.

При розгляді структури відповідної матриці (рис. 3.17), необхідно відмітити, що вихідними даними є цифровий сигнал, а обробку та класифікацію такого сигналу даних можна інтегрувати в один чип. Це дозволяє відмовитися від персонального комп'ютера як елемента опрацювання даних.

Для класифікації сигналу необхідно його підсилити для отримання вірогідного результату. Цифровий сигнал зберігається в

частотній характеристиці, яку отримано за допомогою перетворення Фур'є. Щоб не класифікувати сигнал за всією його хвильовою довжиною, виділяють лише необхідну довжину хвилі, що збільшує швидкодію.

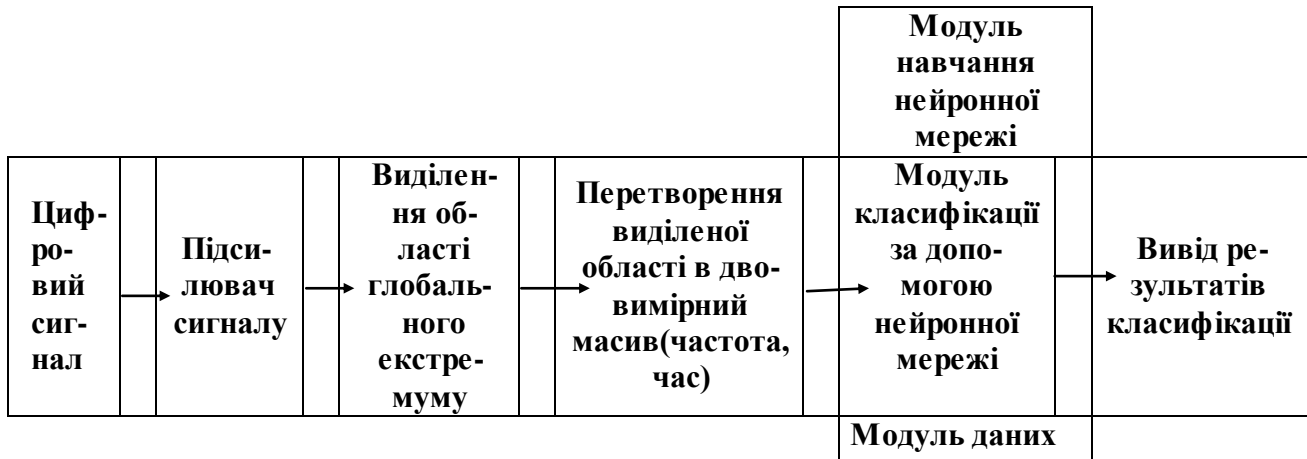


Рис. 3.17. Процес обробки та класифікації сигналу

Модуль класифікації складається з модулів:

- навчання нейронної мережі;
- класифікації за допомогою нейронної мережі;
- даних.

В якості засобу класифікації спектра обрано нейронну мережу як найпоширенішу та через велику кількість наявних моделей для класифікації сигналів, зображень тощо.

Для зручного зберігання та класифікації сигналу його перетворено на двовимірний масив, який складається з амплітуди і відповідної частоти. Невеликі масиви кодових сигналів доцільно зберігати шляхом використання регістрів. Вже за необхідності зберігати десятки сигналів, залучення регістрів призводить до невиправдано великих апаратних витрат. Для зберігання великих об'ємів сигналів найкраще використовувати *запам'ятовувальні пристрої* (ЗП) із спеціальними мікросхемами, в кожній з яких може зберігатися інформація великого об'єму. Доцільно залучати *постійний запам'ятовувальний пристрій* (ПЗП). Цей пристрій пропонується для зберігання даних і команд, за якими цифрові пристрої функціонують. Можна залучати *перепрограмовані постійні запам'ятову-*

вальні пристрої (ППЗП), але специфіка лабораторії-на-чипі робить це не доцільним.

Основна проблема використання нейронних мереж – відносно низька швидкість роботи, оскільки задачі, пов'язані з нейронними мережами, як правило, є ресурсоемними. Вибір оптимальної нейромережної моделі зазвичай пов'язаний з проведенням великої кількості експериментів, результати яких дають змогу оцінити якість окремої моделі. Особливо великих затрат часу потребує процес навчання нейронної мережі. Зважаючи на ці проблеми, найоптимальнішим типом для проектування та мікропроцесор є багат шаровий перцептрон, оскільки цей тип нейронної мережі використовує алгоритм зворотного поширення похибки, передбачено два проходи в усіх шарах мережі: прямий і зворотний.

Також цей тип має оптимальний метод навчання – алгоритм зворотного поширення похибки. Перевагами цього методу навчання є: локальність методу змін синоптичних ваг і порогів у багат шаровому перцептроні; ефективність методу обчислення всіх часткових похідних функцій вартості за вільними параметрами.

Інтеграція мікропроцесора з відповідною матрицею та використання нейронної мережі робить лаб-чипи автономними та більш функціональними.

Лабораторії-на-чипі можна розглядати як підмножину МЕМС, які містять багато компонентів, що вийшли з цих досліджень: мікронасоси, капіляри, клапани, датчики, важелі, сенсори тощо. Однією з найбільших переваг лабораторії-на-чипі є невеликі розміри, паралельність і швидкодія. Існують також численні проблеми, проте це можна виправити реінжинірингом на рівні функціональності традиційного лабораторного обладнання.

Структурна схема обробки даних, отриманих спектральним аналізом, дає змогу обробляти та класифікувати спектри без використання комп'ютера. Такою інтеграцією можна пришвидшити розроблення багатфункціональних лаб-чипів, що є надзвичайно важливим та актуальним завданням для прикладної біології, медицини та ветеринарії.

3.4. ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНЕ МОДЕЛЮВАННЯ ОКРЕМИХ ПАТОЛОГІЙ ВНУТРІШНІХ ОРГАНІВ

3.4.1. Моделювання гастро- та ентеропатології з виразково-ерозійним процесом

Профілактика та лікування тварин, хворих на гастро-та ентеропатологію, залишається темою численних досліджень у яких важливе значення належить саме експерименту. Тому, експериментальне відтворення гастро- та ентеропатології у лабораторних тварин є перспективним кроком у проведенні будь-якої складності досліджень *in vivo* як на рівні цілісного організму, так й окремих систем, органів, тканин та їхніх клітин, в умовах лабораторії, без залучення в дослід продуктивних тварин.

Використання лабораторних тварин як зручних і економічно-вигідних біологічних об'єктів дає можливість в умовах лабораторії на моделі експериментальної гастро- та ентеропатології провести випробування ефективності лікувальних схем і новостворених лікувальних препаратів.

Біохімічні механізми регуляції функціонування органів системи травлення при експериментальній гастроентеропатології. Функціональна та морфологічна цілісність органів травного тракту, та зокрема кишечника, в значній мірі залежать від парціального тиску кисню в тканині та нутрієнтів, що доставляються по кровоносних мікросудинах. Одним із наслідків порушення оксигенації органу є розвиток гіпоксії, що, в свою чергу, може призвести до ураження епітеліоцитів, розвитку виразок та навіть некрозу, внаслідок активації вільно-радикальних реакцій, пероксидації ліпідів, збільшення числа вільних форм кисню і продукції запальних медіаторів. Гіпоксичні зміни є ключовим патогенетичним чинником захворювань кишечника (запальні захворювання кишечника), а також часто летальним чинником розвитку некрозу кишкового трансплантату при черевно-анальних резекціях прямої кишки та непередбаченого і майже стовідсотково

летального захворювання як інфаркт кишки внаслідок гострої мезентеральної ішемії.

Зважаючи на масштабність та безперечну важливість цієї проблеми для практичної гастроентерології, абдомінальної хірургії та онкології вченими зроблено вагомий внесок у її вирішення.

Запальні захворювання кишечника, до яких належить виразковий коліт, характеризуються хронічним неспецифічним запаленням та виразками стінки кишечника невизначеної етіології. В останнє десятиріччя, за даними експертів Всесвітньої організації охорони здоров'я та вітчизняної і зарубіжної літератури, спостерігається стійка тенденція до зростання захворюваності на запальні захворювання кишечника. Щорічно реєструється від 5 до 60 нових хворих на 100 тис. населення. Понад 50 % хворих знаходиться в працездатному віці. За тяжкістю протікання та частотою ускладнень, що нерідко є причиною збільшення терміну непрацездатності, а також інвалідності і навіть смерті хворих, запальні захворювання кишечника займають одне з провідних місць серед захворювань шлунково-кишкового тракту.

Сучасна терапія запальних захворювань кишечника спрямована на зменшення запалення (5-аміносаліцилат, стероїдна терапія), корекції імунологічної відповіді (антитіло до TNF- α «Інфліксімаб») та пригнічення можливих патогенних чинників (антибіотики), що в більшості випадків має потужну побічну дію. Водночас поза увагою залишаються терапевтичні заходи, направлені на відновлення кишечного бар'єру.

Кишечний бар'єр складається з шару епітеліальних та ендотеліальних клітин. Епітеліальний бар'єр сформований безперервним шаром клітин поверхневого епітелію і попереджує penetрацію бактерій та інших антигенів в слизову оболонку кишечника. Функціональна та морфологічна цілісність епітеліального бар'єру суттєво залежить від кисню та нутрієнтів, що доставляються кровоносними мікросудинами слизової оболонки кишечника. Отже, будь-які патологічні зміни кровоносних судин призводять до розвитку гіпоксії з наступним ураженням епітеліоцитів, порушенням кишечного бар'єру, розвитком ерозій та виразок.

Порушення процесу формування нових кровоносних судин (ангіогенез) та функціональної активності мікросудин кишечника за умов хронічного протікання запальних захворювань кишечника було показано численними клінічними та експериментальними дослідженнями. Не дивлячись на різнобічне дослідження анатомічних, морфологічних, функціональних змін ендотелію/мікросудин слизової оболонки кишечника в патогенезі запальних захворювань кишечника та за умов дії про-запальних медіаторів, прямої відповіді на питання про роль ендотеліального бар'єру в механізмах ініціації ураження кишечної стінки, а також ролі факторів з ангіогенною активністю в патогенезі запальних захворювань кишечника відсутні чи залишаються на рівні припущень та гіпотез.

У результаті встановлено, що початкові стадії розвитку спонтанних запальних захворювань кишечника (до появи виразок) характеризуються наявністю ділянок з ознаками периваскулярного набряку, вкритих інтактним шаром поверхневих епітеліоцитів. Ці дані отримані на відносно молодих (вік 6 тижнів) мишах з дефіцитом гена α -субодиниці 2-го типу інгібувального G протеїну ($G\alpha i2^{-/-}$). Більш пізні стадії хронічних запальних захворювань кишечника у цих мишей (віком 16 та 45 тижнів), коли гістологічно виявлялись виразки та ерозії, характеризувалися присутністю фокальних зон з периваскулярним набряком, що були інфільтровані лейкоцитами і вкриті інтактним епітелієм. Дослідження на іншій моделі спонтанних запальних захворювань кишечника в мишей віком 10 і 12 тижнів на фоні дефіциту інтерлейкіну-10 (миші $IL-10^{-/-}$) – підтвердили ці дані. Так, в обох вікових групах у 100 % випадків було виявлено ділянки слизової оболонки товстої кишки з периваскулярним набряком власної пластинки слизової оболонки (*lamina propria*), повністю вкриті інтактним шаром поверхневих епітеліоцитів.

На цій підставі зроблено припущення, що ураження ендотеліальних клітин та підвищення проникності мікросудин відіграють критичну роль у розвитку ерозій та виразок у патогенезі запальних захворювань кишечника та можуть бути однією із причин рецидиву даного захворювання.

Для підтвердження участі ендотеліального бар'єру в розвитку порушень цілісності епітелію при запальних захворювань кишеч-

нику, досліджено зміни проникності ендотеліального та епітеліального шарів слизової оболонки товстої кишки на ранніх стадіях розвитку хімічно-викликаного коліту (до виникнення уражень), який характеризується чітко визначеним часом розвитку різних стадій запалення/ураження. Дослідження проводили на моделі йодоацетамід-зумовленого коліту, при якому ураження слизової оболонки товстої кишки розвиваються вже в перші години після введення йодоацетаміду. Крім того, застосовано модель декстран сульфат натрію(DSS)-зумовленого коліту, який протікає повільніше і характеризується розвитком перших клінічних ознак хвороби у вигляді крові у калі, втрати маси тіла тварин лише на 3-тю добу, а макроскопічні ураження товстої кишки спостерігаються лише на 7-му добу введення DSS. Одержані результати вперше показали, що ураження ендотеліальних клітин та збільшення проникності ендотеліального шару мікросудин слизової оболонки товстої кишки на фоні йодоацетамід- чи DSS-зумовленого коліту розвиваються значно раніше збільшення проникності її епітелію, передуючи розвитку ерозій та виразок. Збільшення проникності мікросудин слизової оболонки товстої кишки супроводжувалось поступовим розвитком набряку *lamina propria*, призводячи до відшарування епітелію від базальної мембрани. При цьому не спостерігалось порушення цілісності епітеліального шару та інфільтрації лейкоцитів на обох моделях хімічно-зумовленого коліту.

Ультроструктурні дослідження стану ендотеліальних та епітеліальних клітин слизової оболонки товстої кишки щурів підтвердили дані кількісного аналізу і виявили незмінені поверхневі епітеліоцити з інтактною щітковою облямівкою та щільними контактами на ранніх стадіях розвитку експериментального коліту. За цих умов у капілярах підслизового шару виявлено стаз еритроцитів, що асоціювався з периваскулярним та міжепітеліальним набряком. Це свідчить про збільшення проникності судин, яке було підтверджено наявністю проміжків між ендотеліальними клітинами мікросудин. Відповідно до змін в капілярах посилювалась агрегація тромбоцитів та їх екстравазація в периваску-

лярний простір, який був збільшений та заповнений фібрилярними структурами (скоріше за все фібрином).

Одним із наслідків порушення нормального функціонування ендотелію судин є розвиток гіпоксії, що, своєю чергу, може призвести до ураження епітеліоцитів кишечника внаслідок активації вільно-радикальних реакцій, пероксидації ліпідів, збільшення числа вільних форм кисню і продукції запальних медіаторів. Встановлено, що, крім уражень ендотелію та стазу капілярів слизової оболонки товстої кишки експериментальних тварин, спостерігається посилення гіпоксії у поверхневих колоноцитах, яке за динамікою передує підвищенню проникності епітеліального шару. Розвиток гіпоксії асоціювався зі збільшенням вмісту транскрипційного фактора NF-1 α , котрий є ключовим регулятором відповіді клітин на зміни кисневого гомеостазу.

Оскільки запальні захворювання кишечника є хронічними хворобами з частими рецидивами, встановлені дані щодо раннього підвищення проникності кровоносних мікросудин можуть стати діагностичним маркером місця виникнення уражень та прогнозування можливого рецидиву хвороби. Місце екстравазації фарби візуалізувати за методикою Еванса (24-48 год для DSS- та 15–30 хв для йодоацетамід-зумовленого коліту) у вигляді синьої плями, яка локалізувалась виключно в дистальному відділі товстої кишки (де пізніше виникають ураження при DSS- та йодоацетамідзумовленому коліті), коли макроскопічні зміни в стінці кишки ще не спостерігаються.

Так встановлено, що набряк *lamina propria* та інфільтрація стінки кишечника лейкоцитами, які є характерними ознаками патогенезу запальних захворювань кишечника в людини, виникають на фоні збільшеної проникності кровоносних мікросудин. Збільшення проникності кровоносних мікросудин супроводжувалось підвищенням рівня найпотужнішого стимулятора проникності кровоносних судин, VEGF.

Слід також підкреслити, підвищення адгезії тромбоцитів на ранніх стадіях розвитку експериментального коліту. Тромбоцитоз є супутньою патологією хворих на запальні захворювання кишечника, більш того тромбоцити хворих на запальні захворювання кишеч-

нику знаходяться в активованому стані, що, по-перше, збільшує їх агрегацію та адгезію, а по-друге підвищує вивільнення про-запальних медіаторів (CD40L, IL-1 β , тромбоцитарний фактор-4, RANTES) та факторів з ангіогенною активністю (VEGF). Отже, за умов ремісії активовані тромбоцити є, так би мовити, «бомбою повільної дії», які можуть спричинювати збільшення проникності судин через надмірне виділення VEGF чи викликати гіпоксію в слизовій оболонці кишечника за рахунок тромбозу мікросудин. Зазначені фактори призводять до порушення цілісності епітеліального шару та рецидиву хвороби.

Ураження ендотелію призводить до значних змін функціональної активності ендотеліальних клітин, підвищення їх адгезії до клітин запалення та тромбоцитів, а також активації процесів ангіогенезу. В основі цих подій лежать зміни транскрипційної активності клітин і запуску експресії генів асоційованих з розвитком судинної патології.

Вважається, що Egr-1 є ключовим регуляторним протеїном, в запуску про-запальної відповіді на пошкоджувальні стимули при судинній патології. Його експресія дуже швидко активується великою кількістю різних стимулів (фактори росту, цитокіни, оксидативний стрес, гіпоксія, іонізуюче випромінювання, механічне напруження, ураження судин). У свою чергу, Egr-1 сам, або через взаємодію з іншими транскрипційними факторами, бере участь в регуляції експресії про-ангіогенних факторів (bFGF, PDGF-A, PDGF-B, VEGF, VEGFR-1, ангіопоедин-1, протеази), а також про-запальних медіаторів (ICAM-1, VCAM-1, TNF- α , IL-1 β , IL-2, хемотаксичний білок моноцитів-1, тканинний фактор, GM-CSF).

Показано, що вміст Egr-1 протеїну та рівень мРНК на різних стадіях розвитку експериментального коліту, спричиненого йодоацетамідом, зростає вже на 30-ій хв. Максимальні значення цих показників підтримуються впродовж першої доби, з наступним зниженням до 7-ої доби експерименту. Ці зміни співпадають в часі з активацією Erk1/2-кіназного шляху трансдукції сигналу в слизовій оболонці товстої кишки, який може запускати експресію та активувати Egr-1. Розвиток експериментального коліту спричи-

нює також швидку транслокацію Egr-1 із цитоплазми в ядро, де він ефективно зв'язується з відповідними cis-елементами ДНК.

Встановлено низку транскрипційних факторів, що формують протеїнові комплекси з Egr-1, в патогенезі експериментального коліту за допомогою «TranSignal™ Protein/DNA Array». За даними літератури регуляторна активність Egr-1 пов'язана з іншим транскрипційним фактором – Sp1, їх сайти зв'язування частково перекриваються в спільній (-GGGCGG-) ділянці промотора низки генів. Ці транскрипційні фактори можуть конкурувати один з одним за центри зв'язування в промоторній ділянці залежно від їх концентрації в ядрі ендотеліальних клітин. З'ясовано, що за нормальних умов Egr-1 формує стійкий комплекс з Sp1. Розвиток запалення з наступним формуванням ерозій та виразок на фоні експериментального коліту супроводжувався зменшенням вмісту протеїну Sp1 і, відповідно, рівня його взаємодії з Egr-1.

Також показано, що Egr-1 формує протеїнові комплекси з іншими транскрипційними факторами, а саме: PPAR, GAS/ISRE, USF-1, AP-2, NF-E1, NF-E2, NF-κB, MEF-1, Muc-Max, PAR(DR5), E2F1, MRE, TR, GAG, ADR1, GATA-1/2, CREB-BP1, FKHR, рівень взаємодії з якими змінюється залежно від стадії розвитку коліту. В процесі розвитку запалення на фоні коліту найміцніший комплекс формується між Egr-1 та NF-κB. NF-κB бере участь у регуляції експресії генів імунної відповіді та запального процесу і активується при порушенні редокс-гомеостазу клітин та дії про-запального цитокіну TNF-α. NF-κB вважається центральним про-запальним транскрипційним фактором у патогенезі запальних захворювань кишечника та з'єднувальним ланцюгом між хронічним виразковим колітом та розвитком колоректального раку.

За нормальних умов Egr-1 формує стійкий протеїновий комплекс з PPAR, який практично не змінюється на фоні розвитку експериментального коліту. Відомо, що PPAR відіграє захисну роль у патогенезі запальних захворювань кишечника, а введення тваринам агоністів PPAR значно покращує стан при експериментальному коліті за рахунок зниження експресії маркерів запалення, в т. ч. NF-κB. У роботі припускається, що отримана стійка взаємодія між Egr-1 та PPAR за нормальних умов може бути

одним із захисних механізмів у патогенезі запальних захворювань кишечника.

Egr-1 є чутливим до гіпоксії транскрипційним фактором, який запускає експресію низки генів, залучених до реалізації клітинної відповіді на зниження pO_2 ; таких як тканинного фактора, факторів росту, цитокінів/хемокінів та рецепторів адгезії. Крім того, сайт зв'язування з Egr-1 був знайдений в промоторній ділянці гена VEGF, основним регулятором транскрипції якого є HIF-1. Встановлено, що регуляторна активність Egr-1 не залежить від HIF-1 в патогенезі запальних захворювань кишечника.

З метою подальшого з'ясування ролі Egr-1 як можливого патогенетичного чинника розвитку уражень при запальних захворюваннях кишечника проведено порівняння морфологічних ознак експериментального коліту в мишей з гомозиготною (Egr-1^{-/-}) та гетерозиготною (Egr-1^{+/-}) мутацією в гені протеїну Egr-1 та диким типом. Було знайдено, що дефіцит Egr-1 призводить до значного зменшення проявів морфологічних ознак йодоацетамід-зумовленого коліту. Отже, активація Egr-1 запускає експресію пошкоджувальних стимулів і є однією із причин розвитку уражень в патогенезі запальних захворювань кишечника.

Розвиток будь-якого запального процесу складається із двох стадій: гострої та хронічної. В перші години розвитку запального процесу (гостра фаза) спостерігається збільшення проникності ендотеліального шару з наступним підвищенням адгезії до лейкоцитів, активація процесів коагуляції, а на більш пізніх стадіях (фаза хронічного запалення) – формування нових кровоносних мікросудин (ангіогенез). Початкові етапи розвитку запальних захворювань кишечника характеризуються переважанням гострого запалення, яке поступово переходить у стадію хронічного. VEGF є унікальним фактором, здатним, з одного боку, посилювати проникність кровоносних судин та збільшувати експресію протеїнів адгезії ендотеліальними клітинами, а, з другого боку, стимулювати ангіогенез.

У науковій літературі продемонстровано підвищення експресії протеїну та мРНК VEGF за умов гострого йодоацетамід-зумовленого коліту та хронічних спонтанних колітів у IL-10^{-/-} мишей.

Імуногістохімічне барвлення стінки товстої кишки виявило, що основним джерелом VEGF у слизовій оболонці товстої кишки є ендотеліальні, епітеліальні клітини та лейкоцити. За допомогою імуноблот-аналізу встановлено зростання вмісту VEGFR-2, який є основним рецептором в опосередкуванні VEGF-стимульованої проникності кровоносних судин та його про-ангіогенних ефектів. Вміст протеїну VEGFR-1 підвищується лише на стадіях хронічного протікання хвороби, що може пояснюватися збільшенням його експресії інфільтрованими моноцитами/макрофагами.

Відомо, що нейтралізація активності VEGF введенням антитіла до VEGF призводить до значного зменшення клінічних та морфологічних параметрів експериментального коліту і за ступенем ефективності не відрізняється від загальноживаного препарату в лікуванні виразкового коліту у людей – 5-аміносаліцилової кислоти (месалазін). Важливо відмітити, що введення антитіла до VEGF не призводило до зменшення кількості кровоносних судин в ділянках грануляційної тканини порівняно з тваринами контрольних груп, що вимірювали за кількістю судин, позитивних до маркеру ендотеліальних клітин – фактора фон Віллебранда.

Новоутворені кровоносні судини в патогенезі запальних захворювань кишечника характеризуються підвищеною проникністю та незрілістю, що сприяє інфільтрації лейкоцитів та переходу хвороби у хронічну стадію. Так доведено, що введення нейтралізуючого антитіла до VEGF значно зменшує транссудацію фарби Еванса в слизову оболонку товстої кишки при йодоацетамідзумовленому коліті. Таким чином, показано, що зростання рівня VEGF призводить до збільшення проникності кровоносних мікросудин слизової оболонки товстої кишки. Водночас, загоєння виразок на фоні введення нейтралізуючого антитіла до VEGF було пов'язано зі зменшенням числа лейкоцитів у ділянці ураження.

Ефекти VEGF на функції ендотеліальних клітин, а саме проліферацію, міграцію, виживання та проникність кровоносних судин, опосередковуються різними внутрішньоклітинними сигнальними шляхами (Erk1/2, Akt, Src) через активацію VEGFR-2.

Встановлено провідну роль Src-тирозинкінази в VEGF-опосередкованому посиленні проникності кровоносних судин у патогенезі експериментального коліту та досліджено внутрішньоклітинний механізм цього процесу. Розвиток йодоацетамід-зумовленого коліту супроводжується підвищенням вмісту загального протеїну VEGFR-2 та його фосфорилування за залишком Tyr951 у слизовій оболонці товстої кишки щурів. Паралельно спостерігається активація Src-тирозинкінази та підвищення міжпротеїнової взаємодії між β -арестином 2 та VE-кадгерином, тоді як загальний вміст протеїну VE-кадгерину залишається без змін.

У літературі вже підтверджено провідну роль посилення проникності кровоносних мікросудин у патогенетичній дії VEGF при запальних захворюваннях кишечника. І в цьому випадку, продемонстровано активацію Src-кінази, яка відіграє провідну роль в VEGF/VEGFR-2-зумовленому збільшенні проникності кровоносних судин. Фосфорилування кінази Akt, яка також частково опосередковує дію VEGF на проникність кровоносних судин і, в значній мірі, зумовлює виживання ендотеліальних клітин, також посилюється, але в меншій мірі. При цьому рівень активації Erk1/2, навпаки, є знижений у мишей IL-10^{-/-}.

Ще одним доказом важливої ролі шляху VEGF/VEGFR-2 у збільшенні проникності кровоносних мікросудин у патогенезі запальних захворювань кишечника є дані літератури щодо активації D2-дофамінових рецепторів. Зокрема показано, що взаємодія дофаміну з D2-дофаміновими рецепторами ендотеліальних клітин супроводжується пригніченням фосфорилування VEGFR-2 і, як результат, зменшенням проникності кровоносних судин. Згідно з отриманими даними, розвиток експериментального коліту пов'язаний з порушенням синтезу дофаміну, який визначають за рівнем тирозингідроксилази в слизовій оболонці товстої кишки щурів. Агоністи D2-дофамінових рецепторів, квінпірол (1 мг/100 г) та бромокриптин (5 мг/100 г) майже вдвічі зменшують проникність кровоносних судин слизової оболонки товстої кишки щурів з йодоацетамід-зумовленим колітом. Так як, агоністи D2-дофамінових рецепторів широко використовуються в клінічній практиці для пригнічення лактації у жінок (каберголін), а

також у пацієнтів з хворобою Паркінсона (бромокриптин) вони можуть стати потенційно новими терапевтичними засобами в терапії запальних захворювань кишечника.

У науковій літературі описано механізм паралельного підвищення рівня про- і анти-ангіогенних факторів у патогенезі запальних захворювань кишечника. Так, встановлено роль ендостатину, який є одним з найпотужніших ендогенних анти-ангіогенних факторів, що має анти-канцерогенні властивості. Він утворюється в результаті протеолітичної деградації колагену XVIII при дії протеїназ, у т. ч. матриксної металопротеїназ-9 (ММР-9).

Показано підвищення вмісту ендостатину в товстій кишці щурів як із йодоацетамід-зумовленим колітом, так і на моделі спонтанних запальних захворювань кишечника в мишей IL-10^{-/-}, яке корелювало зі збільшенням активності та вмісту протеїну ММР-9. Миші з дефіцитом ММР-9 (миші ММР-9^{-/-}) відрізнялися значно нижчим рівнем ендостатину в нормі та на фоні DSS-зумовленого коліту відносно відповідних показників у мишей дикого типу. Водночас рівень іншого анти-ангіогенного фактора – ангіостатину, який також може утворюватись у результаті протеолітичної деградації плазміногену під дією ММР-9, не змінювався. Таким чином встановлено, що ММР-9 відіграє провідну роль в утворенні ендостатину за нормальних умов та при експериментальному коліті.

У літературі продемонстровано паралельне підвищення вмісту ендостатину та двох про-ангіогенних факторів VEGF та PDGF на моделі йодоацетамід-зумовленого коліту та в IL-10^{-/-} мишей. Крім того, знайдено позитивний кореляційний зв'язок між розміром уражень товстої кишки при експериментальному коліті та вмістом ендостатину. Ці дані узгоджуються з результатами щодо збільшення рівня про-ангіогенних факторів ангіогеніну та ангіомонтіну-2 у сироватці хворих на запальні захворювання кишечника і вищого рівня ендостатину в хворих з прогресуючим виразковим колітом.

Одночасне підвищення вмісту VEGF, PDGF та ендостатину припускає існування функціонального взаємозв'язку між цими факторами в патогенезі експериментальних запальних захворювань

кишечнику. Порівняльними дослідженнями на мишах MMP-9^{-/-}, що мали знижений рівень ендостатину, та мишах дикого типу з його підвищеним рівнем при DSS-зумовленому коліті показано значне падіння рівня PDGF у мишей MMP-9^{-/-}, яке за своїм характером відповідало змінам у рівні ендостатину.

Результати зазначених вище досліджень дозволили припустити участь ендостатину в регуляції експресії PDGF. Паралельне підвищення PDGF та ендостатину може позитивно впливати на патогенез запальних захворювань кишечника за рахунок відновлення процесів фізіологічного ангиогенезу. Протилежна картина спостерігалась для VEGF: рівень якого був навіть вищим у мишей MMP-9^{-/-} порівняно з диким типом на фоні коліту, спричиненого DSS. Малоімовірно, що MMP-9 безпосередньо впливає на рівень VEGF, оскільки індукція експресії MMP-9, введенням рекомбінантного аденовірусу, не змінювала цей показник. Ймовірно, підвищення рівня VEGF у мишей MMP-9^{-/-} пов'язане зі зменшенням рівня ендостатину. У літературі показано, що нейтралізація активності VEGF за допомогою антитіла до VEGF призводить до зниження рівня не лише VEGF, але й ендостатину в товстій кишці щурів з експериментальним колітом. Таким чином, встановлено існування регуляторного взаємозв'язку між ендостатином та VEGF.

В оглядових та експериментальних статтях доведено, що, на відміну від про-ангіогенних факторів bFGF, PDGF, HGF, ефекти VEGF протилежні в механізмах виразкоутворення при виразковій хворобі гастроудоденальної зони та запальних захворюваннях кишечника. Пригнічення активності VEGF значно покращує клінічні та морфологічні показники експериментального коліту, та має протилежну дію при експериментальній виразковій хворобі гастроудоденальної зони. В той час, як введення bFGF, PDGF чи HGF значно посилює загоєння уражень як при експериментальних запальних захворюваннях кишечника, так і при виразковій хворобі гастроудоденальної зони.

Отже, припускається, що VEGF здатен стимулювати як нормальний/фізіологічний ангиогенез (виразкова хвороба гастроудоденальної зони), так і надмірний/патологічний ангиогенез (запальні

захворювання кишечника) в залежності від особливостей патогенезу хвороби, а ендостатин може бути своєрідним антагоністом VEGF-опосередкованих ефектів. Одночасне підвищення рівня ендостатину та VEGF у слизовій оболонці дванадцятипалої кишки також показано на моделі експериментальної виразки дванадцятипалої кишки. Крім того показано, що введення щурам рекомбінантного ендостатину значно покращує клінічні (втрата маси тіла, консистенція випорожнень, наявність крові в випорожненнях) та морфо-логічні ознаки DSS-зумовленого коліту в мишей. Введення ендостатину щурам з цистеамін-зумовленою виразкою дванадцятипалої кишки, навпаки, справляє негативний ефект на швидкість загоєння виразок.

Таким чином, паралельне підвищення ендостатину в патогенезі запальних захворювань кишечника (патологічний ангиогенез) є важливою ланкою в системі захисту організму від патологічного впливу надекспресії VEGF. Це положення підтверджується визначеною ефективністю 5-аміносаліциловою кислотою-зумовленого покращення клінічних та морфологічних параметрів експериментального коліту при відновленні балансу між VEGF та ендостатином. Так визначено роль ендотеліального бар'єру в патогенезі запальних захворювань кишечника.

Сформульовано нову концепцію молекулярних механізмів патогенезу запальних захворювань кишечника з огляду на роль кишечного бар'єру в ньому. Зокрема фактори, що призводять до збільшення проникності кровоносних мікросудин (VEGF) та змінюють функціональну активність ендотеліальних клітин (гіпоксія) можуть сприяти рецидиву хвороби. У літературі припускається, що генетичні чи зовнішні фактори, які призводять до спонтанної зміни щільності міжендотеліальних адгезивних контактів (VE-кадгерин) чи порушення експресії асоційованих з ендотелієм транскрипційних факторів (Egr-1) одночасно є етіологічними факторами схильності до запальних захворювань кишечника. Надмірна активація про-ангіогенного потенціалу в патогенезі запальних захворювань кишечника супроводжується захисною відповіддю організму у вигляді експресії анти-ангіогенних факторів, одним із яких є ендостатин. Фармакологічна корекція балансу

між про- та анти-ангіогенними факторами і приведення його до фізіологічної норми може бути використано у лікуванні хворих на запальні захворювання кишечника. Діагно-стування посилення проникності кровоносних мікросудин у слизовій оболонці кишечника хворих на ЗЗК рекомендовано як маркер для підбору ефективної терапії, а також як прогностичний маркер при рецидиві хвороби.

Хронічний перебіг запальних захворювань кишечника, пов'язаний з порушенням балансу між про- та анти-ангіогенними факторами, супроводжується розвитком патологічного ангіогенезу і може бути передумовою розвитку коліт-асоційованого канцерогенезу.

У літературі наведено результати комплексного дослідження функціонального стану основних елементів Ca^{2+} -залежного сигнального шляху (фосфоліпази С, фосфоліпідів (ФЛ), Ca^{2+} , протеїнази С, Ca^{2+} /кальмодулінзалежної протеїнкінази) та їх функціональних зв'язків з окремими ланками інших сигнальних систем (НО-синтази, протеїнкінази А, протеїнкінази G та тирозинової протеїнкінази) в епітеліоцитах слизової оболонки товстої кишки за умов експериментального коліт-асоційованого канцерогенезу. Відмічено участь Ca^{2+} та НО-синтази у формуванні первинних проявів запалення при виразковому коліті. Показано накопичення протеїнів-модуляторів мітохондріальної ланки апоптоз, про- (Bax) і анти-апоптичного (Bcl-2) протеїнів, на пізніх строках формування онкопатології. Отримані результати є теоретичною основою для науково-обгрунтованої корекції виявлених метаболічних порушень.

Мета і завдання роботи: отримати модель гастроентеропатології з виразково-ерозійним процесом при пероральному введенні лабораторним щурам один раз на добу впродовж двох тижнів розчину препарату диклофенак; відповісти на контрольні питання.

Обладнання, матеріали і реактиви: засоби індивідуального захисту (гумові рукавички, халат та ін. відповідно до вимог техніки безпеки), ваги, шприці, зонди, 5 % розчин натрію диклофенаку.

Хід роботи

1. Проводиться зважування щурів та розрахунок необхідного для введення об'єму препарату;

2. Диклофенак вводять щурам (бажано з масою тіла біля 200–220 г) внутрішньошлунково у дозах 0,80 мг/тварину (тяжка форма перебігу захворювання) або 0,60 мг/тварину (середня тяжкість перебігу захворювання), протягом чотирнадцяти діб, один раз на добу, викликаючи запальний процес в результаті подразнюючої дії хлористоводневої кислоти на незахищену слизову оболонку шлунка та кишечника.;

3. Через 14 діб після останнього введення препаратів оцінюють стан шлунка та кишечника.

Контрольні питання

1. Який механізм дії диклофенаку на слизову оболонку шлунка і кишечника?

2. Як моделюють розвиток гастроентеропатології з виразково-ерозійним процесом у лабораторних щурів?

Рекомендована література

1. Пат. № 83904 – Україна. Спосіб моделювання медикаментозного гастроентериту з виразково-ерозійним процесом у лабораторних щурів / Мельничук Д. О., Грищенко В. А., Терещенко С. В., Реброва З. Б. G09B 23/28, – № а 200610876; заявл. 16.10.2006; опубл. 26.08.2008, Бюл. № 16.

2. Томчук В. А. Ліпіди та ентеропатологія телят / В. А. Томчук, В. А. Грищенко. – К.: ЦП «Компринт», 2016. – 508 с.

3. Abd Elazem. Adverse effects of diclofenac potassium and dexamethason on some hematobiochemical and immunological parameters in Egyptian goat bucks / Abd Elazem, M. A. Seham, Y. Abo-Kora. – Journal of American Science. – 2015. – 11(7). – P. 92–99.

4. Ahmad I. Hematological effects of diclofenac sodium in goat / I. Ahmad, T. Quresh, U. [et al.] // Journal of Animal and Plant Sciences/ – 23(1)/ – P. 103–107.

5. Basavraj S. B. Haematobiochemical alterations induced by diclofenac sodium toxicity in Swiss albino mice / S. B. Basavraj, D. T. Fefar, K. S. Prajapati [et al.] // Veterinary World – 2012. – 5(7). – P. 417–419.

6. Early endothelial damage and increased colonic vascular permeability in the development of experimental ulcerative colitis in rats and mice / G. Tolstanova, X. Deng, S.W. French [et al.] // *Lab Invest.* – 2012; 92(1):9–21 Epub 2011 Sep 5.

7. El-Maddawy Zeynab Kh. Hepato-Renal and Hematological Effects of Diclofenac Sodium in Rats / Kh. El-Maddawy Zeynab, M. El-Ashmawy Ibrahim // *Global Journal of Pharmacology.* – 2013. – 7(2). – P. 123–132.

8. Gan T. J. Diclofenac: an update on its mechanism of action and safety profile / T. J. Gan. // *Current Medical Research and Opinion.* – 2010. – 26. – P. 1751–1731.

9. Gryshchenko V.A. Biochemical properties of the plasma of rats with the experimentally induced hepatitis after oral administration of sodium diclofenac / V.A. Gryshchenko // *Regulatory Mechanisms in Biosystems.* – 2017. – 8(2). – P. 191–196.

10. Harirforoosh S. Adverse effects of nonsteroidal antiinflammatory drugs: an update of gastrointestinal, cardiovascular and renal complications / S. Harirforoosh, W. Asghar, F. Jamali // *Journal of pharmacy & pharmaceutical sciences: a publication of the Canadian Society for Pharmaceutical Sciences, Societe canadienne des sciences pharmaceutiques.* – 2013. – 16(5). – P. 821–847.

11. Kernychniy V. Intraoperative diagnosis of ischemic segment of colon that descends to the perineum during abdominal-anal pull-through resection of the rectum. / V. Kernychniy, G. Tolstanova, A. Sukhodolya // *Gut.* – 2011. – Vol. 60 (Supl; 5). – P. 9.

12. Orinya O. A. Haematological and biochemical studies on the effect of diclofenac sodium on Wistar *Rattus norvegicus* / O. A. Orinya, A. Y. Adenkola, R. J. Ogbe // *International Journal of Biological and Chemical Sciences.* – 2016. – 10(5), 2231–2242.

13. Ragbetli C. Effects of Diclofenac Sodium on the Rat Liver in Postnatal Period / C. Ragbetli, A. Aydinlioglu, M. Kara [et al.] // *Journal of Animal and Veterinary Advances.* – 2009. – 8(9). – P. 1761–1764.

14. Role of D2 Dopamine Receptors in the Pathogenesis of Experimental Ulcerative Colitis: Implication of Colonic Vascular Permeability / G. Tolstanova, X. Deng, K. Osapay [et al.] // *Gastroenterology.* – 2010. – Vol. 138. – N 5. – P. S–264.

15. Schapira D. Diclofenac-induced hepatotoxicity / D. Schapira, L. Bassan, A. M. Nahir [et al.] // Postgraduate medical Journal. – 1986. – 62. – P. 63–65.

16. Suhodolya A. Intraoperative diagnosis of ischemic segment of colon that descends to the perineum during abdominal-anal pull-through resection of the rectum / A. Suhodolya, V. Kernychniy, G. Tolstanova // Gut. – 2011. – Vol 60. – № 3. – A9.

17. Syed N. I. Comparing the effects of salts of diclofenac and alminoprofen with aspirin on serum electrolytes, creatinine and urea levels in rabbits / N. I. Syed, F. Zehra, A. A. Syed [et al.] // Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences. – 2012. – 25(4). – P. 777–782.

18. Tomic Z. Diclofenac and ketoprofen liver toxicity in rat / Z. Tomic, B. Milijasevic, A. Sabo [et al.] // European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics. – 2008. – 33(4). – P. 253–260.

3.4.2. Моделювання медикаментозного ураження печінки під дією парацетамолу

Найбільш частою причиною лікарських уражень печінки є одночасне вживання двох гепатотоксичних речовин – алкоголю і парацетамолу. При передозуванні парацетамолом виникає тяжке ураження печінкової паренхіми, яке зумовлене тим, що він зв'язується з цитохромом P450 ендоплазматичного ретикулу гепатоциту з утворенням високотоксичного метаболіту п-оксиацетамінофену в дегідрованій ацетимидохінонній формі. Продукт метаболічного перетворення парацетамолу може ковалентно зв'язуватися з життєво важливими макромолекулами гепатоцитів, позбавляючи їх нормальної функціональної активності. Це і відіграє роль пускового механізму в розвитку парацетамолового некрозу печінки.

Парацетамол гепатотоксичний тільки у досить високих дозах або ж у невеликих кількостях при ослабленій детоксикаційній функції печінки. Для людини, що не зловживає алкоголем, парацетамол виявляє гепатотоксичні властивості в дозі, що перевищує 7,5 г. Смертельним є вживання більш ніж 140 мг препарату на кг маси тіла людини. Це близько 10 г для чоловіка масою в 70 кг. Ризик

отруєння парацетамолом, як вже вказувалося, зростає у осіб, що страждають на хронічний алкоголізм, внаслідок індукції етанолом у них системи цитохрому P450, а також недостатністю харчування та низьким рівнем глутатіона, який відіграє роль внутрішньоклітинного протектора і, зазвичай, знаходиться у гепатоцитах.

Антидотом при отруєнні парацетамолом є N-ацетилцистеїн. Його вживають спочатку в дозі 140 мг/кг, а потім ще 17 разів (через кожні 4 год) у підтримуючій дозі 70 мг/кг. Доцільність використання активованого вугілля лишається спірною, оскільки воно може зменшувати всмоктування антидота.

У щурів при інтрагастральному введенні парацетамолу в дозі 2,5 г на кг маси тіла тварини, як правило, вже на другу добу в центральних і середніх відділах печінкових часточок розвивається некроз.

Для вивчення ефекту гепатопротекторів, їх уводять тваринам щоденно за 1 год до й через 2 год після введення парацетамолу.

Мета і завдання роботи: отримати модель лікарського ураження печінки під дією парацетамолу у щурів; відповісти на контрольні питання.

Обладнання, матеріали і реактиви: засоби індивідуального захисту (гумові рукавички, халат та ін. відповідно до вимог техніки безпеки), ваги, шприці, зонди, парацетамол у 2 %-ому розчині крохмального гелю.

Хід роботи

1. Проводиться зважування тварин (щурів) та розрахунок необхідної для введення кількості парацетамолу за дози 2,5 г на кг маси тіла тварини.

2. Парацетамол у 2 %-ому крохмальному гелі вводять щурам внутрішньошлунково у дозі 2,5 г на кг маси тіла тварини. Введення парацетамолу проводять впродовж двох діб.

3. Через 18–20 год після останнього введення парацетамолу оцінюють стан печінки.

Контрольні питання

1. Який механізм отруєння парацетамолом?
2. Чим обумовлена гепатотоксичність парацетамолу?

3. Що підвищує ризик отруєння парацетамолом?
4. Які форми ураження печінки виникають при передозуванні лікарськими препаратами?
5. Що є антидотом при отруєнні парацетамолом і яка стратегія лікування спричиненого ним ураження печінки?

Рекомендована література

1. Мельничук Д.О. Методи дослідження функціонального стану печінки та біліарної системи: навчальний посібник для підготовки студентів вищих навчальних закладів / Д. О. Мельничук, В. А. Томчук, П. І. Янчук та ін. – К.: НУБіП України, 2015. – 414 с.

2. Шерлок Ш. Заболевания печени и желчных путей / Ш. Шерлок, Дж. Дули. – М.: Медицина, 1999 – 924 с.

3.4.3 Моделювання медикаментозного ураження печінки під дією тетрацикліну

Антибіотик тетрациклін належить до засобів з прямою ушкоджуючою дією на печінку. Він є інгібітором ферментів – сукцинат-дегідрогенази, цитохромоксидази, лужної фосфатази, аргінази. Тетрациклін знижує рівень аеробного дихання й спряженого з ним окисного фосфорилування, порушує обмін білків, жирів, вуглеводів, пігментів. Одним із ключових моментів ураження печінки під дією тетрацикліну є посилення ПОЛ. При гістологічному дослідженні тканини печінки виявляється мікроевезикулярний стеатоз.

Ураження печінки відбувається переважно при парентеральному введенні тетрацикліну. Найбільша частота тетрациклінових уражень печінки спостерігається у жінок, особливо вагітних.

При моделюванні тетрациклінового ураження печінки для вивчення ефекту гепатопротекторів їх вводять тваринам щоденно за 1 год до тетрацикліну та наступні дві доби після введення антибіотика.

Мета і завдання роботи: отримати модель медикаментозного ураження печінки під дією тетрацикліну в щурів; відповісти на контрольні питання.

Обладнання, матеріали і реактиви: засоби індивідуального захисту (гумові рукавички, халат та ін. відповідно до вимог техніки безпеки), ваги, шприці, зонди, тетрациклін у 1 %-ому крохмальному розчині.

Хід роботи

1. Проводиться зважування тварин (щурів) та розрахунок необхідної для введення кількості тетрацикліну за дози 0,5 г на кг маси тіла тварини;

2. Тетрациклін у 1 %-ому крохмальному клейстері вводять щурам внутрішньошлунково у дозі 0,5 г на кг маси тіла тварини впродовж 5 діб;

3. Через 48 год після останнього введення тетрацикліну оцінюють стан печінки.

Контрольні питання

1. Який механізм отруєння тетрацикліном?
2. Які гепатотоксичні наслідки передозування тетрацикліну?
3. За яких умов підвищується ризик отруєння тетрацикліном?

Рекомендована література

1. Мельничук Д.О. Методи дослідження функціонального стану печінки та біліарної системи: навч. посібник для підготовки студентів вищих навчальних закладів / Д. О. Мельничук, В. А. Томчук, П. І. Янчук та ін. – К.: НУБіП України, 2015. – 414 с.

2. Шерлок Ш. Заболевания печени и желчных путей / Ш. Шерлок, Дж. Дули. – М.: Медицина, 1999 – 924 с.

3.4.4. Моделювання токсичного гепатиту при введенні щурам диклофенаку

Для моделювання токсичного гепатиту використовують білих лабораторних щурів (самців) з середньою масою тіла 200–220 г. У тварин проводять моніторинг зміни маси тіла. Тривалість експерименту становить 14 діб.

Медикаментозну форму токсичного гепатиту (модель) у щурів викликають за методикою, розробленою В. А. Грищенко і співавт.

(2008), що полягає в пероральному застосуванні препарату диклофенаку, який входить до групи нестероїдних протизапальних препаратів (НПЗП), у дозі 12,5 мг/кг маси тіла, 1 раз на добу впродовж двох тижнів.

Гепатотоксичність НПЗП пояснюється багатьма причинами, одна з яких – активація ПОЛ. До цього ефекту призводить зменшення синтезу простагландину E_2 , внаслідок чого опосередковано збільшується утворення вільних радикалів кисню. Зниження в печінці активності каталази (Кат) може бути наслідком дестабілізації мембран гепатоцитів, зокрема цитоплазматичних і пероксисомних, де переважно локалізований фермент, що призводить до виходу його в кров та до зниження активності у печінці. Тому в плазмі крові активність Кат навпаки зростає, що є результатом цитолізу гепатоцитів під впливом гепатотоксинів. Крім того, диклофенак здійснює пряму цитотоксичну дію на печінку, що викликає деструкцію мембран гепатоцитів і цитотоксичну Т-клітинну відповідь, обумовлену властивістю метаболітів препарату утворювати комплекси з білками.

Відтворена з використанням диклофенаку форма токсичного гепатиту в щурів супроводжується стійкими та характерними для цієї патології симптомами: пригніченням загального стану тварин, стабільним зменшенням середньої маси тіла та розладами травлення (збільшення в об'ємі живота, поява болочості, значне напруження стінок живота, розрідження калових мас). Дані патолого-анатомічних і гістоморфологічних досліджень печінки хворих тварин, вказують на характерні для токсичного гепатиту структурно-функціональні порушення у цьому органі. У таких щурів печінка має темно-вишневий колір, в'ялу консистенцію і кровонаповнена, спостерігаються ознаки жирової та білкової дистрофії, дисконплексація печінкових балок і лімфоцитарна інфільтрація міжчасточкової сполучної тканини, що свідчить про розвиток запальної реакції.

При дослідженні біохімічних показників сироватки крові у хворих тварин виявляється вірогідне підвищення активності відносноспецифічних для печінки ферментів: АлАТ, АсАТ, ЛФ та ГГТП при одночасному зменшенні вмісту загального протеїну і тенденції до зниження рівня сечовини й альбуміну (рис. 3.18). Це

підтверджує наявність деструктивних змін гепатоцитів, зниження інтенсивності білоксинтезувальних процесів, розвиток внутрішньопечінкового холестазу. Для хворих тварин характерний розвиток цитолітичного і холестатичного синдромів.



Рис. 3.18. Особливості метаболічної та функціональної активності печінки за токсичного гепатиту на тлі введення натрію диклофенаку (Грищенко В. А., 2017)

Ліпідний (ЛП)-спектр еритроцитарної маси, сироватки крові, печінки та її мембран, вмісту кишечника і калу в хворих на токсичний гепатит щурів характеризується суттєвим зменшенням вмісту загальних ліпідів (ЗЛ), що свідчить про наявні порушення їх обміну в організмі.

Так, в еритроцитарній масі хворих тварин відмічається зниження рівня ЗЛ за рахунок таких фракцій, як фосфоліпіди (ФЛ, на 13,9 %), вільні жирні кислоти (ВЖК, на 66,7 %) поряд із збільшенням вмісту триацилгліцеролів (ТАГ, на 100 %), що вказує на розвиток дисліпідемії, яка є ознакою структурних і метаболічних дефектів в уражених гепатоцитах.

У сироватці крові зокрема відмічається вірогідне зниження рівня ФЛ, ліпопротеїдів дуже низької щільності (ЛПДНЩ), а також зростання вмісту ліпопротеїдів низької щільності (ЛПНЩ). Зазначена закономірність може бути наслідком порушення процесів травлення та всмоктування поживних речовин у кишечнику через його ураження, а також розладів ендогенного синтезу ліпідів і апобілків у результаті структурно-функціональних змін печінки. Зростання рівня холестеролу (ХС) у сироватці крові може вказувати на ризик розвитку атеросклерозу, розлади жовчовидільної функції печінки, що підтверджується підвищенням активності ЛФ у сироватці крові, яке характерне для холестазу.

У гомогенаті печінки спостерігається тенденція до зменшення вмісту ЗЛ, естерифікованого холестеролу (ЕХС), ВЖК і ТАГ, а також виявляється тенденція до зниження рівня ФЛ і ЗХС. При дослідженні ФЛ-складу гомогенату печінки у щурів при токсичному гепатиті виявляється суттєве зменшення вмісту ФЛ фракцій: фосфатидилетаноламіну (ФЕ), фосфатидилхоліну (ФХ), сфінгомієліну (СМ) і фосфатидилсерину (ФС), які домінують у клітинних мембранах. Тому зниження вмісту як ЗЛ, так й індивідуальних фракцій ФЛ при токсичному гепатиті пояснюється структурно-функціональними змінами клітинних мембран ураженої печінки.

Результати дослідження ліпідних фракцій у мікросомальних мембранах гепатоцитів у хворих на токсичний гепатит щурів свідчать про тенденцію до зменшення вмісту ЗЛ та ФЛ на тлі вірогідного зростання рівня ТАГ, ВЖК та ЕХС. У препаратах субмітохондріальних частинах мембран гепатоцитів при відсутності змін умісту ЗЛ відмічається вірогідне підвищення рівня ВЖК, ТАГ та ЕХС. Зростання рівня ВЖК у мембранах можна пов'язати з підвищеною активністю фосфоліпази А₂, яка розщеплює мембранні

ФЛ. Це свідчить про те, що токсичне ураження печінки супроводжується підвищенням інтенсивності ПОЛ у мембранних структурах клітин, що призводить до розвитку мембранопатії. ФЛ-спектр мікросомальної і мітохондріальної мембран гепатоцитів характеризується тенденцією до зниження рівня ФХ, ФЕ і СМ, вірогідним зменшенням вмісту ФС, КЛ, підвищенням – фосфатидилінозиту (ФІ), наявністю лізоформ, які є токсичними для клітин. Подібні закономірності встановлено щодо вмісту ФЛ у гомогенаті печінки. Зазначене вказує на пошкодження структурної організації внутрішньоклітинних мембран гепатоцитів.

За допомогою використання флуоресцентних зондів одержано дані, які підтверджують наявність різнобічних деструктивних змін у мембранних препаратах за умов моделі токсичного гепатиту, а саме: модифікацію поверхневої структури мембран, зміну динамічних властивостей мембранних компонентів (переміщення білкових молекул), їхньої топографії та порушення гідрофобних білок-ліпідних взаємодій, в т. ч. конформаційні зміни білкових молекул і зростання їхньої структурної жорсткості.

ЛП-спектр вмісту кишечнику характеризується зниженням рівня ЗЛ, ФЛ, ЕХС, а також тенденцією до зменшення вмісту ВЖК та зростанням – ТАГ. Дефіцит ЗХС і ЕХС можна пов'язати з порушенням біосинтетичних процесів у печінці й кишечнику та недостатнім всмоктуванням на рівні останнього внаслідок одночасного його ураження під дією надлишкових доз диклофенаку. Зниження рівня ВЖК у вмісті кишечнику, ймовірно, зумовлено посиленням їх використання для забезпечення енергетичних потреб організму при розвитку компенсаторних процесів. Підвищений рівень ТАГ у вмісті кишечнику є наслідком порушення їхнього гідролізу, перетравлення та всмоктування при розвитку гепатопатології, що підтверджується зниженням вмісту ТАГ у сироватці крові. ФЛ-спектр зазнає кількісних змін внаслідок пошкодження внутрішньоклітинних структур гепатоцитів.

При дослідженні ЛП-спектра калу відмічається зростання рівня ЗЛ, ФЛ, ВЖК і ТАГ, а також тенденція до підвищення вмісту ХС та зменшення – ЕХС, що може свідчити про повільне використання ФЛ і ХС у відновленні структури клітинних мембран під

впливом диклофенаку, а збільшений вміст ВЖК і ТАГ підтверджує наявність порушення процесів перетравлення та засвоєння жирів.

Жирнокислотний (ЖК)-склад сироватки крові й гомогенату печінки при токсичному гепатиті характеризується зниженням сумарного вмісту ненасичених ЖК при одночасному підвищенні – насичених. Подібна ситуація відмічається і у паренхімі печінки. Природні гліцерофосфоліпиди містять у центральному положенні залишки ПНЖК, а в крайньому – насичені жирні кислоти (НЖК). Тому зменшення вмісту ПНЖК, які здатні легко окиснюватися в структурі ФЛ за умов розвитку патології, може свідчити про наявність виражених змін їхньої молекулярно-структурної організації. НЖК використовуються для підтримання енергетичного балансу та стабільного рівня метаболізму. Крім того, НЖК входять до складу ТАГ. Виходячи з цього, зростання рівня ТАГ у мембранах гепатоцитів можна пояснити їхнім ресинтезом із НЖК. Отже, виявлені якісні та кількісні зміни ЖК-складу сироватки крові й печінки у тварин при експериментальній гепатопатології можуть свідчити про наявність суттєвих порушень ЖК-обміну в їхньому організмі. Співвідношення сумарної величини ω_6/ω_3 ЖК у хворих тварин підтверджує наявність запального процесу в патогенезі цього захворювання.

Кількісний аналіз ЖК-складу еритроцитарної маси у хворих щурів свідчить про зростання рівня таурохолевої та холевої кислот, сумарних фракцій хенодезоксі- і дезоксихолевої кислот, таурохено- і тауродезоксихолевої кислот, тенденцію до зниження – глікохолевої кислоти і сумарної фракції глікохено- і глікодезоксихолевої кислот. У вмісті порожньої кишки та калі хворих тварин виявляється вірогідне зменшення сумарного вмісту жовчних кислот. Це може свідчити про порушення синтетичної, кон'югуючої, жовчоутворної та жовчовидільної функцій печінки, що супроводжується розвитком внутрішньопечінкового холестазу. Зазначене підтверджується зростанням активності ЛФ у сироватці крові, що, в цілому, доводить недостатнє відновлення процесів декон'югації і всмоктування жовчних кислот у кишечнику, а також порушення їхньої елімінації з печінки.

При дослідженні інтенсивності ПОЛ у сироватці крові хворих щурів відмічається зростання рівня ТБК-активних продуктів, зниження активності Кат і тенденція до зниження – супероксиддисмутази (СОД). При цьому у печінці виявляється зменшення вмісту ТБК-активних продуктів, поряд зі зниженням активності СОД та тенденцією до зниження – Кат. Внаслідок гальмування внутрішньоклітинного синтезу Кат і СОД, інгібується процес знешкодження вільних радикалів, що негативно позначається на мембранних структурах клітин.

При дослідженні активності факторів глутатіонової системи захисту виявлено істотне зменшення у печінці вмісту глутатіону (GSH) та активності глутатіонпероксидази (ГП), у крові відмічається зниження активності ГП і глутатіонтрансферази (ГТ), а також зменшення вмісту GSH. При ураженні печінки накопичуються продукти ліпопероксидації, утворюються активні форми кисню, які активують процеси вільнорадикального окиснення ФЛ клітинних мембран, що призводить до їхнього пошкодження. Зменшення активності ГТ, знижує стійкість організму проти ксенобіотиків. Пригнічення активності ГП і ГР часто відбувається внаслідок порушення синтезу їхніх апоферментів, що провокується деструкцією мембран гепатоцитів. Все це призводить до виснаження потенціалу системи АОЗ.

Поряд із цим, за умов токсичного гепатиту в щурів порушується екскреція кон'югованих фракцій білірубину в складі жовчі у тонкий відділ кишечника, оскільки в крові зростає рівень білірубину диглікуроніду на 94 % на тлі зниження – сумарної фракції білірубину моноглюкуроніду+білірубину моноглюкозиду на 26,7 %. Це підтверджує розвиток у щурів токсичної форми гепатиту, який ускладнюється внутрішньопечінковим холестазом. Результати дослідження аналогічних показників у гомогенаті печінки хворих тварин свідчать про порушення ферментативного перетворення токсичної форми білірубину (некон'югованої) на більш нейтральні фракції (недостатність активності УДФ-глюкуро-нілтрансферази) з одночасним порушенням екскреції останніх у жовчовивідну систему. Зазначене проявляється підвищенням у печінці вмісту некон'югованого білірубину та відповідним зменшенням – сумарної

фракції білірубину моноглюкуроніду+ білірубину моноглюкозиду і білірубину диглюкуроніду. Подальші дослідження рівня білірубину та його похідних у вмісті порожньої кишки хворих щурів показали, що тенденція відносно їхніх кількісних змін є схожою з описаною у печінці.

Дослідження вмісту білірубину та його похідних у калі щурів доповнили картину ознак наявності розладів у пігментному обміні як на рівні печінки, так і кишечника, що проявляється затримкою в організмі більш токсичної фракції білірубину, недостатнім утворенням кон'югатів білірубину з сульфатною кислотою і порушенням ферментативних процесів перетворення білірубінглюкуронідів на кінцеві продукти цього обміну – уробіліну й стеркобіліну при одночасному наростанні рівня кон'югатів з глюкуроною кислотою – білірубину моноглюкуроніду і білірубину диглюкуроніду. Отже, отримані результати свідчать про суттєві розлади у перетворенні білірубину в організмі щурів, хворих на токсичний гепатит.

У результаті токсичного впливу на печінку щурів лінії *Wistar* препарату диклофенак встановлено розвиток хронічного запального процесу, який проявляється реактивним лейкоцитозом із зрушенням ядра нейтрофілів праворуч, моноцитопенією на тлі компенсаторного прояву лімфоцитозу, суттєвим підвищенням рівня ШОЕ і величини тимолової проби (рис. 3.19).

Поряд із цим, у тварин при ураженні печінки диклофенаком встановлено еритроцитопенію, яка є ознакою анемії, хоча вміст у крові гемоглобіну на етапі дослідження зберігається в межах контрольного діапазону. Останнє вказує на компенсаторну реакцію зі сторони червоного кісткового мозку у відповідь на розвиток токсичного ураження печінки. Без змін залишаються реологічні властивості крові, про що свідчить стабільність величини гематокриту в тварин дослідної групи.

Опиана біологічна модель гепатопатології характеризується чітко вираженими клінічними, патолого-анатомічними, гістоморфологічними та біохімічними ознаками токсичного гепатиту.

Мета і завдання роботи: змодельовати в щурів токсичне ураження печінки під дією диклофенаку; відповісти на контрольні питання.



Рис. 3.19. Особливості гематологічних показників щурів за експериментального диклофенак-індукованого ураження печінки (Грищенко В. А., 2017)

Обладнання, матеріали і реактиви: засоби індивідуального захисту (гумові рукавички, халат та ін. відповідно до вимог техніки безпеки), ваги, шприці, зонди, 5 % розчин диклофенаку.

Хід роботи

1. Проводиться зважування тварин (щурів) та розрахунок дози, необхідної для введення відповідної кількості диклофенаку.
2. Диклофенак у 5 %-ому розчині на бідистильованій воді вводять щурам внутрішньошлунково за допомогою зонду в дозі 12,5 мг на кг маси тіла тварини, один раз на добу, впродовж 14 діб.
3. Через 14 діб після введення диклофенаку оцінюють стан печінки.

Контрольні питання

1. Який механізм токсичного впливу диклофенаку на печінку?
2. Які гепатотоксичні наслідки передозування диклофенаку?
3. Які зміни клініко-біохімічного статусу організму щурів відбуваються при отруєнні диклофенаком?

Рекомендована література

1. Грищенко В. А. Гематологічний профіль у щурів при експериментальному диклофенак-індукованому гепатиті / В. А. Грищенко // *Ukrainian Journal of Ecology*. – 2017. – т. 7, № 3. – С. 78–83.
2. Використання ліпосом на основі фосфоліпідів молока у гепатології / [Д. О. Мельничук, В. А. Грищенко, В. А. Томчук та ін.]: за ред. Д. О. Мельничука. – К.: НУБіП України, 2010. – 400 с.
3. Мельничук Д.О. Методи дослідження функціонального стану печінки та біліарної системи: навчальний посібник для підготовки студентів вищих навчальних закладів / Д. О. Мельничук, В. А. Томчук, П. І. Янчук та ін. – К.: НУБіП України, 2015. – 414 с.
4. Моделювання медикаментозного гепатиту в лабораторних щурів: матеріали IV міжнародної наукової конференції студентів та аспірантів [“Молодь і поступ біології”] (Львів, 7–10 квітня 2008 р.) / О. М. Литвиненко, В. А. Грищенко. – Львів, 2008. – С. 432–433.
5. Пат. № 105657 Україна. Спосіб моделювання токсичного гепатиту / Д. О. Мельничук, В. А. Грищенко. А61К31/196, G09B23/28. – № u201510370, заявл.23.10.2015; публ.25.03.2016, Бюл. № 6.
6. Сердюков Я. К. Патолого-анатомічні та гістологічні зміни в печінці щурів за медикаментозного гепатиту / Я. К. Сердюков, О. М. Литвиненко, В. А. Грищенко // *Современные проблемы токсикологии*. – 2008. – № 2. – С. 63–65.
7. Gryshchenko V.A. Biochemical properties of the plasma of rats with the experimentally induced hepatitis after oral administration of sodium diclofenac / V.A. Gryshchenko // *Regulatory Mechanisms in Biosystems*. – 2017. – 8(2). – P. 191–196.

8. Harirforoosh S. Adverse effects of nonsteroidal antiinflammatory drugs: an update of gastrointestinal, cardiovascular and renal complications / S. Harirforoosh, W. Asghar, F. Jamali // Journal of pharmacy & pharmaceutical sciences: a publication of the Canadian Society for Pharmaceutical Sciences, Societe canadienne des sciences pharmaceutiques. – 2013. – 16(5). – P. 821–847.

9. Orinya O. A. Haematological and biochemical studies on the effect of diclofenac sodium on Wistar *Rattus norvegicus* / O. A. Orinya, A. Y. Adenkola, R. J. Ogbe // International Journal of Biological and Chemical Sciences. – 2016. – 10(5), 2231–2242.

10. Ragbetli C. Effects of Diclofenac Sodium on the Rat Liver in Postnatal Period / C. Ragbetli, A. Aydinlioglu, M. Kara [et al.] // Journal of Animal and Veterinary Advances. – 2009. – 8(9). – P. 1761–1764.

11. Schapira D. Diclofenac-induced hepatotoxicity / D. Schapira, L. Bassan, A. M. Nahir [et al.] // Postgraduate medical Journal. – 1986. – 62. – P. 63–65.

12. Syed N. I. Comparing the effects of salts of diclofenac and alminoprofen with aspirin on serum electrolytes, creatinine and urea levels in rabbits / N. I. Syed, F. Zehra, A. A. Syed [et al.] // Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences. – 2012. – 25(4). – P. 777–782.

13. Tomic Z. Diclofenac and ketoprofen liver toxicity in rat / Z. Tomic, B. Miliijasevic, A. Sabo [et al.] // European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics. – 2008. – 33(4). – P. 253–260.

3.4.5. Моделювання гепатопатології при введенні щурам Кадмію

У зв'язку з інтенсивним розвитком промисловості, у довкіллі значно зріс вміст важких металів. Серед металів-токсикантів – Кадмій, Меркурій, Арсен, Плюмбум, що входять до групи особливо небезпечних екотоксикантів. Широке розповсюдження кадмію у складі корисних копалин, нарівні з його використанням у промисловому виробництві, визначає поступове збільшення вмісту цього елемента в довкіллі (повітрі, ґрунті, воді). Антропогенне кадмієве навантаження може індукувати комплекс факторів, які здатні викликати порушення практично на всіх рівнях екосистеми і безпо-

середньо в організмі людини, як її складової частини. Важкі метали впливають на організм, що призводить до виникнення різноманітних патологічних станів, не лише внаслідок гострої інтоксикації, але й за умов надходження до організму у відносно низьких концентраціях.

Існує три основні шляхи надходження кадмію до організму: через шлунково-кишковий тракт (ШКТ) з харчовими продуктами (кормами) і водою, через легені з повітрям та через шкіру. Кадмій, що потрапляє через легені, легше засвоюється організмом на 10–30 %. При надходженні через ШКТ, відсоток засвоювання складає лише 4–7 % (0,2–5 мкг Cd за добу). Середньодобова швидкість виведення кадмію з організму незначна, приблизно 0,001 % від його загального вмісту. Повільне виведення кадмію, переважно з сечею, пояснюється відсутністю спряженого з процесами реабсорбції в проксимальних канальцях специфічного біохімічного механізму виведення металу з організму, що забезпечує формування механізмів нефротоксичності без додаткового його надходження.

У результаті перорального поглинання, кадмій абсорбується в кишці, а далі надходить до печінки з портальним кровотоком та інтенсивно поглинається гепатоцитами.

Обмін кадмію в організмі характеризується наступними особливостями:

- 1) відсутністю ефективного механізму гомеостатичного контролю;
- 2) затриманням (кумуляцією) в організмі з тривалим періодом напіввиведення (у середньому 25 років);
- 3) переважним накопиченням у печінці та нирках;
- 4) інтенсивною взаємодією з іншими двовалентними металами як у процесі всмоктування, так і накопичення.

Встановлено, що Кадмій з'єднується з негативно зарядженими групами мембран і, таким чином, модифікує заряд їх поверхні. Одночасно реєструється суттєве збільшення мікрров'язкості ліпідної фази мембрани без зміни її полярності. Таку ситуацію пов'язують з тим, що Cd^{2+} «зшиває» поряд розташовані негативно заряджені групи ФЛ і, таким чином, обмежує їх рухливість.

Завдяки наявності ненасичених жирних кислот (ЖК), ФЛ клітинних мембран найбільш схильні до реакції окиснення, що ініціюється вільними радикалами, які утворюються в клітині. Активація процесу утворення вільних радикалів призводить до посилення інтенсивності продукування високореакційних вторинних радикалів, що легко дифундують на значні відстані, та активації ПОЛ.

Важливим механізмом пошкодження біологічних мембран є гідроліз ФЛ внаслідок активації фосфоліпаз (особливо фосфоліпази А₂). Результатом дії фосфоліпази А₂ на ліпіди біологічних мембран є вивільнення арахідонової кислоти. Остання, в свою чергу, є субстратом циклооксигенази. Перетворення арахідонової кислоти за участі циклооксигенази призводить до утворення ейкозаноїдів (простагландинів, тромбоксанів, простациклінів) – речовин, що активують розвиток запальних процесів у тканинах. Під впливом іншого ферменту (5-ліпоксигенази) арахідонова кислота перетворюється на лейкотрієни та ейкозатетраєнові кислоти. Вони виступають хеміоатрактантами нейтрофілів – речовинами, які регулюють судинну проникність.

Біологічні наслідки дії важких металів на мембрани:

1) у результаті зростання проникності мембран змінюється швидкість надходження іонів та субстратів до клітини та вихід з неї продуктів метаболізму. Це призводить до порушень обміну речовин у клітині, електричних властивостей мембран;

2) порушується структурна організація та функціональна активність клітини, можлива загибель клітин;

3) утворення ряду активних речовин, які беруть участь у патогенезі токсичного процесу.

Одним з основних механізмів, за допомогою якого більшість важких металів реалізують свою токсичну дію, є активація вільно-радикального окиснення, що супроводжується пошкодженням макромолекул та надмолекулярних комплексів, у т. ч. біологічних мембран. У процеси вільнорадикальних перетворень кисню можуть втягуватися різноманітні біологічно важливі молекули. Утворення продуктів відновлення кисню в живих системах створює

можливість їх взаємодії між собою та іншими молекулами чи іонами, появи токсичних продуктів та запуску патологічних процесів типу ПОЛ.

Процеси ліпопероксидації відіграють важливу роль і в механізмах токсичної дії іонів кадмію. Цей елемент, на відміну від інших важких металів, безпосередньо не генерує в клітинах вільні радикали. Проте, чисельні дані свідчать про генерацію у клітинах супероксидного радикалу, гідроксильного радикалу та NO-радикалів внаслідок непрямой дії Кадмію. Показана генерація кадмієм гідрогену пероксиду, який стає значним джерелом вільних радикалів внаслідок реакції Фентона. Кадмій може замінити ферум та купрум в ряді білків подібних до ферритину, що, у свою чергу, призводить до збільшення концентрації Fe^{2+} та Cu^{2+} .

Дослідження прооксидантного ефекту кадмію на клітинах печінки показало, що механізм його індукції ПОЛ пов'язаний з витісненням іонів, які ініціюють окисний процес, з клітинних структур. Крім того, встановлено, що інтоксикація тварин кадмієм сприяє продукції радикалів кисню в мітохондріях і мікосоммах гепатоцитів, а також призводить до зниження вмісту відновленого глутатіону (ВГЛ) у печінці. Отримані подібні результати також свідчать, що під впливом кадмію продукуються радикали кисню в клітинах. Введення тваринам кадмію хлориду призводить до суттєвої активації ПОЛ у корі великих напівкуль та міокарді, однак при цьому не спостерігається змін в активності антиоксидантних ферментів у вказаних органах.

Проведені дослідження активності ряду ферментів антиоксидантного захисту (АО)-захисту (каталази, Кат; супероксиддис-мутази, Cu,Zn -СОД, Mn -СОД) печінки та нирок після хронічного надходження кадмію з питною водою свідчать про їх чутливість до дії цього елемента. В досліджах *in vitro* показано, що зниження вмісту ТБК-активних продуктів, внаслідок внесення вітаміну Е, не призводить до відновлення активності ферментів системи АО-захисту в умовах дії кадмію. Вважається, що кадмій зв'язується з імідазольною групою His-74 білкової молекули Кат і це призводить до порушення перебігу реакції розпаду гідрогену пероксиду. Кадмій виступає інгібітором активності Mn -залежної СОД

мітохондрій печінки, ймовірно, завдяки заміщенню Mn (II) іонами кадмію. Гостра інтоксикація тварин кадмієм призводить до зростання активності ферментів системи АО-захисту: Cu,Zn-СОД, Кат, глутатіонпероксидази (ГП), глутатіонредуктази (ГР) та глутатіонтрансферази (ГТ). Зокрема, надходження Кадмію до організму тварин викликає значне посилення інтенсивності ПОЛ (підвищується внутрішньоклітинний рівень ТБК-активних продуктів) та пригнічення активності антиоксидантних ферментів (СОД, Кат, ГП, ГР). Активацію вільнорадикального окиснення за дії важких металів пов'язують з виснаженням резерву природних антиоксидантів (аскорбінової кислоти й токоферолу) у клітинах поряд зі зміною активності антиоксидантних ферментів (Кат і СОД).

Відомо, що активні радикали здатні викликати окисну модифікацію не лише ліпідів, але й білків. Найбільш активно піддаються окисним перетворенням триптофан, тирозин, гістидин та цистеїн. Крім того, гідроксильний радикал ($\cdot\text{OH}$), як правило, викликає агрегацію білків, а у комбінації з $\text{O}_2\cdot$ та O_2 – фрагментацію. Фрагментацію білків здатні також викликати радикали ліпідів. Атакування $\cdot\text{OH}$ ароматичних та сірковмісних амінокислотних залишків супроводжується їх незворотними змінами. Окисна модифікація ферментів системи АО-захисту призводить до змін їх активності: $\text{O}_2\cdot$ інгібує активність Кат та ГП; H_2O_2 викликає інактивацію СОД та цитохрому Р-450. Таким чином, вільні агресивні радикали впливають на різноманітні структури-мішені клітин: ліпідні мембрани, вільні амінокислоти, полісахариди, рецепторні молекулярні комплекси, транспортні білки тощо (рис. 3.20).

Підсумком цього є зміна функціонального стану клітини, мутація генетичного коду, що на рівні макроорганізму призводить до мутагенезу та новоутворень у віддалені періоди після дії токсиканта, некрозу, лізису клітин та прискоренню апоптозу. Саме тому значної актуальності при кадмієвій інтоксикації організму тварин набувають препарати з мембранотропними властивостями, що стимулюють розвиток репаративних процесів в ушкоджених структурах клітин.

Мітохондрії – найчутливіші до різних токсичних агентів органели, які піддаються структурним і функціональним змінам,

чим і пояснюється їхнє дослідження при дії кадмію. За цих умов відмічається порушення активності основних ферментів дихального ланцюга мітохондрій ентероцитів тонкої кишки та гепатоцитів: НАД·Н-КоQ-оксидоредуктази, сукцинат-КоQ-оксидоредуктази, КоQ-цитохром с-оксидоредуктази та цитохромоксидази, а також Н⁺-АТФази.

За умов дії кадмію виникають зміни щодо вмісту ліпідів мітохондріальних мембран (особливо ХС), а також до порушення мікрров'язкості анулярних ліпідів і структурної жорсткості білкових молекул. Виявлені конформаційні зміни білкових молекул мітохондріальної мембрани. З іншого боку, функціональні порушення внутрішньої мембрани мітохондрій при дії кадмію пов'язані як з безпосереднім впливом на мембрани, так і з руйнуванням лізосом і виходом лізосомальних ферментів, що призводить до їхньої деградації.

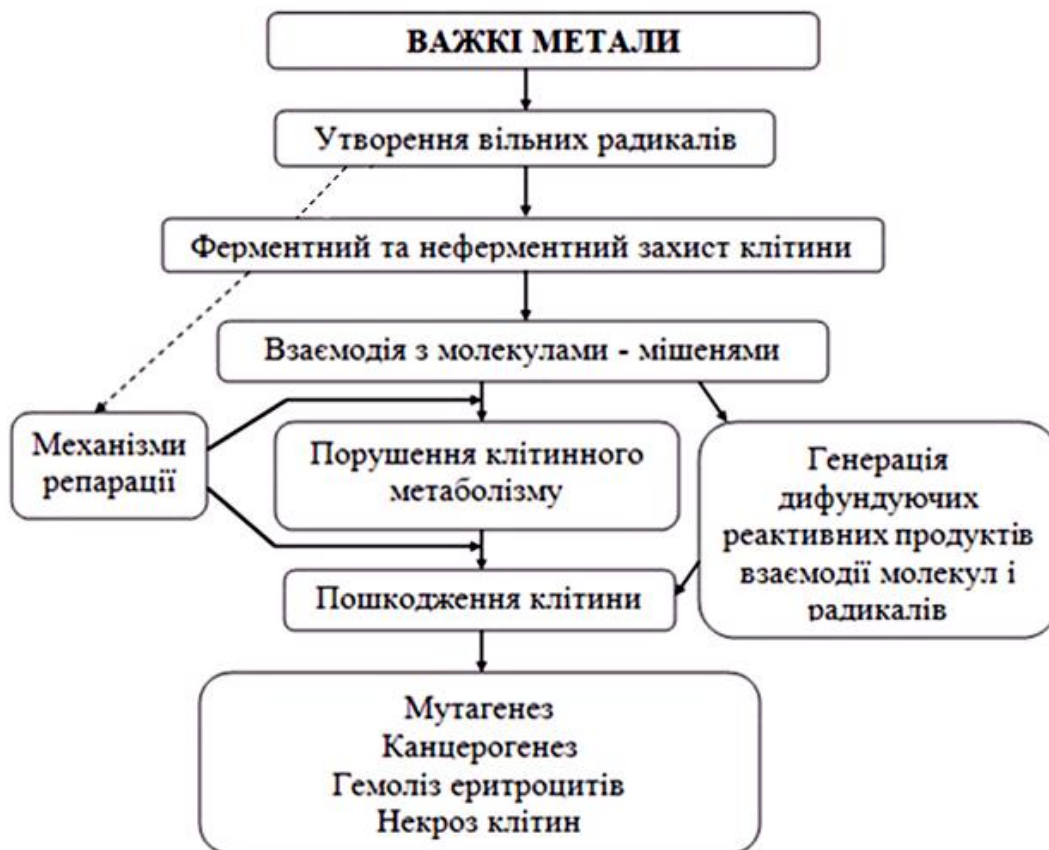


Рис. 3.20. Активація важкими металами вільнорадикальних процесів у клітині та їх наслідки (цит. за Flora S., 2008)

Дослідження проводять на безпородних щурах-самцях масою тіла 180–200 г. Тваринам упродовж 14 діб перорально вводять кадмію хлорид в дозі 1,0 мг/кг маси тіла, що відповідає 1/50 ЛД₅₀. Щурів декапітують після закінчення експерименту.

В результаті відмічається дестабілізація ліпідної компоненти мембран, порушення інтенсивності окисних процесів і функціональної активності мембран ентеро- та гепатоцитів при дії на організм кадмію.

Мета і завдання роботи: отримати модель гепатопатології під дією кадмію на організм щурів; відповісти на контрольні питання.

Обладнання, матеріали і реактиви: засоби індивідуального захисту (гумові рукавички, халат та ін. відповідно до вимог техніки безпеки), ваги, шприці, зонди, 0,1 % розчин кадмію хлориду.

Хід роботи

1. Проводиться зважування тварин (щурів) та розрахунок необхідної для введення дози кадмію хлориду.

2. Кадмію хлорид у 0,1 %-ому розчині на бідистильованій воді вводять щурам внутрішньошлунково у дозі 1,0 мг на 1 кг маси тіла, що відповідає 1/50 ЛД₅₀ (за разового введення), один раз на добу, впродовж чотирнадцяти діб.

3. Через 14 діб після введення кадмію хлориду оцінюють стан печінки.

Контрольні питання

1. Який механізм токсичного впливу Кадмію на організм?
2. Які гепатотоксичні наслідки передозування Кадмію?

Рекомендована і використана література:

1. Використання ліпосом на основі фосфоліпідів молока у гепатології / [Д. О. Мельничук, В. А. Грищенко, В. А. Томчук та ін.]: за ред. Д. О. Мельничука. – К.: НУБіП України, 2010. – 400 с.

2. Грищенко В. А. Структура мембран ентероцитів та гепатоцитів щурів за експериментальної ентеропатології та різних способів корекції / В. А. Грищенко, С. В. Хижняк, О. М. Литвиненко [та ін.] // Ветеринарна медицина. – 2009. – № 1. – С. 30–33.

3. Грищенко В. А. Структурні зміни мембран мітохондрій ентероцитів тонкої кишки за дії кадмію при застосуванні ліпосом / В. А. Грищенко, В. А. Томчук, С. В. Хижняк // Біологія тварин. – 2012. – т. 14, № 1–2. – С. 513–517.

4. Мурзахметова М. К. Влияние интоксикации солями тяжелых металлов и пестицидов на состояние клеточных мембран крыс / М. К. Мурзахметова, В. К. Турмухамбетова // Извест. МОН РК, НАН РК. Серия биология и медицина. – 2002. – № 3. – С. 55–62.

5. Оцінка протеїнсинтезуючої функції печінки за експериментального гепатиту / В. А. Грищенко, В. А. Томчук, О. М. Литвиненко [та ін.] // Укр. біох. журн. – 2011. – т. 83, № 1. – С. 63–68.

6. Структурні характеристики мітохондріальної мембрани гепатоцитів при дії кадмію та їх коригування / В. А. Грищенко, В. А. Томчук, Л. І. Степанова [та ін.] // Современные проблемы токсикологии. – 2012. – № 3–4. – С. 35–38.

7. Flora S. Heavy metal induced oxidative stress & its possible reversal by chelation therapy / S. Flora, M. Mittal, A. Mehta // Indian. J. Med. Res. – 2008. – V. 128. – P. 501–523.

3.4.6. Моделювання гепатопатології при дії на організм іонізуючої радіації

Перспектива опроміненої клітини – загибель чи збереження життєздатності визначається не лише важкістю початкових пошкоджень, які залежать від дози опромінення чи її потужності, а також і від фізичного стану клітини, функціональної активності її ферментних систем, присутності радіопротекторів та інших факторів, які обумовлюють розвиток процесів біологічного посилення чи репарації радіаційних пошкоджень.

Загальноновизнано, що ушкодження біомембран – початковий етап розвитку радіобіологічних ефектів. Морфологічні та функціональні порушення клітинних мембран за дії іонізуючої радіації виявляються фактично відразу після опромінення як у високих, так і у відносно низьких дозах.

Різноманітні зворотні і незворотні структурно-функціональні зміни клітин і тканин базуються на певній послідовності радіаційно-індукованої відповіді мембран, показники якої можуть виступати біоіндикаторами дії іонізуючих випромінювань.

Радіаційно-фізичні та радіаційно-хімічні процеси, які відбуваються у різних клітинних мембранах, близькі за своєю природою – перехід молекул у збуджений стан (утворення вільних радикалів), розрив макромолекул, хімічна модифікація молекул тощо. Кінцевий прояв реакцій мембран на дію іонізуючої радіації залежить від особливостей структури мембран та середовища їх оточення.

Відомо, що дія негативних факторів на тканини в значній мірі базується на взаємодії радикалів, які утворюються внаслідок радіолізу води з біологічно важливими молекулами. Процеси, які супроводжують розвиток окисного стресу, можуть викликати пошкодження значного числа клітинних компонентів. Але найчастіше в якості основного пошкодження клітини називають ПОЛ мембран і пов'язані з ним порушення бар'єрних властивостей та інактивація мембранозв'язаних ензимів. Пошкодження мембран і наступна активація перебігу ПОЛ, збільшення концентрації ліпопероксидів та вільних ненасичених ЖК, які є інгібіторами і роз'єднувачами процесів окиснення і фосфорилювання, визначають опосередковані ефекти дії первинно-індукованих короткоживучих радикалів. Саме ці ефекти відіграють основну роль у розвитку пошкоджуючого ураження клітин, та його віддалених наслідків. У внутрішньоклітинному середовищі та органелах клітин відбувається накопичення продуктів ПОЛ – дієнових кон'югатів і ТБК-активних продуктів.

Вважається, що в кооперативній системі білок-ліпідного матрикса мембран радіаційно-індуковані зміни функціональної активності внутрішньоклітинних органел обумовлені зміною структури мембранних білків і фізичного стану ліпідного бішару.

Радіочутливість клітин пов'язана з особливостями їх метаболізму та прямо пропорційна швидкості метаболічних реакцій. Клітини з високим рівнем обмінних процесів і окисного фосфорилювання більш чутливі до опромінення, ніж клітини, які знаходяться в стані спокою – в стаціонарній фазі.

Для розуміння радіаційних ефектів різних доз все переконливіше постає необхідність у врахуванні системної відповіді клітин на опромінення: поряд із посиленням деструктивних процесів у клітині, наявність в ній систем, які контролюють та забезпечують відновлення пошкоджених структур. Основні принципи системної відповіді клітини на радіаційне ушкодження сформульовані Ю. Б. Кудряшовим (2001) і полягають у наступному:

- опромінення клітини (як і взагалі будь-яких “складних біологічних систем”) активує функції авторегуляції гомеостазу. Значення їх полягає в мобілізації компенсаторних механізмів, які призначені для попередження ушкоджень або активування відновлення ушкоджених структур і порушеної динамічної рівноваги опроміненої системи;

- контроль за надлишком накопичення продуктів ПОЛ у біологічній мембрані виконує складна система захисних ресурсів клітин (водо- і жиророзчинні продукти), яка включає ферментативні та неферментативні «антирадикальні», «гіпоксичні» і «антиоксидантні» механізми, активність яких залежить від величини дози і часу, що минув після опромінення. Зміни співвідношення вмісту в клітині анти- та прооксидантів характеризують рівень енергогенного фону радіорезистентності, а також ступінь пошкодження клітини.

Успіхи кількісної радіобіології, радіаційної біохімії та молекулярної біології, аналіз послідовності фізико-хімічних процесів в опроміненій клітині – все це може слугувати основою загальної теорії, яка розкривала б механізми дії іонізуючих випромінювань на живу клітину, що дозволяє науково обґрунтовано підходити до профілактики та лікування виникаючих при цьому пошкоджень. Такий підхід повинен враховувати складний характер прояву радіобіологічних ефектів, можливість і характер розвитку початкових молекулярних ушкоджень до видимих кінцевих біологічних ефектів та вимагає поетапного вивчення механізмів розвитку репаративних процесів на рівні клітини при застосуванні профілактичних і лікувальних засобів.

Мета і завдання роботи: отримати модель гепатопатології під дією іонізуючої радіації на організм щурів; відповісти на контрольні питання.

Обладнання, матеріали і реактиви: засоби індивідуального захисту (гумові рукавички, халат та ін. відповідно до вимог техніки безпеки), ваги, шприці, зонди, установка РУМ-17 з тубусом за наступних умов: потужність дози 0,17 Гр/хв, фільтри 0,5 мм Cu та 1 мм Al, сила струму 10 мА, напруга 200 кВ, шкіро-фокусна відстань 50 см. Дозу 2 Гр вибрано з урахуванням, що ця доза відноситься до сублетальних, оскільки ЛД_{100/30} для щурів становить 7,78 Гр.

Хід роботи

1. Проводиться тотальне одноразове опромінення тварин (щурів) рентгенівськими променями в дозі 2,0 Гр.

3. Через 1 і 2 доби після одноразового опромінення оцінюють стан печінки.

Контрольні питання

1. Який механізм негативного впливу іонізуючої радіації на організм?

2. Які негативні наслідки для печінки при одноразовому опроміненні щурів на 1 і 2 добу?

Рекомендована література

1. Активність ферментів антиоксидантного захисту за дії іонізуючого випромінювання та фосфоліпідвмісного препарату / С. В. Хижняк, В. А. Грищенко, Л. І. Степанова [та ін.] // Фізика живого. – 2008. – Т. 16, № 2. – С. 65–69.

2. Використання ліпосом на основі фосфоліпідів молока у гепатології / [Д. О. Мельничук, В. А. Грищенко, В. А. Томчук та ін.]: за ред. Д. О. Мельничука. – К.: НУБіП України, 2010. – 400 с.

2. Вплив іонізуючого випромінювання та кадмію на функціональний стан мітохондрій ентероцитів тонкого кишечника / О. О. Кисіль, А. В. Клепко, Н. В. Биць [та ін.] // Вісник КНУ імені Тараса Шевченка. Серія Біологія. – 2003. – Вип. 39–41. – С. 24–26.

3. Дослідження структурного стану апікальної мембрани енте-роцитів тонкої кишки щурів за дії іонізуючої радіації / С. В. Хижняк, Л. І. Степанова, І. І. Ромась [та ін.] // Збірник Інституту ядерних досліджень. – 2005. – № 3. – С. 136–144.

4. Дослідження хронічної дії малих доз іонізуючої радіації та кадмію на різні тканини щурів / А. В. Клепко, С. В. Хижняк, О. О. Кисіль [та ін.] // Проблеми радіаційної медицини та радіобіології: Збірник наукових праць. – 2003. – Вип. 3. – С. 39–45.

5. Зміни структури мітохондріальних мембран печінки щурів за дії іонізуючої радіації / Н. Г. Міронова, В. І. Древаль, Л. В. Січевська [та ін.] // Укр. біохім. журнал. – 1999. – Т. 71, № 4. – С. 95–98.

6. Использование липосомальной формы биологически активной добавки FLP-MD для модификации клеточных мембран гепатоцитов / Д. О. Мельничук, С. В. Хижняк, В. А. Грищенко [та ін.] // Материалы 12-ой Российской Конференции «Гепатология сегодня» (19–21 марта 2007 г. Москва) – С. 124–125.

7. Коломийцева И. К. Радиационная биохимия липидов / И. К. Коломийцева – М. : Наука, 1989. – 181 с.

8. Руднев М. И. Влияние низких доз ионизирующей радиации и других факторов окружающей среды на организм / М. И. Руднев – К. : Наукова думка, 1994. – 236 с.

9. Рыскулова С. Т. Радиационная биология плазматических мембран / С. Т. Рыскулова – М. : Энергоатомиздат, 1986. – 128 с.

10. Эйбус Л. Х. Мембранный механизм биологического действия малых доз / Л. Х. Эйбус. – М.: Изд-во Ин-та теор. и exper. физики, 2001. – 81 с.

11. Активність ферментів електронтранспортного ланцюга мітохондрій енте-роцитів тонкої кишки і гепатоцитів при дії екзогенних чинників та використання ліпосом / В. А. Грищенко, С. В. Хижняк, В. А. Томчук [та ін.] // Сучасні проблеми токсикології. – 2013. – № 1–2. – С. 59–62.

12. Грищенко В. А. Коригування структурного стану клітинних мембран в умовах дії на організм щурів іонізуючої радіації / В. А. Грищенко, С. В. Хижняк // Матеріали VI з'їзду Радіобіоло-

3.4.7. Моделювання імунодефіциту

Усі екзогенні та ендогенні речовини, які впливають на розвиток імунної реакції на будь-якому її етапі, є імуотропними. Залежно від способу дії, вони можуть стимулювати імунну реакцію, посилювати чи послаблювати її кінцевий результат або проміжний етап, а також повністю чи частково пригнічувати імунну відповідь.

Нині з тканини тимуса та з сироватки крові виділено понад 40 різних біологічно активних речовин, які, очевидно, продукуються в основному епітеліальними клітинами залози. Ці речовини частіше всього відносяться до поліпептидів, хоча деякі з них є глікопротеїдними чи навіть стероїдними сполуками. З усіх отриманих речовин тільки 4–8 поліпептидів відповідають критеріям гормонів і саме вони розцінюються як потенційні гормони тимуса. Одним із них є тимічний сироватковий фактор (ТСФ) – справжній гормон залози, що секретується його епітелієм. Цей гормон здатний відновлювати чутливість спленоцитів тимектомованих мишей до антилімфоцитарної сироватки чи азатиоприну. Проте ТСФ лише в присутності Zn^{2+} стає біологічно активним і в такому складі відомий як тимулін – гормон, який циркулює в крові. Цей гормон регулює дозрівання й диференціювання Т-лімфоцитів. Відомо, що ін'єкції деяких імуномодуляторів (тимостимулін, левамизол, спленін) тимектомованим тваринам індукують появу в сироватці крові речовин із тимозиноподібною активністю – РТПА.

Практично всі нозологічні форми захворювань супроводжуються розладами імунної системи та розвитком вторинних імунодефіцитів.

Мета і завдання роботи: отримати модель імунодефіциту на лабораторних мишах; відповісти на контрольні питання.

Обладнання, матеріали і реактиви: засоби індивідуального захисту (гумові рукавички, халат та ін. відповідно до вимог техніки безпеки), ваги, шприці, зонди, циклофосфан (ЦФ, фірма «Orion Corporation Farnos», Фінляндія).

Хід роботи

1. Проводиться зважування тварин (мишей) та розрахунок необхідної для введення дози ЦФ.

2. Циклофосфан вводять мишам (самицям) лінії СВА внутрішньочеревно в дозі 200 мг/кг маси тіла, одноразово.

3. Тварин беруть в експеримент на 3-, 8-, 15- та 30-ту добу після ін'єкції циклофосфану. Мишей зважують, декапітують під етерним наркозом, відбирають проби крові для дослідження імунологічних показників та зважують органи (тимус, селезінку).

4. Визначають абсолютну масу лімфоїдних органів, тимусний і селезінковий індекси (відношення маси органа, мг, до маси тіла, г), підраховують кількість лейкоцитів і виводять лейкограму периферичної крові, визначають абсолютну та відносну кількість лімфоїдних клітин у тимусі та селезінці. Вміст Т-лімфоцитів у периферичній крові тварин визначають методом спонтанного розеткоутворення (Е-РУК), заснованого на наявності рецепторів на поверхні Т-клітин мишей до еритроцитів кроля. У мазках, пофарбованих за Романовським, визначають кількість великих гранулярних лімфоцитів (ВГЛ), які є морфологічним субстратом НК- і К-клітин. Ендокринну функцію тимуса, яку оцінюють за титром ТСФ, визначають за методом Vach і співавт., 1973.

Контрольні питання

1. Який механізм дії циклофосфану на імунну систему організму?

2. Які дослідження необхідно провести для контролю за функціональним станом імунної системи?

Рекомендована і використана література

1. Грищенко В. А. Імуномодулюючі властивості ліпосом на основі фосфоліпідів молока при імунодефіцитному стані організму тварин / В. А. Грищенко, В. А. Томчук // Науковий вісник НУБіП України. – 2013. – Вип. 188, Ч. 4. – С. 107–115.

2. Грищенко В. А. Показники резистентності у телят, перехворілих на диспепсію, та при використанні фосфоліпідів молока / В.

А. Грищенко, М. І. Цвіліховський // Вісник Білоцерківського держ. аграр. ун-ту – 2006. – № 40. – С. 54–63.

3. Грищенко В. А. Порівняльна оцінка клінічної ефективності засобів репаративної дії на основі фосфоліпідів різного походження при експериментальній гастроентеропатології мишей / В. А. Грищенко, Г. Д. Бендюг // Ветеринарна медицина України. – 2007. – № 10. – С. 12–14.

4. Грищенко В. А. Стимулювання ендокринної функції тимуса та індукції синтезу речовин з тимозиноподібною активністю при тимусектомії // В. А. Грищенко // Біоресурси і природокористування. – 2014. – Т. 6, № 1–2. – С. 63–66

5. Карпуть И. М. Механизмы развития вторичных иммунных дефицитов / И. М. Карпуть // Ученые записки Витебской ордена «Знак почета» государственной академии ветеринарной медицины. – 2004. – Т. 40, Ч. 1. – С. 69–70.

6. Пат. 104971 Україна, МКІ А61К 31/683, А61К 31/355, А61К 31/07, А61Р 37/00. Спосіб імуномодуляції при імунодефіцитному стані організму тварин / Мельничук Д. О., Грищенко В. А.; заявник і патентовласник Національний ун-т біоресурсів і природокористування України. – № а201305678; заявл. 30.04.2013; опубл. 25.03.2014, Бюл. № 6. – 6 с.

7. Петрянкин Ф. П. Использование иммуностимуляторов для повышения физиологического статуса молодняка / Ф. П. Петрянкин, О. Ю. Петрова // Ветеринарная патология. – 2008. – № 1. – С. 70–73.

8. Самбуров Н. В. Физиологические и иммунологические аспекты применения иммуномодуляторов / Н. В. Самбуров // Доклады Российской академии сельскохозяйственных наук. – 2006. – № 1. – С. 41–43.

9. Bach J. F. Studies of thymic products. II Demonstration and characterisation of circulating thymic hormones / J. F. Bach, M. Dardenne // Immunology. – 1973. – V. 25, N 3. – P. 353–366.

10. Bafna A. R. Immunostimulatory effect of methanol extract of *Curculigo orchioides* on immunosuppressed mice / A. R. Bafna, S. H. Mishra // J. Ethnopharmacol. – 2006. – Vol. 104, № 8. – P. 1–4.

11. Mebius R. E. Vitamins in control of lymphocyte migration / R. E. Mebius // *Nature Immunology*. – 2007 – № 8. – P. 229–230.

12. Turanek J. Liposomal preparations of muramyl glycopeptides as immunomodulators and adjuvants / J. Turanek, M. Ledvina, A. Kasna [et al.] // *Vaccine*. – 2006. – 12; 24, Suppl. 2:S2. – P. 90–91.

ТЕСТИ КОНТРОЛЮ ЗНАНЬ

Питання 1. Шлункова ахілія - це ...

1. Гастрит;
2. Підвищена кислотність шлункового соку;
3. Відсутність HCl та ензимів у шлунковому соці;
4. Відсутність жовчних пігментів у калі.

Питання 2. Захисна функція слини зумовлена наявністю ензиму, який чинить бактерицидну дію, зумовлюючи лізис полісахаридного комплексу оболонки стафілококів, стрептококів. Який це ензим?

1. Колагеназа;
2. Амілаза;
3. Пептидаза;
4. Лізоцим.

Питання 3. Підвищення в крові вмісту протеїнів α -глобулінової фракції свідчить про ...

1. Патологію печінки;
2. Гострий перебіг патології;
3. Імунодефіцитний стан організму;
4. Хронічний перебіг захворювання.

Питання 4. Плазма крові – це ...

1. Біологічна рідина в якій наявний фібриноген;
2. Біологічна рідина в якій відсутній фібриноген.

Питання 5. Антикоагулянти – це ...

1. Натрію цитрат, натрію хлорид, трилон Б;
2. Трилон Б, натрію оксалат, натрію сульфат;
3. Натрію цитрат, натрію оксалат, трилон Б;
4. Гепарин, натрію оксалат, калію лізинат.

Питання 6. Найчастіше збільшення концентрації креатиніну в сироватці крові відбувається при ...

1. Ураженні печінки;
2. Ураженні серця;
3. Ураженні нирок;
4. Ураженні м'язів.

Питання 7. Який ензим слід визначати для уточнення діагнозу на інфаркт міокарда?

1. Амілазу;
2. Альдолазу;
3. Холінестеразу;
4. Ізоензими ЛДГ.

Питання 8. Підвищення в сечі активності γ -глутамілтранспептидази свідчить про ...

1. Патологію печінки;
2. Інфаркт міокарда;
3. Пневмонію;
4. Патологію нирок.

Питання 9. Органоспецифічним ензимом для нирок є ...

1. Лактатдегідрогеназа;
2. Сукцинатдегідрогеназа;
3. Аспартатамінотрансфераза;
4. Креатинфосфокіназа;
5. Трансамідиназа.

Питання 10. Характерною ознакою інфаркту міокарда є істотне підвищення в крові у першу добу активності:

1. Ліпази;
2. Каталази;
3. Глюкозо-6-фосфатальдолази;
4. α -Амілази;
5. Креатинфосфокінази.

Питання 11. У пацієнта виявили підвищення активності ЛДГ₁, ЛДГ₂, аспартатамінотрансферази, креатинфосфокінази.

Для лізису клітин якого органа підвищення активності вищезгаданих ензимів у сироватці крові є патогномонічною ознакою?

1. Серцевого м'яза (початкова стадія інфаркта міокарда);
2. Скелетних м'язів (дистрофія, атрофія);
3. Нирок та наднирникових залоз;
4. Сполучної тканини;
5. Печінки (гепатит).

Питання 12. Для ішемії міокарда характерне ушкодження кардіоміоцитів унаслідок активації ПОЛ. Підвищення вмісту в міокарді яких речовин стимулює цей процес?

1. Катехоламінів;
2. Каталази;
3. Глутатіонпероксидази;
4. Супероксиддисмутази.

Питання 13. Зростання вмісту якого електроліту в цитоплазмі кардіоміоцитів посилить розвиток патоморфологічних змін у міокарді?

1. Кальцій;
2. Хлор;
3. Калій;
4. Манган.

Питання 14. При атеросклеротичному ураженні судин, вживання якого ліпиду слід обмежити?

1. Лецитину;
2. Олеїнової кислоти;
3. Холестеролу;
4. Моноолеатгліцериду.

Питання 15. Які ліпопротеїни вважаються атерогенними?

1. ЛПДНГ;
2. ХМ;
3. ЛПВГ;

4. ЛПНГ;
5. ХМ і ЛПНГ.

Питання 16. Що слугує мірою метаболічної активності легенів?

1. Ступінь використання кисню;
2. Концентрація АТФ у легеневій тканині;
3. Концентрація жирних кислот у легеневій тканині;
4. Концентрація протеїнів у легеневій тканині.

Питання 17. При гіпоксії у легеневій тканині уповільнюється синтез таких фосфоліпідів:

1. Фосфатидилхоліну та фосфатидилетаноламіну;
2. Фосфатидилсерину та сфінгомієліну;
3. Фосфатидилінозиту та кардіоліпіну;
4. Фосфатидної кислоти;
5. Лізофосфатидилхоліну.

Питання 18. Під час дослідження секреторної функції шлунка методом рН-метрії виявлено гіпохлоргідрію. Зниження активності якого ензиму при цьому спричинює порушення процесу травлення в шлунку?

1. Дипептидази;
2. Гексокінази;
3. Ліпази;
4. Амілази;
5. Пепсину.

Питання 19. У секреті підшлункової залози пацієнта відсутній панкреатичний інгібітор трипсину. Чим небезпечний такий стан?

1. Активацією протеолітичних ензимів ще в підшлунковій залозі;
2. Втратою активності протеолітичних ензимів;
3. “Ухилянням” ензимів у кров;
4. Порушенням процесів травлення у дванадцятипалій кишці;

5. Порушенням перетворення трипсиногену на трипсин у дванадцятипалій кишці.

Питання 20. Причиною стеатореї є дефіцит у травному каналі:

1. Фосфоліпідів;
2. Жирних кислот;
3. Хіломікронів;
4. Триацилгліцеролів;
5. Жовчних кислот.

Питання 21. У пацієнта порушена екскреторна функція печінки. Серед наведених тестів виберіть біохімічний тест, який характеризує цю функцію:

1. Альбумін крові;
2. Холінестераза крові;
3. Аланінамінотрансфераза крові;
4. Аспартатамінотрансфераза крові;
5. Білірубін крові та сечі.

Питання 22. Фруктозомонофосфатальдоза – ензим специфічний для ...

1. Печінки;
2. Серця;
3. Нирок;
4. Кишечнику.

Питання 23. У хворої на жовтяницю тварини встановлено підвищення у плазмі крові вмісту загального білірубіну за рахунок непрямого (вільного) білірубіну, у калі й сечі – високий вміст стеркобіліну, рівень прямого (зв'язаного) білірубіну в плазмі крові в межах норми. Який це вид жовтяниці?

1. Жовтяниця новонароджених;
2. Паренхіматозна;
3. Обтураційна;
4. Гемолітична.

Питання 24. Ахолічний кал – це кал, який ...

1. Містить краплі жиру;
2. Містить рештки неперетравленого корму;
3. Містить багато слизу;
4. Не містить стеркобіліну;
5. Містить домішки крові.

Питання 25. З недостатністю продукування якої речовини пов'язана анемія, яку спостерігають у пацієнтів з хронічною нирковою недостатністю?

1. Еритропоетину;
2. Інсуліну;
3. Адреналіну;
4. Окситоцину.

Питання 26. Яка основна причина азотемії при хронічному гломерулонефриті?

1. Зменшення ниркового кровоплину;
2. Посилена протеїнурія;
3. Зниження канальцевої реабсорбції;
4. Затримка Натрію в організмі;
5. Зниження клубочкової фільтрації.

Питання 27. Яка можлива причина глюкозурії при концентрації глюкози в плазмі крові 4,2 мМ?

1. Ниркова глюкозурія;
2. Цукровий діабет;
3. Нецукровий діабет;
4. Аліментарна гіперглікемія.

Питання 28. При тривалому застосуванні діуретиків може виникнути ...

1. Гіпокаліємія;
2. Гіперкаліємія;
3. Гіперкупремія;
4. Гупокупремія.

Питання 29. Зростання вмісту якого електроліту в цитоплазмі кардіоміоцитів посилює розвиток патоморфологічних змін в міокарді?

1. Кальцію;
2. Хлору;
3. Калію;
4. Мангану;
5. Натрію.

Питання 30. Який тип розладів КОС розвивається при бронхопневмонії?

1. Респіраторний ацидоз;
2. Респіраторний алкалоз;
3. Компенсований ацидоз;
4. Метаболічний ацидоз;
5. Метаболічний алкалоз.

Питання 31. У крові знижений рівень рН та вміст гідрокарбонатів, а підвищений – молочної й піровиноградної кислот у крові та сечі. Який тип порушення КОС спостерігається?

1. Метаболічний ацидоз;
2. Метаболічний алкалоз;
3. Респіраторний ацидоз;
4. Респіраторний алкалоз.

Питання 32. Надлишок Цинку в організмі приводить до ...

1. Ламкості кісток;
2. Деформації скелету;
3. Отруєння;
4. Затримки росту;
5. Проносів.

Питання 33. Які імуноглобуліни забезпечують імунний захист новонароджених?

1. IgA;
2. IgG;

3. IgE;

4. IgD.

Відповіді: 1 – 3; 2 – 4; 3 – 2; 4 – 1; 5 – 3; 6 – 3; 7 – 4; 8 – 4; 9 – 5; 10 – 5; 11 – 1; 12 – 1; 13 – 1; 14 – 3; 15 – 4; 16 – 1; 17 – 1; 18 – 5; 19 – 1; 20 – 5; 21 – 5; 22 – 1; 23 – 4; 24 – 4; 25 – 1; 26 – 5; 27 – 1; 28 – 1; 29 – 1; 30 – 1; 31 – 1; 32 – 4; 33 – 2.

РЕКОМЕНДОВАНА ЛІТЕРАТУРА

1. Аналітичні методи досліджень. Спектроскопічні методи аналізу: теоретичні основи і методики: навч. посібник для підготовки студентів вищих навчальних закладів / Д. О. Мельничук, С. Д. Мельничук, В. М. Войціцький [та ін.]: за ред. Д. О. Мельничука. – К.: ЦП «Компринт», 2016. – 289 с.

2. Аналітичні методи досліджень. Хроматографічні та електрофоретичні методи аналізу: теоретичні основи і методики: навч. посібник для підготовки студентів вищих навчальних закладів / В. М. Войціцький, С. В. Хижняк, В. А. Грищенко [та ін.]. – К.: ЦП «Компринт», 2017. – 268 с.

3. Ангельські С. Клінічна біохімія: підручник / С. Ангельські, З. Якубовські, М. Домінічак. – Сопот, 1998. – 450 с.

4. Біохімічний склад рідин організму та їх клініко-діагностичне значення: за ред. О. Я. Солярова. – К.: Здоров'я, 2004. – 192 с.

5. Ветеринарна клінічна біохімія: підручник / В. І Левченко, В. В. Влізло, І. П. Кондрахін [та ін.]. – Б. Церква : БДАУ, 2002. – 400 с.

6. Ветеринарна клінічна біохімія: посібник / Д. О. Мельничук, В. А. Грищенко, В. А. Томчук [та ін.] : за ред. Д. О. Мельничука. – К. : НУБіП України, 2014. – 456 с.

7. Ветеринарная лабораторная медицина. Интерпретация и диагностика / Д. Мейер, Дж. Харви: (пер. с англ.). – М : Софион, 2007. – 456 с.

8. Використання ліпосом на основі фосфоліпідів молока у гепатології / [Д. О. Мельничук, В. А. Грищенко, В. А. Томчук та ін.]: за ред. Д. О. Мельничука. – К.: НУБіП України, 2010. – 400 с.

9. Горячковский А. М. Справочное пособие по клинической биохимии / А. М. Горячковский. – О.: ОКФА, 1994. – 416 с.

10. Грищенко В. А. Теоретично-прикладні аспекти застосування репаративної терапії на основі фосфоліпідів молока при ентеропатології телят / В. А. Грищенко. – К.: Видавн. центр НАУ, 2008. – 162 с.

11. Дослідження сечі. Методичні рекомендації для студ. ф-ту ветеринарної медицини та слухачів післядипломного навчання спе-

ціалістів ветеринарної медицини / [В. І. Левченко, М. Я. Тишківський, В. В. Сахнюк та ін.]. – Біла Церква, 2005. – 74 с.

12. Експрес-метод прогнозування імунодефіцитного стану організму новонароджених телят: Рекомендації для підприємств України з профілактики імунодефіцитів та системних патологій у новонароджених телят / [Д. О. Мельничук, М. І. Цвіліховський, В. А. Грищенко. – К.: Видавничий центр НАУ, 2001. – 15 с.

13. Клиническая биохимия / А. Я. Цыганенко, В. И. Жуков, В. В. Мясоедов [и др.]. – М.: «Триада-х», 2002. – 497 с.

14. Клінічна біохімія: навч. посіб. для студ. вищ. фармац. навч. закл. і фармац. ф-тів вищ. мед. навч. закл. III–IV рівнів акредитації. / За ред. О. П. Тимошенко. – К. : ВД «Професіо-нал», 2005. – 288 с.

15. Клінічна біохімія: Підручник / Д. П. Бойків, Т. І. Бондарчук, О. Л. Іванків та ін.; за ред. О. Я. Солярова. – К. : Медицина, 2006. – 432 с.

16. Кононський О. І. Біохімія тварин: Підручник / О. І. Кононський. – К.: «Вища школа», 2006. – 454 с.

17. Лабораторна діагностика порушень обміну електролітів і кислотно-лужного стану: методичні вказівки для підготовки фахівців спеціальності «Ветеринарна медицина», ОКР «Магістр» з дисципліни «Клінічна біохімія» / Д. О. Мельничук, В. А. Грищенко, В. А. Томчук та [ін.] – К.: Вид. центр НАУ, 2008. – 17 с.

18. Лифшиц В. М. Биохимические анализы в клинике: справочник / В. М. Лифшиц, В. И. Сидельникова. – М. : МИА, 1998. – 303 с.

19. Маршал В. Дж. Клиническая биохимия / В. Дж. Маршал – Петербург: «Невский диалект», 2000. – 367 с.

20. Мельничук Д. О. Роль кислотно-лужного стану та фосфоліпідів молока у формуванні колострального імунітету в новонароджених телят / Д. О. Мельничук, В. А. Грищенко. – К.: ЦП «Компринт», 2015. – 250 с.

21. Методи дослідження функціонального стану печінки та біліарної системи: навч. посібник для підготовки студентів вищих навчальних закладів: навч. посібник / Д. О. Мельничук, В. А. Томчук, П. І. Янчук [та ін.]: за ред. Д. О. Мельничука. – К. : НУБіП України, 2015. – 414 с.

22. Спеціальна біохімія: навч. посібник / С. Д. Мельничук, Д. О. Мельничук, С. В. Хижняк [та ін.] : за ред. С. Д. Мельничука. – К. : НУБіП України, 2015. – 649 с.

23. Спеціальна біохімія: навч. посібник / С. Д. Мельничук, С. В. Хижняк, В. І. Цвіліховкий [та ін.] : за ред. С. Д. Мельничука. – К. : НУБіП України, 2014. – 374 с.

24. Томчук В. А. Ліпіди та ентеропатологія телят: монографія / В. А. Томчук, В. А. Грищенко. – К.: ЦП «Компринт», 2016. – 508 с.

25. Энциклопедия клинических лабораторных тестов / Перевод с англ. под ред. В. В. Меньшикова. – М. : Лабинформ, 1997. – 960 с.

26. Addition of gut active carbohydrates to colostrum replacer does not improve passive transfer of immunoglobulin G in Holstein dairy calves / M. Villettaz Robichaud, S. M. Godden, D. M. Haines [et al.] // J. of Dairy Science. – 2014. – V. 97, Is. 9. – P. 5700–5708.

27. Effect of feeding colostrum at different volumes and subsequent number of transition milk feeds on the serum immunoglobulin G concentration and health status of dairy calves / M. Conneely, D. P. Berry, J. P. Murphy [et al.] // J. of Dairy Science. – 2014. – V. 97, Is. 11. – P. 6991–7000.

28. Hurley W. L. Perspectives on Immunoglobulins in Colostrum and Milk. / W. L. Hurley, P. K. Theil // Nutrients. – 2011. – V. 3, N. 4, – P. 442–474.

29. Orinya O. A. Haematological and biochemical studies on the effect of diclofenac sodium on Wistar *Rattus norvegicus* / O. A. Orinya, A. Y. Adenkola, R. J. Ogbe. International Journal of Biological and Chemical Sciences. – 2016. – 10(5). – P. 2231–2242.

30. The effect of colostrum source (goat vs. sheep) and timing of the first colostrum feeding (2 h vs. 14 h after birth) on body weight and immune status of artificially reared newborn lambs / L. E. Hernández-Castellano, A. Morales-delaNuez, D. Sánchez-Macías [et al.] // J. of Dairy Science. – 2014. – V. 98, N. 1. – P. 204–210.

31. Veterinary clinical biochemistry: textbook, Part 1 / V. A. Tomchuk, V. A. Gryshchenko, V. I. Tsvilikhovskiyi. – К.: ЦП «Компринт», 2016. – 268 с.

ЧАСТИНА IV

ДОСЛІДЖЕННЯ БІОХІМІЧНИХ ПОКАЗНИКІВ ТА ЇХ КЛІНІКО-БІОХІМІЧНА ІНТЕРПРЕТАЦІЯ

Лабораторна робота 4.1. Визначення активності γ -глутамілтранспептидази в сироватці крові

Принцип методу. γ -Глутамілтранспептидаза каталізує реакцію перенесення L- γ -глутамілового залишку з L, γ -глутаміл-4-нітроаніліда на гліцилгліцин. У цьому разі звільняється 4-нітроанілін, кількість якого пропорційна активності ензиму і визначається фотометрично.

Хід роботи:

Послідовність додавання інгредієнтів наведено у табл. 4.1.

Таблиця 4.1. – Послідовність виконання лабораторної роботи

Інгредієнт	Дослідна проба, см ³	Холоста проба, см ³
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

Вміст пробірок необхідно перемішати. Далі проводять вимірювання оптичної густини дослідної проби відносно холостої при довжині хвилі 405 нм у кюветі з товщиною оптичного шару 10 мм. Величину активності ензиму в сироватці крові визначають за калібрувальним графіком.

Норма: 167–1767 нМ/с·дм³.

Клініко-діагностичне значення. γ -ГТП 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 γ -ГТП сироватки крові.

Лабораторна робота 4.2. Визначення активності аспартат-амінотрансферази в сироватці крові (метод Райтмана-Френкеля)

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

Хід роботи:

Послідовність додавання інгредієнтів (табл. 4.2).

Таблиця 4.2. – Послідовність виконання лабораторної роботи:

Інгредієнт	Дослідна проба, см ³	Холоста проба, см ³
Субстратно-буферний розчин	0,5	0,5
інкубують 5 хв при t +37° C		
Сироватка крові	0,1	0,1
Розчин 2,4-динітрофенілгідразину	-	0,5
інкубують 60 хв при t +37° C		
Розчин 2,4-динітрофенілгідразину	0,5	-
витримують 20 хв при кімнатній температурі		
0,4 н. розчин натрію гідроксиду	5	5

Пробірки із вмістом витримують 10 хв при кімнатній температурі. Вимірюють оптичну густину дослідної проби відносно

холостої. При зеленому світлофільтрі (540 нм) у кюветах з товщиною оптичного шару 10 мм.

Норма: 0,1–0,45 мкмоль/год см³.

Лабораторна робота 4.3. Визначення активності аланін-амінотрансферази у сироватці крові

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

Хід роботи:

Послідовність додавання інгредієнтів наведено в табл. 4.3.

Таблиця 4.3. – Послідовність виконання лабораторної роботи:

Інгредієнт	Дослідна проба, см ³	Холоста проба, см ³
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° С		
Розчин 2,4-динітрофенілгідразину	0,5	–
витримують 20 хв при кімнатній температурі		
0,4 н. розчин натрію гідроксиду	5	5

Вміст пробірок витримують 10 хв при кімнатній температурі. Вимірюють оптичну густину дослідної проби відносно холостої, при зеленому світлофільтрі (540 нм) в кюветах із товщиною оптичного шару 10 мм.

Норма: 0,1–0,68 мкМ/год·см³.

Клініко-діагностичне значення. Підвищення активності амінотрансфераз у сироватці крові відмічається при ряді захворювань, особливо при ураженні органів і тканин, які багаті на ці ензими (серце, печінка, м'язи). Причинами підвищення активності амінотрансфераз можуть бути: інфаркт 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* та *in vitro*).

Лабораторна робота 4.4. Визначення активності креатинфосфокінази в сироватці крові уніфікованим методом

Принцип методу. Активність ензиму пропорційна кількості неорганічного фосфору, який утворюється в результаті кислотного гідролізу синтезованого ензимом креатинфосфату. Неорганічний фосфор визначають за кольоровою реакцією з амонію молібдатом.

Реактиви: креатин; магнію сульфат 7-водний, ч.д.а.; амонію молібдат 4-водний, х.ч., розчин 0,02 М; натрію сульфат безводний, ч.д.а.; натрію метабісульфіт, ч.д.а.; амонію молібдат 4-водний, х.ч., розчин 0,02 М; 1-аміно-2-нафтол-4-сульфо кислота (ейконоген), ч.д.а.; сульфатна кислота, 2,5 М розчин; хлористоводнева кислота, розчин 0,1 М; тріс-(оксиметил)-амінометан (трис), ч.д.а.; тріс-буфер, розчин 0,133 М (рН = 9,0); розчин ейконогену; основна суміш реактивів, що містить 0,02 М магнію сульфат, 0,033 М креатину і 0,0067 М АТФ; трихлороцтова (ТХО) кислота, ч.д.а., розчин 49 М; суміш розчинів для кислотного гідролізу креатинфосфату: 0,25 см³ розчину амонію молібдату, 0,25 см³ розчину сульфатної кислоти і 1,5 см³ води (співвідношення 1:1:6); калію дигідрофосфат безводний, х.ч.

Матеріал для дослідження. Свіжа сироватка або плазма крові. При зберіганні в холодильнику або при кімнатній температурі активність ензиму знижується.

Хід роботи:

Попередньо всі розчини реактивів прогрівають протягом 5 хв при температурі 37 °С.

Дослідна проба: у пробірку вносять 1,5 см³ основної суміші реактивів, 0,1 см³ розчину цистеїну й 0,4 см³ сироватки крові. Вміст пробірки обережно перемішують і ставлять у термостат при 37 °С на 30 хв. Потім додають 0,2 см³ розчину ТХО кислоти, перемішують скляною паличкою і центрифугують при 3000 об/хв протягом 10 хв.

Контрольну пробу виконують так само, як дослідну, але сироватку додають після додавання розчину ТХО кислоти. З дослідної та контрольної проб відбирають по 1 см³ надосадової рідини й переносять у хімічні пробірки (відповідно марковані), в яких міститься по 2 см³ суміші розчинів для проведення специфічного гідролізу креатинфосфату. Одержану суміш розчинів перемішують і залишають при кімнатній температурі на 30 хв (тривалість гідролізу креатинфосфату). Після цього в проби додають з інтервалом в 1 хв по 0,25 см³ розчину ейконогену і точно через 15 хв вимірюють екстинкцію дослідної проби, порівнюючи з контрольною, при $\lambda = 600\text{--}700$ нм (червоний світлофільтр) у кюветі з товщиною шару 0,5 см.

Розрахунок здійснюють за калібрувальним графіком.

Примітка. Якщо активність КФК перевищує 500 нМ/(с·дм³), то тривалість інкубації скорочують до 15 або 10 хв; отримані значення активності помножують відповідно на 2 або 3. Розбавляти сироватку не рекомендується, оскільки активність ензиму при розведенні сироватки змінюється непропорційно.

Норма. До 1000 нМ/(с·дм³).

Клініко-діагностичне значення. *Гіперферментемію* відмічають при інфаркті міокарда, помірне – при м'язовій дистрофії, міозитах, гіпотиреозі. Підвищують активність КФК амфотерицин В, карбеноксолон, карбомал, етанол, сумісне введення галотану й сукцинілхоліну під час наркозу, барбітурати, аденілатциклаза. *Гіпоферментемія* характерна для тиреотоксикозу, вираженій атрофії м'язів. Знижують активність ензиму забруднення окиснювачами, ультрафіолетове опромінення.

Інформативним є визначення ізоензимного спектра: MB, MM, BB. MB-фракція з'являється при інфаркті міокарда, збільшення MM-фракції спостерігають при захворюваннях м'язів, а BB – при захворюваннях ЦНС.

Лабораторна робота 4.5. Визначення активності лактатдегідрогенази в сироватці крові

Принцип методу. L-Лактат під дією ензиму сироватки при наявності НАД⁺ окиснюється до пірувату, який визначають за кольоровою реакцією з 2,4-динітрофенілгідразином (*метод Севела-Товарека*).

Реактиви: лактат, ч.д.а. або х.ч., 80 %-вий розчин; натрію гідроксид, ч.д.а. або х.ч., розчин 4 М; натрію лактат, розчин 0,45 М; натрію пірофосфат $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$, ч.д.а.; хлороводнева кислота, розчин 1 М; натрію пірофосфат, розчин 0,03 М (рН = 8,8); НАД, окиснена форма; розчин 2,4-динітрофенілгідразину; натрію піруват (для побудови калібрувальної кривої).

Хід роботи:

Дослідна проба: 0,1 см³ сироватки, розведеної в співвідношенні 1:2, змішують з 0,3 см³ розчину НАД, прогривають протягом 5 хв при t 37 °С. Потім додають 0,8 см³ розчину натрію пірофосфату 0,03 М та 0,2 см³ розчину натрію лактату 0,45 М, попередньо прогрітих при t 37 °С, і інкубують суміш при t 37 °С протягом 15 хв. Відразу після інкубації додають 0,5 см³ розчину 2,4-динітрофеніл-гідразину, витримують 20 хв при кімнатній температурі. Потім добавляють 5 см³ розчину натрію гідроксиду 0,4 М, перемішують і через 10 хв вимірюють екстинкцію на ФЕК у кюветі з товщиною шару 1 см при $\lambda = 500\text{--}560$ нм (зелений світлофільтр), порівнюючи з контрольною пробою.

Контрольну пробу виконують так само, як дослідну, але сироватку додають після інкубації.

Розрахунок активності здійснюють за калібрувальним графіком.

Норма. 220–1100 нМ/(с·дм³) при 37 °С. Співвідношення фракцій ЛДГ за даними різних авторів становлять: ЛДГ₁ – 19...29 %;

ЛДГ₂ – 23...37 %; ЛДГ₃ – 17...25 %; ЛДГ₄ – 8...17 %; ЛДГ₅ – 8...18 %.

Клініко-біохімічне значення. *Гіперферментемію* викликають анальгетики, клофібрат, дикумарин, етанол, фториди, іміпрамін, метотрексат, наркотичні анальгетики, нітрофурантоїн, хінідин, сульфаніламід та інші гепатотоксичні препарати. Це явище характерно також для інфаркту міокарда, некротичних уражень нирок, гепатиту, панкреатиту, злоякісних новоутворень, лейкозу, гемолітичної анемії, прогресуючої м'язової дистрофії. Підвищення загальної активності ЛДГ при інфаркті міокарда обумовлено підвищенням активності її із форми ЛДГ₁. Недостатність кровообігу у малому колі, тромбоз легеневої артерії викликає підвищення активності легеневої фракції ЛДГ₃. При патології печінки підвищується активність ЛДГ₄ і ЛДГ₅.

Гіпоенземію викликають оксалати й сечовина (сечовинолабільні ізоензими).

Лабораторна робота 4.6. Визначення активності α -амілази в сироватці крові та сечі (метод Каравея)

Принцип методу. α -Амілаза гідролізує крохмаль з утворенням кінцевих продуктів розщеплення, які не дають кольорової реакції з йодом. Активність α -амілази оцінюють за послабленням інтенсивності забарвлення.

Реактиви: бензойна кислота, ч.д.а. або х.ч.; натрію гідрофосфат безводний Na₂HPO₄, ч.д.а.; крохмаль розчинний для нефелометрії або крохмаль за Лінтнером; натрію хлорид, розчин 154 мМ; субстратно-буферний розчин (рН = 7,0); калію йодид, ч.д.а. або х.ч.; калію йодат, ч.д.а. або х.ч.; калію фторид, ч.д.а.; хлористоводнева кислота концентрована, х.ч.; 0,01 н. розчин йоду.

Матеріал для дослідження. Свіжа сироватка або плазма крові, сеча або дуоденальний вміст, попередньо розбавлений розчином натрію хлориду 154 мМ в 100 разів.

Хід роботи:

Мікроваріант. Дослідна проба: 0,5 см³ субстратно-буферного розчину наливають у пробірку, нагрівають протягом 5 хв при

37 °С, додають 0,01 см³ біологічної рідини. Інкують протягом 7,5 хв при 37 °С. Тривалість інкубації слід чітко контролювати за секундоміром з моменту додавання біологічної рідини в крохмальний субстрат, Відразу після інкубації додають 0,5 см³ 0,1 н. розчину йоду і доводять об'єм водою до 5 см³. Вимірюють екстинкцію на ФЕК у кюветі з товщиною шару 1 см при $\lambda = 630\text{--}690$ нм (червоний світлофільтр), порівнюючи з водою.

Контрольну пробу готують так само, як і дослідну. Біологічну рідину додають після інкубації разом з 0,1 н. розчином йоду. Вимірювання здійснюють за тих самих умов, що й дослідної проби, порівнюючи з водою.

Макроваріант. Хід визначення дослідної та контрольної проб такий самий, як і при мікроеваріанті, але об'єми всіх реактивів і досліджуваної рідини збільшують у 5–10 разів.

Розрахунок. Активність α -амілази виражають у міліграмах або грамах крохмалю, гідролізованого 1 дм³ біологічної рідини за 1 с інкубації при 37 °С, і розраховують за формулою:

$$A = E_1 - E_2 / E_1 \cdot C \cdot t \cdot K, \text{ де}$$

A – активність α -амілази, мг/(с · дм³); *E*₁, *E*₂ – екстинкції відповідно контрольної та дослідної проб; *C* – кількість крохмалю, введеного в дослідну і контрольну проби (0,2 мг у мікроеваріанті); *t* – коефіцієнт перерахунку на 1 с інкубації; *K* – коефіцієнт перерахунку на 1 дм³ біологічної рідини з урахуванням розведення.

Клініко-діагностична інтерпретація. α -Амілаза секретується підшлунковою та слинними залозами, невисока її активність спостерігається в печінці та скелетних м'язах. Низька молекулярна маса амілази (≈ 48000 Да) сприяє фільтрації ензиму через ниркові клубочки і виділенню із сечею. Ензим складається з двох фракцій – панкреатичної та слинної. У сироватці крові вищою є активність слинного ізоензиму, а в сечі – панкреатичного. Підвищення активності амілази в сироватці крові та сечі спостерігається при пошкодженні слинних та підшлункової залоз. Швидка та значна гіперамілаземія і гіперамілазурія розвиваються при гострому паротиті та

гострому панкреатиті. Незначне підвищення виявляють при перитоніті, нирковій недостатності, стоматиті, виразках шлунка, хімостазі, дистрофії печінки, гепатиті, жовчнокам'яній хворобі. При патології нирок активність ензиму може зростати у крові, а в сечі – знижується. Підвищення активності спричиняють кортикостероїдні препарати, наркотичні анальгетики, саліцилати, тетрациклін, фуросемід, гістамін, секретин, пероральні контрацептиви, сульфаніламіди.

Гіпоензимемію виявляють при захворюваннях печінки (гепатит, цироз), злоякісних пухлинах, цукровому діабеті, Гіпотиреозі, кахексії, а також її спричиняють оксалати, цитрати, піруват.

Норма.

Сироватка крові: 3,3–8,9 мг/(с·дм³), або 12–32 мг/(год·дм³).

Сеча: до 44 мг/(с·дм³), або до 120 мг/(год·см³).

Дуоденальний вміст: 1,7–4,4 г/(с·дм³), або 6–16 г/(год·см³).

Коефіцієнт перерахунку на одиниці СІ – мг/(с·дм³) – дорівнює 0,278.

Лабораторна робота 4.7. Визначення активності ліпази в сироватці крові уніфікованим методом

Принцип методу. Спектрофотометричне вимірювання зміни каламутності суспензії маслинової олії під дією ліпази. Активність ензиму пропорційна кількості гідролізованої маслинової олії або кількості жирних кислот, що утворюються під час гідролізу.

Реактиви: маслинова олія, $M_{сер} = 880,2$; алюмінію оксид, х. ч. (для очищення маслинової олії); купруму сульфат $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ для отримання абсолютного спирту; етиловий спирт абсолютний; основний розчин маслинової олії, 0,011 М; робоча емульсія маслинової олії, 0,17 мМ; тріс-(оксиметил)-амінометан; натрієва сіль дезоксихолевої кислоти; хлористоводнева кислота концентрована; буфер, що містить тріс 0,025 М і натрієву сіль дезоксихолевої кислоти 0,014 М (рН = 8,8).

Матеріал для дослідження. Сироватка, вільна від гемолізу, або плазма крові. Активність ліпази не змінюється протягом 7 діб при зберіганні сироватки в холодильнику.

Хід роботи:

Перед визначенням сироватку і реактиви прогрівають до температури вимірювання. У кювету наливають 3 см^3 робочої емульсії маслинової олії, додають $0,1 \text{ см}^3$ сироватки, змішують (без струшування) і ставлять у термостат при $37 \text{ }^\circ\text{C}$, через 2 хв вимірюють екстинкцію (E_1), порівнюючи з водою або повітрям, при $\lambda = 340 \text{ нм}$ у кюветі з товщиною шару 1 см. Потім кювету знов поміщають у термостат при тій же самій температурі й через 5 хв вимірюють екстинкцію (E_2), обчислюють E за 1 хв.

Розрахунок. Для розрахунку активності ліпази можна використати контрольну сироватку з відомою активністю ліпази. Активність ліпази в контрольній сироватці визначають так само, як і в дослідній. Розрахунок виконують за формулою:

$$C = E_d \cdot C_k / E_k, \text{ де}$$

C – активність ліпази, МО; E_d – зміна екстинкції дослідної проби за 1 хв ($E_d = E_{1d} - E_{2d}$ за 1 хв); E_k – зміна екстинкції в контрольній сироватці за 1 хв ($E_k = E_{1k} - E_{2k}$ за 1 хв); C_k – активність ліпази в контрольній сироватці, МО.

Розрахунок маслинової олії здійснюють за формулою:

$$C = E_d \cdot 170 \cdot 3 \cdot 1000 / E_k \cdot 1000 \cdot 0,1, \text{ де}$$

C – активність ліпази, $\text{мкМ}/(\text{хв} \cdot \text{дм}^3)$; E_d – зміна екстинкції дослідної проби за 1 хв; 170 – концентрація маслинової олії в робочій емульсії, мкМ , при якій екстинкція дорівнює ≈ 1 ; E_k – екстинкція робочої емульсії маслинової олії (170 мкМ); $3/1000$ – об'єм робочої емульсії маслинової олії, дм^3 ; $1000/0,1$ – коефіцієнт перерахунку на 1 дм^3 сироватки.

Лінійна залежність зберігається до концентрації маслинової олії 204 мкМ . Коефіцієнт перерахунку в $\text{нМ}/(\text{дм}^3 \cdot \text{с})$ становить 16,67.

Клініко-діагностичне значення. Гіперферментемію спостерігають при хронічному та гострому панкреатитах, кісткових переломах, ожирінні, подагрі, після оперативних втручань і поранень.

Гіпоферментемію виявляють при деяких інфекційних захворюваннях, туберкульозі тощо.

Підвищують активність ліпази наркотичні анальгетики, секретин, гепарин; знижують – протамін, важкі метали, хінін, діізопропілфторфосфат, ЕДТА.

Норма. 0–470 нМ/(с·дм³), або 0–28 мкМ/(хв·дм³).

Лабораторна робота 4.8. Визначення активності трансамідази в сироватці крові уніфікованим методом

Принцип методу. Трансамідаза каталізує перенесення амідинової групи з L-аргініну на гліцин з утворенням продуктів реакції L-орнітину та гуанідиноцтової кислоти. Ензим також прискорює реакцію перенесення амідинової групи з L-канаваніну на L-орнітин із перетворенням їх на L-аргінін та L-канавалін.

Утворений L-аргінін визначають на спектрофотометрі або на фотоелектроколориметрі за кольоровою реакцією Сакагучі в модифікації Сакате та Люка при $\lambda = 490\text{--}500$ нм.

Реактиви: фосфатний буфер, розчин 0,14 М (рН = 7,5); буферний розчин канаваніну сульфату, розчин 7,0 мМ; буферний розчин орнітину гідрохлориду, розчин 7,0 мМ; розчин ТХО кислоти; розчин хромогену; розчин N-бромсукциніміду концентрацією 0,1 г на 100 см³; стандартний розчин L-аргініну гідрохлориду.

Матеріал для дослідження. Свіжа сироватка або плазма крові. Перед проведенням аналізу слід приготувати такі реагенти:

1. Досліджуваний матеріал. У чисту суху пробірку вносять 1 см³ фосфатного буфера та 1 см³ сироватки крові або сечі. Вміст пробірки обережно перемішують.

2. Суміш для проведення реакції.

3. Субстратний розчин – суміш буферних розчинів канаваніну й орнітину.

Хід роботи:

У центрифужні пробірки з дослідними пробами відмірюють по 0,7 см³ субстратного розчину (по 0,35 см³ розчинів канаваніну й орнітину). Вміст пробірок преінкубують на водяній бані при 37 °С протягом 5 хв, потім у дослідні та контрольну проби вносять по

0,2 см³ «забуференої» сироватки крові або сечі (0,1 см³ цілісної крові або сечі). Після перемішування проби поміщають у водяну баню при 37 °С, інкубують протягом 1 год. Потім пробірки виймають з бані і в контрольну пробу доливають 0,7 см³ субстратного розчину. Реакцію припиняють додаванням 0,1 см³ розчину ТХО кислоти. Вміст пробірок перемішують. Осад білків відділяють центрифугуванням протягом 10 хв при 3000 об/хв.

З надосадової рідини відбирають 0,5 см³, доводять об'єм водою до 2 см³. При проведенні кольорової реакції до 2 см³ дослідної та контрольної проб додають 2 см³ розчину 8-оксихіноліну і 1 см³ розчину N-бромсукциніміду. Після перемішування пробірки разом зі штативом ставлять у холодильник для ефективнішого розвитку забарвлення.

Через 20 хв вимірюють оптичну густину дослідних проб на спектрофотометрі при $\lambda = 500$ нм або на ФЕК при $\lambda = 490$ нм (зелений світлофільтр) у кюветі з товщиною шару 20 мм (кришку кювети кладуть під її дно). Як розчин для порівняння беруть контрольну пробу.

Активність трансамідази в сироватці крові та в сечі виражають за кількістю L-аргініну (у мМ або мкМ), що утворився за 1 год інкубації дослідної проби при 37 °С, в розрахунку на 1 дм³ сироватки крові або сечі. Отже, для визначення активності ензиму в мкМ/(дм³·с) отримані за калібрувальною кривою значення (мкМ L-аргініну) необхідно помножити на 20000.

Клініко-біохімічне значення. Підвищують активність вітамін D, золото, саліцилати, амфотерицин В, ампіцилін, цепо-рин, гентаміцин, ізоніазид, канаміцин, фурадонін, стрептоміцин, сульфаніламід, рентгеноконтрастні речовини та інші нефротоксичні лікарські препарати.

Норма. У сироватці крові та в сечі активність трансамідази не визначається.

Лабораторна робота 4.9. Визначення вмісту загального протеїну в сироватці (плазмі) крові біуретовим (уніфікованим) методом

Принцип методу. Протеїни сироватки (плазми) крові, реагуючи в лужному середовищі з купруму сульфатом, утворюють сполуки, забарвлені у фіолетовий колір.

Реактиви: натрію хлорид, ч.д.а. або х.ч., ізотонічний розчин 154 мМ; натрію гідроксид, ч.д.а. або х.ч., 0,2 мМ; калію йодид, ч.д.а. або х.ч., розчин калію йодиду 30 мМ в розчині натрію гідроксиду; калію-натрію тартрат 4-х водний (сегнетова сіль), ч.д.а.; купруму сульфат 5-х водний, ч.д.а.

1. Біуретовий реактив: 4,5 г сегнетової солі розчиняють у 40 см³ розчину натрію гідроксиду 0,2 М, додають 1,5 г купруму сульфату та 0,5 г калію йодиду і розчиняють. Доливають до 100 см³ 0,2 М розчин натрію гідроксиду. Реактив стабільний при зберіганні його в посуді з темного скла.

2. Робочий розчин біуретового реактиву: 20 см³ біуретового реактиву змішують з 80 см³ 0,5 %-го розчину калію йодиду. Розчин стабільний.

3. Калібрувальний розчин альбуміну (із сироватки крові людини): 100 г/дм³ розчин альбуміну в розчині натрію хлориду 154 мМ.

Матеріал для дослідження. Сироватка крові.

Хід роботи:

Дослідна проба: до 0,1 см³ сироватки додають 5 см³ робочого розчину біуретового реактиву і перемішують, уникаючи утворення піни. Через 30 хв (і не пізніше ніж через 1 год) вимірюють екстинкцію на фотометрі в кюветі з товщиною шару 1 см при довжині хвилі 500–560 нм (зелений світлофільтр), порівнюючи з контрольною пробою.

Контрольна проба. До 5 см³ робочого біуретового реактиву доливають 0,1 см³ розчину натрію хлориду 154 мМ, далі обробляють як дослідну пробу.

Через 30–60 хв вимірюють екстинкцію на фотометрі, як у досліді, порівняно з контрольною пробою. За одержаними даними визначають вміст протеїну за калібрувальним графіком.

Примітка. Вміст загального протеїну підвищений при венозному стазі, знижений у самок у період лактації і в останні місяці вагітності, під час внутрішньовенних вливань.

Клініко-діагностичне значення: Серед патологічних змін вмісту загального протеїну сироватки крові можуть зустрічатися: *гіпопротеїнемія* – зниження концентрації загального протеїну і *гіперпротеїнемія* – підвищення концентрації загального протеїну. *Гіпопротеїнемія* спостерігається при нефротичному синдромі, ентериті, хронічному панкреатиті, екземах, масивних крововтратах, при затримці води в результаті серцевої декомпенсації, значних втратах протеїну з сечею при нефритах, тривалому перебігу запальних захворювань та кахексії. Знижують результати досліджень: тразинамід, іони амонію, проносні препарати.

Гіперпротеїнемія відмічається рідко, наприклад, при хронічних запальних захворюваннях, які супроводжуються дегідратацією організму (діарея, блювання). Підвищують результати досліджень: амінокислоти (при внутрішньовенному введенні), анаболічні стероїди, андрогени, АКТГ, ацетилсаліцилова кислота, бугамід, імізин, інсулін, кортикотропін, кортикостероїди, прогестерон, рентгеноконтрастні препарати, левоміцетин, стрептоміцину сульфат, сульфаніламід, тетрациклін, бромсульфалеїн.

В патології протеїнів плазми крові прийнято розрізняти такі стани: *диспротеїнемію, дефектопротеїнемію та парап протеїнемію.*

Норма, г/дм³: велика рогата худоба – 72–86; вівці – 65–75; свині – 70–85; коні – 60–80; кури – 43–60. Плазма крові містить на 2–4 г/дм³ протеїну більше за рахунок фібриногену, якого немає в сироватці. Вміст протеїну в новонароджених нижче, ніж у дорослих: новонароджені 46–70 г/дм³.

Лабораторна робота 4.10. Визначення концентрації альбуміну в 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 см³ сироватки або плазми крові ретельно перемішують, уникаючи утворення піни, з 2,0 см³ 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 см³ дистильованої води.

Калібрувальну пробу готують як дослідну, але замість сироватки використовують 0,02 см³ калібрувального розчину альбуміну.

Розрахунок вмісту альбуміну проводять за формулою:

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

C – концентрація альбуміну в сироватці, г/дм³;

A – концентрація альбуміну в калібрувальному розчині (50 г/дм³);

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

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

Клініко-діагностичне значення. **Зниження** рівня альбуміну в плазмі крові спостерігається при голодуванні, запальних захворюваннях, цирозі печінки, злоякісних пухлинах, кровотечах, після видалення шлунка і виходу білка з кров'яного русла: у просвіт кишечника – при завороті кишок, перитоніті, на поверхню опіків – при значних опіках; із сечею – у хворих з нефротичним синдромом. Підвищення рівня альбуміну в плазмі крові практично не зустрічається, проте якщо виявляється, це може бути пов'язано із

зменшенням вмісту води у кров'яному руслі (відносна гіперальбумінемія).

Норма, г/дм³: велика рогата худоба – 38–50; вівці – 40–50; свині – 35–45; коні – 35–50; кури – 31–35.

Лабораторна робота 4.11. Уніфікований метод визначення концентрації сечовини в сироватці крові за кольоровою реакцією з діацетилмонооксимом

Принцип методу. Сечовина утворює з діацетилмонооксимом при наявності тіосемікарбазиду і солей заліза в кислому середовищі забарвлену сполуку. Інтенсивність забарвлення пропорційна концентрації сечовини.

Реактиви: трихлороцтова кислота (ТХО к-та) концентрацією 100 г/дм³; діацетилмонооксим, 25 г/дм³, водний розчин; тіосемікарбазид, 2,5 г/дм³, водний розчин; сульфатна кислота концентрована; ортофосфатна кислота, 85 %-вий розчин; феруму (III) хлорид; бензойна кислота концентрацією 2 г/дм³; стандартний (калібрувальний, еталонний) розчин сечовини концентрацією 7 мМ.

Кольоровий реактив: до 30 см³ робочого розчину феруму (III) хлориду добавляють 20 см³ води, 1 см³ розчину (25 г/дм³) діацетилмонооксиму і 0,25 см³ розчину (2,5 г/дм³) тіосемікарбазиду. Кольоровий реактив готують перед використанням.

Матеріал для дослідження. Цілісна кров, сироватка, плазма крові, сеча (профільтрована з добової кількості, розбавлена 1:50 або 1:100 ізотонічним розчином натрію хлориду).

Хід роботи:

Згідно послідовності процедур, зазначених у табл. 4.4.

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.

Таблиця 4.4. – Послідовність лабораторної роботи:

Інгредієнт	Калібрувальна проба, см ³	Дослідна проба, см ³	Холоста проба, см ³
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

Концентрацію сечовини розраховують за формулою:

$$C = \frac{E_{\text{дос}}}{E_{\text{кал}}} \times 16,65, \text{ де}$$

C – концентрація сечовини, мМ;

*E*_{дос} – оптична густина дослідної проби;

*E*_{кал} – оптична густина калібрувальної проби.

Клініко-діагностичне значення. Підвищується концентрація сечовини в сироватці крові при гломерулонефриті, гломерулосклерозі, хронічному порушенні функції нирок, хронічній непрохідності сечових шляхів, при посиленому розпаді протеїнів (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 згодовуванні надмірної кількості протеїну та гарячкових станах. Зменшується вміст сечовини в сечі при нирковій недостатності і при лікуванні анаболічними гормонами.

Підвищують вміст сечовини в крові амфотерицин В, гентаміцин, тераміцин, допегіт, альдомет, метилдофа, індометацин, індоцид, метицилін, налідоксонова кислота, невіграмон, неграм, неоміцин,

сполуки арсену, октадин, санотензин, ісмелін, сполуки ртуті і стибію, тетрацикліни, триамтерен, фурадонін, нітрофурантоїн, фуросемід, лазикс, цепорин. Хімічну інтерференцію дають хлоралгідрат, хлорамфенікол, солі амонію, хлоробутанол, гуанетидин.

Знижують вміст СТГ, глюкоза, похідні тіазиду.

Норма, мМ: 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 – 1,67–3,33.

Лабораторна робота 4.12. Визначення концентрації креатиніну в біологічних рідинах

Принцип методу. Креатинін реагує з пікриновою кислотою в лужному середовищі з утворенням забарвлених сполук.

Реактиви: пікринова кислота, насичений розчин; хлористоводнева кислота, розчин 0,1 М; основний стандартний розчин креатиніну концентрацією 10 мМ; натрію гідроксид, розчин 2,5 М.

Матеріал для дослідження. Сироватка крові, сеча. Як консерванти для сечі можна використовувати тимол і толуол.

А. Визначення вмісту креатиніну в сироватці крові за кольоровою реакцією Яффе (метод Поппера)

Хід роботи:

Визначення креатиніну в сироватці крові: 2 см³ сироватки змішують з 6 см³ насиченого розчину пікринової кислоти. Через 5 хв пробірку кип'ятять 15–20 с у водяній бані, потім центрифугують. До 4 см³ центрифугату додають 0,2 см³ розчину натрію гідроксиду 2,5 мМ і ретельно перемішують. Іноді після підлужнення розчин мутніє внаслідок випадання фосфатів. У цьому випадку розчин ще раз центрифугують. Потім розчин доводять до об'єму 10 см³ водою. Через 10 хв (і не пізніше ніж через 20 хв) вимірюють екстинкцію в кюветі з товщиною шару 1 см при довжині хвилі 500–560 нм (зелений світлофільтр), порівнюючи з контрольною пробою.

Контрольна проба: 3 см³ насиченого розчину пікринової кислоти і 0,2 см³ розчину натрію гідроксиду 2,5 мМ доводять до об'єму 10 см³ водою.

Розрахунок проводять за калібрувальним графіком.

Норма креатиніну в сироватці крові, мкМ: 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.

Б. Визначення вмісту креатиніну в сечі

Хід роботи:

У мірній колбі або циліндрі місткістю 10 см³ змішують 0,5 см³ сечі (з добової кількості) із 3 см³ розчину пікринової кислоти. Суміш ретельно струшують і додають 0,2 см³ розчину натрію гідроксиду 2,5 М. Витримують при кімнатній температурі протягом 10 хв. Доводять об'єм до 100 см³ водою. Вимірюють екстинкцію на фотометрі в кюветі з товщиною шару 1 см при довжині хвилі 500–600 нм (зелений світлофільтр) проти холостої проби.

Холоста проба: 3 см³ розчину пікринової кислоти і 0,2 см³ розчину натрію гідроксиду 2,5 М доводять до об'єму 100 см³ водою.

Розрахунок проводять за формулою при порівнянні з калібрувальною пробою.

Калібрувальна проба: до 0,5 см³ основного калібрувального розчину додають 3 см³ розчину пікринової кислоти і 0,2 см³ розчину натрію гідроксиду (2,5 М). Надалі проби обробляють так само, як дослідні.

$$K = C_k \cdot E_d \cdot a / E_k \cdot b, \text{ де}$$

K – кількість креатиніну в добовій сечі, мкМ; *C_k* – кількість креатиніну в калібрувальній пробі, 50 мкМ; *E_я* – екстинкція дослідної проби; *E_к* – екстинкція калібрувальної проби; *a* – добова кількість сечі; *b* – кількість сечі, взятої для аналізу.

Клініко-діагностичне значення. Підвищення концентрації креатиніну у сироватці крові при гломерулонефриті, гломерулосклерозі, хронічній нирковій недостатності, закупорці сечових шляхів, кишковій непрохідності, діабеті, механічній жовтяниці, гіпофункції наднирників, голодуванні, м'язовій атрофії, зіпертиреозі. Зменшення концентрації креатиніну у сироватці крові може мати місце при застосуванні АКТГ.

Збільшення вмісту креатиніну у сечі відмічається при посиленій м'язовій роботі, гарячкових станах та функціональній недостатності печінки. Зниження креатиніну у сечі спостерігається при м'язовій атрофії, голодуванні, амілоїдозі нирок, лейкозі та уремії.

Вплив лікарських препаратів. Підвищення рівня креатиніну в сечі викликають кортикостероїди; аскорбінова кислота, метилдофа, нітрофурани, леводопа, глюкоза, фруктоза, фенолсульфоталеїн. Знижують вміст креатиніну в сечі андрогени, анаболічні гормони, тіазидні діуретики.

Норма. Концентрація креатиніну в сечі клінічно здорових високопродуктивних глибокотільних корів становить 5,5–14,0 мМ (в середньому $10,8 \pm 1,5$ мМ), у дійних – 9,2–13,7 мМ ($11,4 \pm 0,6$ мМ).

При нефротичному синдромі вміст креатиніну в сечі зменшується у 87,5–95 % корів, у глибокотільних – до $7,4 \pm 0,9$; дійних – до $4,4 \pm 0,5$ мМ. У корів з ознаками гепаторенального синдрому концентрація креатиніну в сечі становить 5,0–6,0 мМ. Відношення між вміст креатиніну в сечі і крові – *концентраційний індекс (КІ) креатиніну* – характеризує концентраційну функцію нирок:

$$КІ = \text{креатинін у сечі (мМ)} : \text{креатинін у крові (мМ)}.$$

У людей концентраційний індекс перевищує 60. Величина його у сухостійних корів, хворих на жирову гепатодистрофію, зменшується до $27,6 \pm 3,0$ ($13,6 \pm 45,4$) проти $66,2 \pm 9,9$ ($36,0-90,0$) – у клінічно здорових. У дійних корів цей показник ще менший і становить $23,4 \pm 2,0$ ($6,4-48,7$) проти $72,7 \pm 5,9$ ($51,0 \pm 99,7$) – у клінічно здорових. Про порушення концентраційної функції нирок

при нефротичному синдромі свідчить вірогідне зниження концентраційного *індексу креатиніну (КІ)* майже вдвічі у сухостій-них корів і в 3 рази – у корів у період ранньої лактації порівняно з клінічно здоровими. У телят, хворих на колібактеріоз, клубочкова фільтрація в нирках у період розпалу зазнає значних змін, про що свідчить зниження КІ до $25,8 \pm 5,6$ порівняно з $58,4 \pm 14,4$ – у клінічно здорових (Вовкотруб Н. В., 2005).

Лабораторна робота 4.13. Визначення вмісту протеїну в сечі

4.13.1. ЯКІСНІ РЕАКЦІЇ НА ПРОТЕЇН У СЕЧІ

Усі реакції на наявність протеїну в сечі ґрунтуються на осадженні його з розчину, в результаті чого утворюється помутніння рідини. Сечу перед дослідженнями необхідно профільтрувати (інколи двічі) через паперовий фільтр. Сеча повинна бути свіжою і прозорою. Якщо реакція сечі лужна, то її обов'язково перед проведенням дослідження необхідно підкислити додаванням декількох крапель 10 %-ного розчину оцтової кислоти. При дослідженні лужної сечі в осад випадають фосфати.

У клінічній практиці найбільш поширене визначення протеїну в сечі пробами: кип'ятінням, з азотною і сульфосаліциловою кислотами, а останнім часом універсальними індикаторними смужками.

Проба кип'ятінням

У пробірку наливають 3–5 см³ попередньо підкисленої (кількома краплями 10 %-ного розчину оцтової кислоти) до слабокислої реакції прозорої сечі і нагрівають до кипіння (для точності результату ставлять 2–3 спарені проби). За наявності протеїну, він звертається і випадає в осад. Залежно від кількості протеїну в сечі у пробірці утворюється легка опалесценція рідини, помутніння, випадання пластівців, утворення згустку.

При відсутності помутніння не можна одразу робити висновок про негативну реакцію на протеїн у сечі, оскільки при значному підкисленні сечі він не випадає в осад при кип'ятінні. Для контро-

лю необхідно до гарячої прозорої сечі додати рівний об'єм насиченого розчину натрію хлориду. За наявності протеїну в пробірці одразу утворюється характерне помутніння.

Чутливість проби становить $0,001 \text{ г/дм}^3$ або $0,001 \%$ (pro mille – кількість грамів протеїну на 1000 см^3 сечі).



Проба з нітратною кислотою

На дно пробірки піпеткою вносять $1\text{--}2 \text{ см}^3$ 5% -ного розчину нітратної кислоти, приготовленого на $20\text{--}30 \%$ -ному розчині натрію хлориду. Чистою піпеткою обережно нашаровують на кислоту $1\text{--}2 \text{ см}^3$ підкисленої та профільтрованої сечі. За наявності протеїну, на межі двох рідин утворюється біле кільце. Якщо протеїну $0,033 \text{ г/дм}^3$, то кільце утворюється через $2,5\text{--}3$ хв.

Чутливість проби $0,033 \text{ г/дм}^3$ ($0,033 \%$). За відсутності протеїну в сечі та правильному нашаруванні на кислоту сечі на межі двох рідин утворюється темне кольорове кільце.

Проба з сульфосаліциловою кислотою

У пробірку наливають $2\text{--}3 \text{ см}^3$ підкисленої та профільтрованої сечі та додають по краплях 20% -ний розчин сульфосаліцилової кислоти (розчин кислоти зберігається в темноті). За наявності протеїну в сечі кожна крапля кислоти, що опускається на дно пробірки, утворює помутніння. При незначному струшуванні вся

рідина в пробірці мутніє. Під впливом сульфосаліцилової кислоти в осад випадають не лише протеїни, але й альбумози. При підігріванні альбумози розчиняються, а протеїновий осад залишається нерозчинним.

Чутливість проби становить $0,015 \text{ г/дм}^3$ ($0,015 \%$).

Проба з калій заліzosинєродистим

У пробірку наливають 10 см^3 підкисленої сечі і обережно додають по краплі 5% -ний розчин калію заліzosинєродистого. За наявності у сечі протеїну, від кожної краплі розчину утворюється виражений осад у вигляді пластівців.

4.13.2. КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ ПРОТЕЇНУ В СЕЧІ

Кількісне визначення протеїну в сечі проводять лише після позитивних результатів якісних проб.

Визначення протеїну в сечі з 3% -ою сульфосаліциловою кислотою

Принцип методу. Інтенсивність помутніння при осадженні протеїну сульфосаліциловою кислотою пропорційна його концентрації.

Обладнання. Фотоелектроколориметр (КФК-2, КФК-3), пробірки, піпетки на 1 і 2 см^3 .

Реактиви: 3% -й розчин сульфосаліцилової кислоти; стандартний розчин альбуміну (5 мг/см^3).

Хід роботи:

У пробірку вносять $0,5 \text{ см}^3$ профільтрованої сечі, додають $1,5 \text{ см}^3$ розчину сульфосаліцилової кислоти, перемішують. Через 5 хв вимірюють екстинцію проби при довжині хвилі $590\text{--}650 \text{ нм}$ (оранжевий чи червоний світлофільтр) проти контролю у кюветі з товщиною робочого шару 5 мм . Контроль готують аналогічно, але замість розчину сульфосаліцилової кислоти використовують ізотонічний розчин NaCl .

Розрахунок умісту протеїну проводять за калібрувальним графіком, для побудови якого з концентрованого розчину альбуміну (5 мг/см^3) готують наступні розведення (табл. 4.5).

Таблиця 4.5. – Розведення розчину альбуміну

№ з/п	Альбумін (5 мг/см ³)	Ізотонічний розчин NaCl	Кінцева концентрація протеїну, мг/см ³
1	0,05	4,95	0,05
2	0,1	4,9	0,1
3	0,2	4,8	0,2
4	0,5	4,5	0,5
5	1,0	4,0	1,0

Кожний з одержаних розчинів обробляють як і дослідні (0,5 см³ розчину альбуміну + 1,5 см³ розчину сульфосаліцилової кислоти). Вимірюють екстинцію і будують калібрувальний графік залежності екстинції від концентрації протеїну.

Лінійна залежність зберігається до 1 мг/см³. За більшої концентрації протеїну в сечі пробу необхідно розвести і провести повторне визначення, врахувавши кратність розведення сечі (див. табл. 4.5).

Метод з нітратною кислотою (Робертса-Стольникова)

Принцип методу ґрунтується на тому, що при пробі з нітратною кислотою біле кільце на межі її з сечею з'являється між 2,5 і 3-ма хв за наявності 0,033 г/дм³ протеїну. Якщо кільце утворюється раніше, то протеїну в такій сечі більше 0,033 г/дм³, і тому сечу розбавляють до тих пір, поки кільце не буде утворюватись у зазначений термін (між 2,5 і 3-хв інтервалом).

Хід роботи:

Спочатку виконують пробу з нітратною кислотою і нативною сечею. Якщо вміст протеїну в сечі перевищує 0,033 г/дм³, то біле кільце на межі двох рідин утворюється відразу. Тоді сечу необхідно розвести дистильованою водою у 2 рази, 4, 8, 10, 20, 30, 50, 100 і 200 разів і т. д., і з кожним розведенням виконати пробу з нітратною кислотою. В тому розведенні, в якому кільце з'явиться між 2,5 і 3-ма хв, вміст протеїну становить 0,033 г/дм³. Множенням

0,033 г/дм³ на кратність розведення сечі знаходять вміст протеїну в нативній сечі, який виражають кількістю грамів протеїну на 1 дм³ сечі. Наприклад, кільце з'явилося в термін між 2,5 і 3-ма хв у пробірці з розведенням сечі у 200 разів. Отже, $0,033 \text{ г/дм}^3 \times 200 = 6,6 \text{ г/дм}^3$ сечі.

Експрес-метод визначення протеїну в сечі діагностичними смужками

Проводиться за допомогою діагностичних смужок типу «Біоскан» (Росія), АльбуФАН, Penta-Phan (Ла-Хема, Чехія). Метод ґрунтується на зміні кольору кислотно-основного індикатора під впливом протеїнів. Діагностичну смужку необхідно занурити в свіжу сечу і не пізніше 1 хв порівняти її забарвлення з відповідною кольоровою шкалою на тубусі. Результат виражається в г протеїну на 1 дм³ сечі.

Клініко-діагностичне значення протеїнурії

Норма. Не виявляється.

Протеїнурія буває преренальною (переднирковою), ренальною (нирковою) і постренальною (післянирковою).

Передниркова (преренальна) протеїнурія зумовлюється появою в плазмі крові підвищеної кількості протеїнів, які фільтруються до каналців у кількості, що перевищує їхню реабсорбційну ємність. До такої патології належать гемоглобінурія (при гемолітичних синдромах) та міоглобінурія (внаслідок пошкоджень м'язів). Тривала преренальна протеїнурія спричинює пошкодження клубочків і розвиток нефротичного синдрому із значною втратою протеїну.

Ниркова (ренальна) протеїнурія буває функціонального або органічного походження, а залежно від місця ураження – клубочковою або каналцевою. *Функціональна* ниркова протеїнурія спостерігається в новонароджених тварин протягом перших 10-ти днів життя та в корів перед отеленням, характеризується короткочасним перебігом і не супроводжується клінічними симптомами. Функціональна протеїнурія може розвиватися при серцевій недостатності, гарячці та гіпертонії. *Органічна ниркова* протеїнурія виникає внаслідок структурних змін у нирках і спричинюється підвищеною

проникністю ниркових клубочків (*клубочкова*) або пошкодженням каналців (*каналцева протеїнурія*).

Клубочкова протеїнурія зустрічається найчастіше і зумовлюється багатьма хворобами різної етіології. Характер протеїнурії залежить від пошкодження клубочків: при незначних пошкодженнях виділяється протеїн з малою молекулярною масою (альбумін і трансферин). Прогресування хвороби призводить до зростання протеїнурії внаслідок підвищення проникності клубочків, через які починають проходити протеїни з більшою молекулярною масою. При гострому гломерулонефриті в сечі виявляють від 0,1 до 1,5 % протеїну.

Канальцева протеїнурія спричинюється порушенням реабсорбції протеїнів у каналцях і характеризується зростаючим виділенням із сечею протеїнів з малою молекулярною масою, які вільно проходять через стінку клубочків (β_2 -макроглобулін, лізоцим, α_1 -мікроглобулін та ряд інших протеїнів). При нефротичному синдромі протеїнурія становить 1–5 %. Більш висока протеїнурія, порівняно з гломерулонефритом, пояснюється двома причинами: а) більшою кількістю крові, що фільтрується у клубочках при нефрозі, ніж при гломерулонефриті; б) при ураженні каналців підвищується реабсорбція води, внаслідок чого концентрація протеїну в сечі зростає. Канальцева протеїнурія часто поєднується із клубочковою.

При нефросклерозі протеїнурія є незначною (0,1–0,2 %). Це пояснюється прогресуючим зменшенням кількості функціонуючих клубочків і зниженням внаслідок цього фільтрації протеїну.

Післяниркова протеїнурія розвивається при захворюваннях сечового міхура, уретри та уролітіазі. Кількість протеїну в сечі при цьому не перевищує 1 г/дм³.

Ниркова протеїнурія від післяниркової відрізняється більшим умістом протеїну в сечі (при післянирковій він рідко перевищує 1 г/дм³), наявністю в осаді сечі циліндрів та іншими симптомами ураження нирок. Трапляються випадки одночасного ураження нирок і сечовивідних шляхів. Така протеїнурія називається *змішаною*.

Протеїнурія також діагностується при захворюванні статевих органів: у самок – при запаленнях матки і піхви, у самців – при

запаленні передміхурової залози. Якщо протеїн до сечі домішується зі статевих органів, то протеїнурія є *несправжньою*.

Лабораторна робота 4.14. Визначення вмісту гемоглобіну в сечі гемоглобінціанідним методом

Принцип методу. Гемоглобін при взаємодії з калієм залізо-синеродистим (червона кров'яна сіль) окиснюється у метгемоглобін, що утворює з ацетонціангідрином кольоровий гемоглобінціанід, інтенсивність забарвлення якого пропорційна концентрації гемоглобіну.

Обладнання: фотоелектроколориметр, піпетки мірні на 0,02 і 5 см³; пробірки; колби мірні на 250 см³ та 1 дм³.

Реактиви: ацетонціангідрин (2 ампули по 0,5 см³ – 0,47 г); суміш реактивів (2 флакони по 1,2 г), у т. ч. калій залізо-синеродистий – 0,2 г, нагрій двовуглекислий – 1,0 г; стандартний розчин гемоглобінціаніду (зберігається у холодильнику при t + 4 °С).

Хід роботи:

До 5 см³ робочого розчину в пробірку додають 0,02 см³ 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 см³ або г/дм³):

$$Hb_{г/100\text{ см}^3} = E_{дп} / E_{ст} \times 59,75 \times 251 \times 0,001,$$

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 см³ у г/100 см³.

Діагностичне значення визначення пігментів крові

Гематурія буває *справжньою*, якщо вона виникає в результаті ураження органів сечової системи, і *несправжньою*, коли є наслід-

ком домішування крові із статевих органів. Справжня гематурія буває **нирковою, позанирковою** та **змішаною**.

Ниркова гематурія спостерігається при гострому гломеруло-нефриті, загостренні хронічного перебігу гломерулонефриту, при сибірці, чумі свиней, тяжкому перебігу С- і К-гіповітамінозів, деяких інтоксикаціях, при застійній нирці у хворих із недостатністю серця, злоякісній пухлині і травмах нирок.

Позаниркова гематурія виникає при запаленні та травмах сечовивідних шляхів і сечового міхура, сечокам'яній хворобі, злоякісних пухлинах сечового міхура, хронічній гематурії великої рогатої худоби, яка є, по суті, хронічним запаленням сечового міхура. Це захворювання характеризується кровотечею в порожнину міхура з ерозій, виразок або папіломатозних утворень на його слизовій оболонці.

Кров у сечі є давно відомим симптомом. Ще Гіппократ стверджував, що цей симптом є свідченням ураження нирок або сечового міхура. У зв'язку з цим виникає необхідність диференціації причин гематурії.

Ниркову та **позаниркову гематурію** диференціюють, передусім, так званою «пробою трьох склянок». При кровотечі з уретри кров виявляють лише на початку сечовиділення (перша посудина), при ураженні сечового міхура – у кінці його (третя посудина), а при ураженні нирок – у всіх трьох посудинах. Крім того, безсумнівним доказом ниркового походження гематурії є наявність в осаді сечі еритроцитарних циліндрів, які є зліпками канальців. Звертають також увагу на співвідношення кількості еритроцитів і протеїну в сечі. Якщо еритроцитів у сечі міститься мало (10–20 в полі зору), а протеїну – понад 1 г/дм³, то гематурія є нирковою. І навпаки, значна кількість еритроцитів у сечі (50–100 і більше в полі зору) в поєднанні із відсутністю еритроцитарних циліндрів і вмістом протеїну менше 1 г/дм³ є показником позаниркової гематурії.

Виділення з сечею гемоглобіну називають **гемоглобінурією**. Вона буває: первинною і вторинною. Первинна гемоглобінурія є наслідком масового гемолізу еритроцитів у кров'яному руслі, коли гемоглобін, що звільняється, не встигає повністю перетворитися в білірубін. Вторинна гемоглобінурія зумовлена виходом гемоглобіну

з еритроцитів уже в сечі при їх розпаді. Первинна гемоглобінурія є важливим симптомом гемолітичної хвороби поросят, післяродової гемоглобінурії корів, пароксизмальної гемоглобінурії телят, лептоспірозу, кровопаразитарних хвороб (бабезіоз, нуталіоз, піроплазмідоз) та деяких інтоксикацій. Сеча при гемоглобінурії набуває буро-червоного кольору.

При виділенні міоглобіну (*міоглобінурія*) сеча має червоний або темно-коричневий колір. Міоглобінурія спостерігається при травмах м'язів, міопатозі та паралітичній міоглобінурії коней.

Лабораторна робота 4.15. Визначення рівня ліпопротеїнів низької і дуже низької щільності у сироватці крові експрес-методом

Принцип методу. При додаванні гепарину до сироватки крові за наявності кальцію хлориду утворюється гепарин-ліпопротеїновий комплекс. Мутність, що виникає, пропорційна вмісту ліпопротеїнів низької і дуже низької щільності.

Реактиви: 1) розчин кальцію хлориду 25 мМ; 2) розчин гепарину, що містить 1000 Од/см³.

Матеріал. Свіжа сироватка або плазма крові.

Хід роботи:

У пробірку, в якій міститься 2,0 см³ розчину кальцію хлориду 25 мМ, додають 0,2 см³ сироватки, 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 см³ 1 %-вого 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 ліпопротеїнів низької і дуже низької щільності.

Розрахунок. Вміст ліпопротеїнів низької і дуже низької щільності виражають в одиницях екстинкції, помножених на 100:

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

Норма. 35–55 Од.

Лабораторна робота 4.16. Дослідження вмісту холестеролу в плазмі (сироватці) крові

Принцип методу. ЛПВЩ залишаються розчиненими в плазмі (сироватці) крові після того, як ЛПНЩ і ЛПДНЩ преципітовані гепарином за наявності іонів мангану. У супернатанті визначають вміст холестеролу. *Вмісту холестеролу визначають в ЛПВЩ (α -ЛП).*

Реактиви: мангану хлорид, розчин 2 М; розчин гепарину, що містить 5000 Од/см³; ізопропіловий спирт; стандартний розчин холестеролу: 50 мг на 100 см³ ізопропілового спирту, або 1,3 мМ.

Хід роботи:

До 1 см³ сироватки або плазми крові у центрифужній пробірці, що знаходиться в штативі із льодом, приливають 40 мкдм³ розчину гепарину, перемішують на змішувачі, додають 50 мкдм³ розчину мангану хлориду, струшують. Сироватка стає каламутною. Пробірки залишають на льоду на 30 хв. Потім центрифугують проби протягом 30 хв при 2,5 тис об/хв і температурі 4–6 °С. Обережно, щоб не піднявся осад, виймають пробірки і зливають верхній шар, який використовують для визначення холестеролу.

Вміст холестеролу можна визначити як прямим методом, так і після екстракції органічним розчинником.

Розрахунок вмісту холестеролу в пробі C_d обчислюють за формулою:

$$C_d = E_d/E_{cm} \cdot C_{cm}, \text{ де}$$

E_d , E_{cm} – екстинкції відповідно дослідної та стандартної проб; C_{cm} – концентрація стандартного розчину, мМ.

Зважаючи на розведення сироватки, отриманий результат множать на 1,09.

Примітки:

1. Верхній шар сироватки, що містить ЛПВЩ, слід відсмоктати одразу після центрифугування, оскільки при нагріванні ЛПВЩ теж починають преципітуватися.

2. Якщо сироватка каламутна, зверху може утворитися шар хіломікронів, із-під якого важко відібрати пробу. У такому разі визначення слід повторити, збільшуючи кількість сироватки і відповідно – реактивів. При цьому прозорий шар буде більшим і з нього легше взяти пробу.

Норма. 0,9–1,9 мМ, або 35–75 мг на 100 см³.

Клініко-діагностичне значення. Дослідження холестеролу використовується в комплексі з іншими тестами для визначення характеру гіперліпопротеїнемій. *Гіперхолестеролемія* зустрічається при механічних жовтяницях, нефриті, нефрозі, гіпотиреозі, авітамінозах. Підвищують рівень холестеролу андрогени, кортикостероїди, адреналін, сульфаніламід, тіазидні діуретики, антикоагулянти (фториди, оксалати), білірубін. *Гіпохолестеролемія* спостерігається при туберкульозі, паренхіматозній жовтяниці, гіпертиреозі, анеміях, голодуванні. Знижують рівень холестеролу аспарагіназа, хлорпропамід, хлортетрациклін, колхіцин, галоперидол, канаміцин, інгібітори МАО, неоміцин.

Лабораторна робота 4.17. Визначення концентрації глюкози у біологічних рідинах глюкозооксидазним методом

Принцип методу. Глюкоза у присутності глюкозооксидази окислюється Оксигеном повітря до глюконової кислоти і гідрогену пероксиду. Глюконова кислота у присутності пероксидази вступає в реакцію з фенолом і 4-амінофеназоном з утворенням сполуки червоно-фіолетового кольору. Інтенсивність забарвлення, що визначається фотометрично, пропорційна концентрації глюкози.

Хід роботи:

Послідовність процедури визначення концентрації глюкози наведена у табл. 4.6.

Проби ретельно перемішують і інкубують не менше 20 хв при 37 °С або 30 хв при 15–25 °С. 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.

Таблиця 4.6. – Послідовність виконання лабораторної роботи:

Інгредієнт	Холоста проба, см ³	Калібрувальна проба, см ³	Дослідна проба, см ³
Калібрувальний розчин	-	0,05	-
Плазма крові	-	-	0,05
Робочий реактив	4,0	4,0	4,0
Дистильована вода	0,05	-	-

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

Розрахунок концентрації глюкози проводять за формулою:

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

C – концентрація глюкози, мМ;

*E*_{дос} – оптична густина дослідної проби, од. оптичної густини;

*E*_{кал} – оптична густина калібрувальної проби, од. оптичної густини.

Норма, мМ: 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.

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 концентрація 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.

Лабораторна робота 4.18. Визначення вмісту сіалових кислот у плазмі крові

Принцип методу. При нагріванні глікопротеїнів плазми з трихлороцтовою кислотою відщеплюються сіалові кислоти, які гідролізуються з утворенням нейроамінової та оцтової кислот. Резорцин у присутності солей купруму дає з нейроаміновою кислотою синє забарвлення.

Хід роботи:

До $0,1 \text{ см}^3$ плазми (сироватки) крові приливають $1,0 \text{ см}^3$ 5 %-го розчину трихлороцтової кислоти, поміщають на 7 хв на киплячу водяну баню для гідролізу, потім охолоджують і фільтрують через паперовий фільтр. До $0,5 \text{ см}^3$ прозорого фільтрату додають $0,5 \text{ см}^3$ води і 1 см^3 резорцинового реактиву, закривають пробками і розміщають на водяну баню ще на 15 хв. Після цього охолоджують, додають 3 см^3 екстрагуючого реактиву ($2,5 \text{ см}^3$ бутилацетату і $0,5 \text{ см}^3$ бутанолу), зтрушують та залишають на 15 хв для розшарування фаз. Колір переходить у верхній шар, який відсмоктують і фотометрують при довжині хвилі 575–490 нм проти розчину з резорциновим реактивом.

Розрахунки проводять за калібрувальним графіком.

Норма. Вміст сіалових кислот складає 2,0–2,33 мМ.

Клініко-діагностичне значення. Вміст сіалових кислот зростає при різноманітних запальних процесах, а також при пухлинах, інфаркті міокарда, при ураженні легень.

Лабораторна робота 4.19. Визначення вмісту білірубіну в сироватці крові (метод Іендрашика, Клеггорна та Грофа)

Принцип методу. Під час взаємодії сульфанілової кислоти з натрію нітритом утворюється діазофенілсульфонова кислота, яка дає з кон'югованим (прямим, зв'язаним) білірубіном сироватки крові рожево-фіолетове забарвлення. За інтенсивністю забарвлення визначають концентрацію білірубіну, що дає пряму реакцію. При додаванні до сироватки крові кофеїнового реактиву некон'югований (незв'язаний, непрямий) білірубін переходить у розчин-

ний дисоційований стан і з сумішшю діазореактивів також дає рожево-фіолетове забарвлення. Інтенсивність забарвлення є показником концентрації загального білірубіну. За різницею між вмістом загального та кон'югованого білірубіну визначають концентрацію некон'югованого білірубіну.

Реактиви: кофеїновий реактив; 0,9 %-вий розчин натрію хлориду; діазосуміш:

а) діазореактив І;

б) діазореактив ІІ. Перед роботою змішують 10 см³ діазореактиву І і 0,3 см³ діазореактиву ІІ.

Матеріал для дослідження. Свіжа сироватка або плазма крові.

Хід роботи (табл. 4.7):

Для визначення кон'югованого білірубіну проби колориметрують через 5–10 хв після додавання діазосуміші, оскільки при зволіканні в реакцію вступає некон'югований білірубін.

Для визначення загального білірубіну пробу залишають на 20 хв, після чого колориметрують. Надалі забарвлення змінюється.

Вимірювання проводять на фотоелектроколориметрі при $\lambda = 500\text{--}560$ нм (зелений світлофільтр) у кюветі з товщиною шару 0,5 см, порівнюючи з водою. Від показників, отриманих при колориметруванні загального та кон'югованого білірубіну, віднімають показник контролю або колориметрують, порівнюючи з ним.

Розрахунок здійснюють за калібрувальним графіком. Знаходять вміст загального і кон'югованого білірубіну. Для визначення рівня некон'югованого білірубіну від показника загального його вмісту віднімають показник кон'югованого білірубіну.

Таблиця 4.7. – Послідовність виконання лабораторної роботи:

Компонент	Загальний білірубін, см ³	Кон'югований білірубін, см ³	Контрольна проба, см ³
Сироватка крові	0,50	0,50	0,50
Кофеїновий реактив	1,75	-	1,75
0,9 %-й розчин натрію хлориду	-	1,75	0,25
Діазосуміш	0,25	0,25	-

Примітки.

1. Сироватка не має бути гемолізованою.
2. Перед визначенням білірубіну пацієнту не можна застосовувати препарати або вживати корм, що викликає штучне забарвлення сироватки (морква тощо), не слід також вводити вітамін С.

3. Для перерахунку міліграм-відсотків (мг/100 см³) у мікро-молі на дециметр користуються коефіцієнтом 17,10.

Норма, мкМ: загальний білірубін – велика рогата худоба – 1,71–10,3; вівці 0–6,84; коні – 4–14,5; свині – 0–6,84; кури – 1,71–6,0; собаки – 0,4–5,4; *прямий білірубін* – велика рогата худоба – 0; вівці 0–4,61; коні – 0–6,84; свині – 0–5,13; собаки – 1,03–2,05.

Клініко-діагностичне значення. Визначення вмісту білірубіну 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) білірубіну. В результаті посиленого гемолізу відбувається інтенсивне утворення в ретикуло-ендотеліальній системі непрямого білірубіну із зруйнованих ерит-

роцитів. 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 невисоких 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 руйнувати 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 вуглецем чотирихлористим, свинцем, діхлоретаном, тривалому застосуванні сильнодіючих лікарських препаратів.

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

Концентрація білірубину в сироватці крові дещо зростає під впливом таких препаратів, як фенітоїн, натрію йодат, сульфаніламіди (переважно фракція кон'югованого білірубину), індометацин, саталон, тимолол, вітамін К. Знижують вміст білірубину аспірин, вітамін С.

Лабораторна робота 4.20. Тимолова проба

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

Хід роботи (табл. 4.8):

Таблиця 4.8. – Послідовність проведення лабораторної роботи:

Інгредієнт	Дослідна проба, см ³	Контрольна проба, см ³
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 у табл. 4.9.

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

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.

Лабораторна робота 4.21. Цинк-сульфатна проба

Принцип методу. Додавання цинку сульфату при рН 6–8 осаджує з сироватки крові переважно імуноглобуліни. Інтенсивність помутніння, яка визначається колориметрично, пропорційна вмісту імуноглобулінів.

Хід роботи:

У пробірку вносять 2 см³ суміші буферного і цинк-сульфатного розчинів, 0,02 см³ сироватки, змішують і через 30 хв колориметрують при довжині хвилі 620–660 нм у 5 мм кюветах проти контрольного розчину, який містить 2 см³ буферного розчину і 0,02 см³ сироватки. Концентрацію імуноглобулінів виражають в одиницях каламутності, які розраховують за калібрувальним графіком.

Клініко діагностичне значення. В нормі імуноглобуліни складають 13–19 % від загального протеїну крові. *Гіпогаммаглобулінемія* – зниження концентрації γ -глобулінів, яке може бути пов'язано із зниженням продукції антитіл при ураженні імунної системи будь-якої етіології. *Гіпергаммаглобулінемія* – збільшення концентрації γ -глобулінів, як результат активації імунних реакцій з посиленням синтезом імуноглобулінів. Спостерігають при бактеріальних і вірусних інфекціях, паразитарних захворюваннях, хронічних інфекціях і цирозі печінки.

Лабораторна робота 4.22. Дослідження вмісту 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.

Реактиви: трансформуючий розчин, стандартний розчин гемоглобінціаніду.

Хід роботи:

Перед визначенням ретельно перемішують кров. Відбирають $0,02 \text{ см}^3$ крові у чисту пробірку. Потім вносять 5 см^3 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.

Лабораторна робота 4.23. Дослідження вмісту оксигемоглобіну (HbO_2) Fe^{2+}

Принцип методу. У разі отримання похідних гемоглобіну (окси-, карбокси-, метгемоглобіну) використовують їх властивості, зокрема те, що оксигемоглобін – нестійка сполука, карбоксигемоглобін – стійка сполука, метгемоглобін – утворюється під дією окиснювачів. Досліджують ці похідні методом спектрального аналізу. Пігменти крові вибірково поглинають промені світла певної довжини хвилі, і світло, що проходить, дає характерні спектри поглинання.

Хід роботи:

У мірний циліндр на 100 см^3 вливають 1 см^3 дефібринованої крові й розводять дистильованою водою до позначки. Відмічають колір розчину, відбирають у пробірку 10 см^3 розчину оксигемоглобіну і закріплюють у щілині спектроскопа. Під час розглядання в спектроскопі видно дві чіткі смуги поглинання в жовто-зеленій частині спектра. Розчин оксигемоглобіну розливають у 5 пробірок приблизно по 10 см^3 для отримання інших похідних. Перша пробірка слугує контролем для подальших досліджень.

Лабораторна робота 4.24. Дослідження вмісту карбокси-гемоглобіну (НЬСО) Fe^{2+}

Принцип методу. Спорідненість чадного газу до гемоглобіну приблизно в 200 разів вища, ніж до Оксигену. Тому навіть за невеликих його концентрацій у повітрі він швидко з'єднується з гемоглобіном.

Хід роботи:

1. У мірний циліндр на 50 см^3 наливають $0,5 \text{ см}^3$ крові, насиченої карбону (II) оксидом, і доводять дистильованою водою до мітки. Порівнюють колір отриманого розчину карбоксигемоглобіну з кольором оксигемоглобіну. Розчин карбоксигемоглобіну має специфічний малиновий відтінок.

2. У пробірку наливають 10 см^3 розчину карбоксигемоглобіну. Досліджують у спектроскопі спектри поглинання карбоксигемоглобіну, порівнюють їх зі спектром поглинання оксигемоглобіну. У пробірки з розчином оксигемоглобіну і карбоксигемоглобіну додають 2–3 крупинки натрію дитіоніту й обережно перемішують. Спостерігають швидкий перехід оксигемоглобіну в гемоглобін за зміною кольору. Колір розчину карбоксигемоглобіну при цьому не змінюється. Порівнюють спектри поглинання після додавання натрію дитіоніту.

3. До 10 см^3 розчину карбоксигемоглобіну додають 2–3 краплі розчину таніну. Утворюється осад малинового кольору. Реакцію повторюють з 10 см^3 розчину карбоксигемоглобіну. Випадає осад брудно-коричневого кольору.

4. В одну пробірку додають краплю розведеної НЬО_2 крові, а в другу – краплю крові, насиченої Карбону (II) оксидом. В обидві пробірки доливають 20 см^3 дистильованої води і ретельно перемішують. За великих розведень оксигемоглобін має жовтуватий відтінок, а розчин карбоксигемоглобіну залишається рожево-малиновим.

Клініко-діагностичне значенн

Збільшення вмісту гемоглобіну в крові тварин (плейохромія, гіперхромемія) спостерігається при згущенні крові (діарея,

утворення ексудатів, трансудатів), серцево-легеневій недостатності і збігається, як правило, зі збільшенням кількості еритроцитів. **Зменшення вмісту гемоглобіну в крові тварин (олігохромемія)** відмічається при анеміях різного походження, причиною яких є дефіцит Купруму, Кобальту, Феруму, вітамінів В₂, В₁₂, В_с, С кровотечі, посилений гемоліз еритроцитів при піроплазмідозах, лептоспірози, інфекційній анемії коней, пригнічення функції кісткового мозку різними токсинами.

РЕКОМЕНДОВАНА ЛІТЕРАТУРА

1. Аналітичні методи досліджень. Спектроскопічні методи аналізу: теоретичні основи і методики: навч. посібник для підготовки студентів вищих навчальних закладів / Д. О. Мельничук, С. Д. Мельничук, В. М. Войціцький [та ін.]: за ред. Д. О. Мельничука. – К.: ЦП «Компринт», 2016. – 289 с.
2. Аналітичні методи досліджень. Хроматографічні та електрофоретичні методи аналізу: теоретичні основи і методики: навч. посібник для підготовки студентів вищих навчальних закладів / В. М. Войціцький, С. В. Хижняк, В. А. Грищенко [та ін.]. – К.: ЦП «Компринт», 2017. – 268 с.
3. Ветеринарна клінічна біохімія: підручник / В. І Левченко, В. В. Влізло, І. П. Кондрахін [та ін.]. – Б. Церква : БДАУ, 2002. – 400 с.
4. Ветеринарна клінічна біохімія: посібник / Д. О. Мельничук, В. А. Грищенко, В. А. Томчук [та ін.]: за ред. Д. О. Мельничука. – К. : НУБіП України, 2014. – 456 с.
5. Ветеринарная лабораторная медицина. Интерпретация и диагностика / Д. Мейер, Дж. Харви: (пер. с англ.). – М : Софион, 2007. – 456 с.
6. Використання ліпосом на основі фосфоліпідів молока у гепатології / [Д. О. Мельничук, В. А. Грищенко, В. А. Томчук та ін.]: за ред. Д. О. Мельничука. – К.: НУБіП України, 2010. – 400 с.
7. Горячковский А. М. Справочное пособие по клинической биохимии / А. М. Горячковский. – О.: ОКФА, 1994. – 416 с.
8. Дослідження сечі. Методичні рекомендації для студ. ф-ту ветеринарної медицини та слухачів післядипломного навчання спеціалістів ветеринарної медицини / [В. І. Левченко, М. Я. Тишківський, В. В. Сахнюк та ін.]. – Біла Церква, 2005. – 74 с.
8. Експрес-метод прогнозування імунодефіцитного стану організму новонароджених телят: Рекомендації для підприємств України з профілактики імунодефіцитів та системних патологій у новонароджених телят / [Д.О. Мельничук, М.І. Цвіліховський, В.А. Грищенко. – К.: Видавничий центр НАУ, 2001. – 15 с.

9. Клінічна біохімія: навч. посіб. для студ. вищ. фармац. навч. закл. і фармац. ф-тів вищ. мед. навч. закл. III–IV рівнів акредитації. / За ред. О. П. Тимошенко. – К. : ВД «Професіо-нал», 2005. – 288 с.

10. Клінічна біохімія: Підручник / Д. П. Бойків, Т. І. Бондарчук, О. Л. Іванків та ін.; за ред. О. Я. Солярова. – К. : Медицина, 2006. – 432 с.

11. Лабораторна діагностика порушень обміну електролітів і кислотно-лужного стану: методичні вказівки для підготовки фахівців спеціальності «Ветеринарна медицина», ОКР «Магістр» з дисципліни «Клінічна біохімія» / Д. О. Мельничук, В. А. Грищенко, В. А. Томчук та [ін.] – К.: Вид. центр НАУ, 2008. – 17 с.

12. Лифшиц В. М. Биохимические анализы в клинике: справочник / В. М. Лифшиц, В. И. Сидельникова. – М. : МИА, 1998. – 303 с.

13. Маршал В. Дж. Клиническая биохимия / В. Дж. Маршал – Петербург: «Невский диалект», 2000. – 367 с.

14. Мельничук Д. О. Роль кислотно-лужного стану та фосфоліпідів молока у формуванні колострального імунітету в новонароджених телят / Д. О. Мельничук, В. А. Грищенко. – К.: ЦП «Компринт», 2015. – 250 с.

15. Методи дослідження функціонального стану печінки та біліарної системи: навч. посібник для підготовки студентів ВНЗ: навч. посібник / Д. О. Мельничук, В. А. Томчук, П. І. Янчук [та ін.]: за ред. Д. О. Мельничука. – К. : НУБіП України, 2015. – 414 с.

16. Спеціальна біохімія: навч. посібник / С. Д. Мельничук, Д. О. Мельничук, С. В. Хижняк [та ін.] : за ред. С. Д. Мельничука. – К. : НУБіП України, 2015. – 649 с.

17. Спеціальна біохімія: навч. посібник / С. Д. Мельничук, С. В. Хижняк, В. І. Цвіліховкий [та ін.] : за ред. С. Д. Мельничука. – К. : НУБіП України, 2014. – 374 с.

18. Томчук В. А. Ліпіди та ентеропатологія телят: монографія / В. А. Томчук, В. А. Грищенко. – К.: ЦП «Компринт», 2016. – 508 с.

19. Энциклопедия клинических лабораторных тестов / Перевод с англ. под ред. В. В. Меньшикова. – М. : Лабинформ, 1997. – 960 с.

20. Addition of gut active carbohydrates to colostrum replacer does not improve passive transfer of immunoglobulin G in Holstein dairy calves / M. Villettaz Robichaud, S. M. Godden, D. M. Haines [et al.] // J. of Dairy Science. – 2014. – V. 97, Is. 9. – P. 5700–5708.

21. Effect of feeding colostrum at different volumes and subsequent number of transition milk feeds on the serum immunoglobulin G concentration and health status of dairy calves / M. Conneely, D. P. Berry, J. P. Murphy [et al.] // J. of Dairy Science. – 2014. – V. 97, Is. 11. – P. 6991–7000.

22. Hurley W. L. Perspectives on Immunoglobulins in Colostrum and Milk. / W. L. Hurley, P. K. Theil // Nutrients. – 2011. – V. 3, N. 4, – P. 442–474.

23. Orinya O. A. Haematological and biochemical studies on the effect of diclofenac sodium on Wistar *Rattus norvegicus* / O. A. Orinya, A. Y. Adenkola, R. J. Ogbe. International Journal of Biological and Chemical Sciences. – 2016. – 10(5). – P. 2231–2242.

24. The effect of colostrum source (goat vs. sheep) and timing of the first colostrum feeding (2 h vs. 14 h after birth) on body weight and immune status of artificially reared newborn lambs / L. E. Hernández-Castellano, A. Morales-delaNuez, D. Sánchez-Macías [et al.] // J. of Dairy Science. – 2014. – V. 98, N. 1. – P. 204–210.

25. Veterinary clinical biochemistry: textbook, Part 1 / V. A. Tomchuk, V. A. Gryshchenko, V. I. Tsvilikhovskyi. – К.: ЦП «Компринт», 2016. – 268 с.

ЧАСТИНА V

ЗАБЕЗПЕЧЕННЯ ЯКОСТІ ДІЯЛЬНОСТІ БІОХІМІЧНОЇ ЛАБОРАТОРІЇ

5.1. СТАНДАРТИ ДЛЯ ЛАБОРАТОРІЙ, ЇХ ЗАГАЛЬНІ ПОЛОЖЕННЯ (ISO 9001, ISO/IEC17025, ISO 15189, GLP)

5.1.1. Введення в забезпечення якості

Аналітик надає наукові дані, на підставі яких приймаються важливі рішення. Говорити, що аналітик проводить вимірювання і повідомляє про результати – означало б сильно применшувати значення аналітичної роботи. Існує якась «додана вартість». Все стає ясно, коли з'являється можливість показати наочно, що представлені результати отримані в організації, в якій діє система управління якістю. Саме важливість аналітичної роботи вимагає гарантій якості. Це означає, що зроблено все необхідне для впевненості в тому, що прийняті до уваги, враховані і представлені в безперервного запису всі фактори, впливають на підсумковий результат; що виконували всі відповідні вимірювання, до того ж, виконані правильно, за допомогою методу, що пройшов перевірку для аналізу даної речовини.

Важливо, щоб вимір, проведений в одній лабораторії хіміком-аналітиком, міг повторити другий аналітик тієї ж (або іншої) лабораторії навіть якщо інша лабораторія розташована за кордоном. Мета – забезпечити порівнянність результатів, отриманих в різних лабораторіях. Якщо ми вимірюємо довжину шматка дроту, масу хімічного реагенту або відраховуємо час в будь-якій лабораторії де б ми не знаходилися, ми впевнені, що отримали дуже близькі результати, тому що існують міжнародні еталони довжини, маси і часу. Для того, щоб отримувати близькі результати, вимірювальні пристрої повинні бути відповідним чином калібровані. Наприклад, ваги калібрують за допомогою еталонної гирі (еталону маси), яка пов'язана з первинним еталоном маси. Проте, недостатньо обмежитися калібруванням приладу/обладнання; важливо, щоб вся методика пройшла процедуру оцінки придатності для аналізу конкретної речовини – від виділення аналіту з проби до підсумкового вимірювання.

Простежуваність даних складається у взаємному визнанні результатів випробувань у національному та міжнародному масштабі. Термін «метрологічна простежуваність» в даному контексті визначає «Міжнародний словник з метрології». «Метрологічна простежуваність – властивість результату вимірювання, за допомогою якого результат може бути порівняний з еталоном через безперервний ланцюг калібрувань і задокументований, де кожний результат вносить вклад в сумарну невизначеність вимірювання». Коли мова йде про міжнародну торгівлю, важливо, щоб країни-члени організації торгівлі визнавали результати один одного. Це може статися лише у випадку, якщо всі країни дійдуть згоди за стандартами якості випробувань і калібрування. Для того, щоб досягти цієї мети, всі повинні використовувати однакові еталони і бути оціненими третьою стороною.

5.1.2 Система менеджменту якості, забезпечення якості і контролю якості

Система менеджменту якості являє собою сукупність процедур і систему відповідальності, прийняту в організації для того, щоб забезпечити персонал обладнанням та ресурсами для виконання роботи раціональним і ефективним чином. Для формального визнання та контролю системи менеджменту якості, вона повинна бути заснована на визнаних міжнародних стандартах, прийнятих замовниками та іншими організаціями по всьому світу. Хороша система менеджменту якості передбачає кілька аспектів. Серед них: заява про політику в сфері якості, загальна організація лабораторії, позиції і відповідальність, процедури контролю якості, управління документами і представленням результатів, внутрішні перевірки, аналіз з боку керівництва та виконання робіт на субпідряд. Слід пам'ятати, що система менеджменту якості повинна бути вичерпною настільки, щоб задовольняти вимогам усіх замовників. Це означає, що вона може перевершувати очікування окремих замовників.

Якщо говорити коротко, то система менеджменту якості являє

собою комбінацію менеджменту якості, контролю якості та забезпечення якості. Забезпечення якості та контроль якості є компонентами лабораторної системи менеджменту якості. Поняття «контроль якості» і «забезпечення якості» часто змішують і, на жаль, використовують одне замість іншого. Це відбувається, ймовірно, від того, що заходи з контролю якості та забезпечення пов'язані між собою. Визначення термінів дано у стандарті ISO 9000 (International Organization for Standardization – Міжнародної організації зі стандартизації).

Забезпечення якості являє собою частину системи менеджменту якості, зосереджену на забезпеченні впевненості в тому, що вимоги щодо якості будуть виконані. Всі планові та систематичні заходи, впроваджені в систему менеджменту якості, наочно представлені в разі потреби, забезпечують необхідну впевненість у тому, що аналітична служба виконує вимоги з якості. Служба забезпечення якості є найважливішою організаційною інфраструктурою, підтримуючої достовірність усіх аналітичних вимірювань. Вона охоплює різні заходи, в тому числі тренінги для персоналу, ведення записів, відповідні умови навколишнього середовища, належні умови для зберігання, що забезпечують цілісність проб, реактивів і розчинників, графіки технічного обслуговування та калібрування приладів, застосування методів, що пройшли документально підтверджену перевірку.

Існує два види контролю якості – внутрішній контроль і зовнішня оцінка якості (зовнішній контроль). Внутрішній контроль якості забезпечує впевненість керівництва лабораторії в якості, а зовнішній контроль – впевненість замовника. Внутрішній контроль якості являє собою операції, які виконуються персоналом у процесі вимірювань і підтверджують, що система функціонує задовільно і результати є прийнятними. Зовнішня оцінка якості, здійснюється в ході формальних і неформальних міжлабораторних порівнянь. Формальні порівняння здійснюють у рамках програм професійних тестів (РТ).

5.1.3. Стандарти та їхні основні положення

Стандарти, що відносяться до якості послуг, розроблені рядом національних і міжнародних організацій. Вимоги до аналітичної лабораторії залежать від її розміру, колу операцій і типів виконуваних аналізів. Виходячи з цього, аналітична лабораторія повинна визнати ряд існуючих стандартів.

Міжнародний стандарт ISO 9001 «Системи менеджменту якості. Вимоги» – це загальний стандарт для всіх типів організацій незалежно від їх розмірів. Цей стандарт встановлює вимоги до системи менеджменту якості для організації, яка:

- хоче продемонструвати здатність послідовно поставляти продукцію, що відповідає вимогам споживачів і відповідним обов'язковим вимогам;

- орієнтована на підвищення задоволеності споживачів за допомогою ефективного застосування системи, включаючи процеси постійного поліпшення системи та забезпечення відповідності вимогам споживача, і обов'язковим вимогам.

Міжнародний стандарт ISO/IEC 17025 «Загальні вимоги до компетентності випробувальних та калібрувальних лабораторій» являє більш спеціалізованим. Цей стандарт призначений для застосування в лабораторіях, які проводять випробування та / або калібрування. Він відноситься до компетентності лабораторії та її персоналу. Лабораторії, які бажають отримати акредитацію за даним стандартом, повинні розробити власну систему менеджменту якості, адміністративні та технічні процедури відповідно до пунктів цього стандарту. Акредитація – формальна процедура, проведена авторитетним органом, що підтверджує компетентність лабораторії у виконанні певних завдань. Сюди входять і питання зв'язані з менеджментом, що відносяться до адміністрації, і інші питання (якості, які вирішуються в рамках сертифікації. Акредитація, як правило, відноситься до окремої комбінації «аналіт, матриця і метод». Національний орган акредитації проводить акредитацію у своїй країні.

До медичних лабораторій пред'являються особливі вимоги, включені в стандарт ISO 15189 «Медичні лабораторії – Додаткові

вимоги до якості та компетентності». У нього включені вимоги обох стандартів – ISO 9001 та ISO/IEC 17025. Він являє собою спеціалізовану версію ISO/IEC 17025 для медичних лабораторій.

5.1.4. Загальні положення стандартів ISO 9001, ISO/IEC 17025 та ISO 15189

Три стандарти – ISO 9001, ISO / IEC 17025 та ISO 15189 – мають багато спільного, проте між ними є окремі тонкі відмінності. На рис. 5.1 представлені загальні положення. У питаннях, що відносяться до структури менеджменту та відповідальності за якість, менеджер з якості (як би його не називали), як правило, діє від імені вищого керівництва організації. Структура менеджменту викладена в керівництві з якості, яке є документом найвищого рівня. У ньому чітко показана структура організації, роль і відповідальність менеджерів та їх робочих груп. Крім того, керівництво з якості містить всі документи найвищого рівня, що відносяться до функцій керівництва. Керівництво дотримується локальної документації, наприклад, робочі інструкції та методики. Важливо, щоб у тексті контракту були прописані всі моменти, які стосуються конкретної роботи – від отримання проби до передачі результатів замовнику. Це означає, що всі результати інструментальних вимірів, результати оцінки придатності методики та калібрування вимірювальних пристроїв, а також результати контролю якості повинні бути індивідуально ідентифіковані для конкретної проби. Подібні записи слід зберігати протягом часу, визначеного у керівництві з якості або узгодженого із замовником. Все частіше від організацій вимагають підтвердження компетентності працюючого в ньому персоналу.

Як відбувається перевірка компетентності? Відповідь на це питання теж може бути викладене в Посібнику з якості. Щоб продемонструвати вищому керівництву організації, що всі необхідні процедури виконуються належним чином, на регулярній основі проводять внутрішні перевірки – їх називають внутрішнім аудитом. Ці перевірки є способом забезпечення правильного функціонування системи якості. Крім того, для отримання сертифі-

кації або акредитації за певним стандартом необхідно провести підтвердження відповідності третьою стороною – органом з оцінки відповідності. Для підтвердження дотримання всіх вимог певного стандарту та задоволення виробничих потреб вище керівництво організації один раз на рік переглядає систему менеджменту якості.

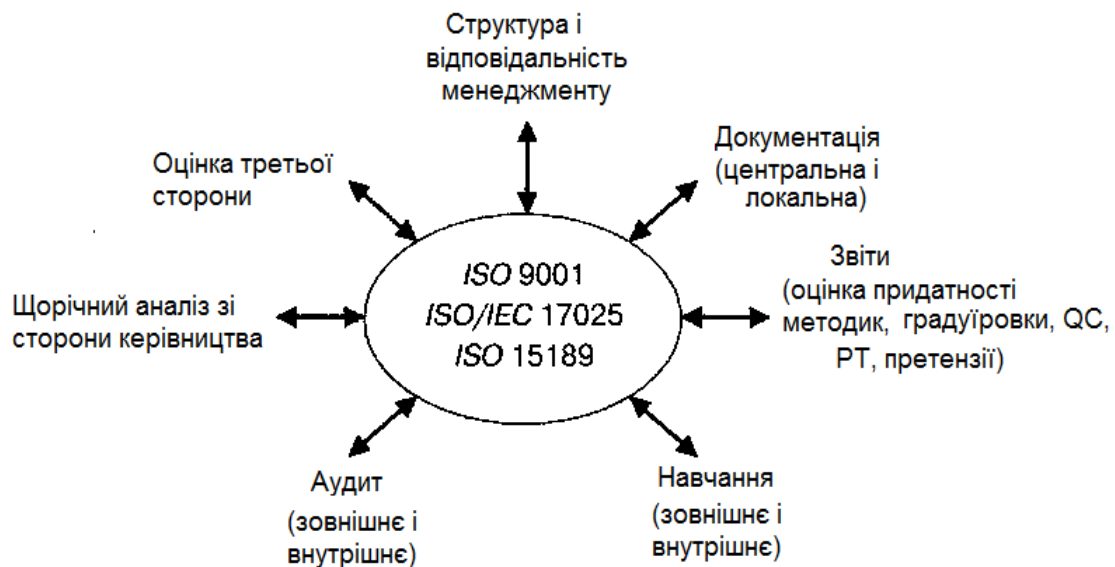


Рис. 5.1. Основні компоненти системи менеджменту якості

5.1.5. Положення стандарту ISO 9001

Стандарт систем менеджменту якості ISO 9001 пропонує застосовувати «процесний підхід» при розробці, впровадженні та поліпшенні результативності системи менеджменту якості з метою підвищення задоволеності споживачів завдяки виконанню їхніх вимог. Відповідно до даного підходу, будь-яка діяльність, що використовує ресурси для перетворення «входів» у «виходи», може розглядатися як процес. Представлена на рис. 5.2 схема складена на підставі рис. 5.1 і показує як можна інтерпретувати стандарт для лабораторії, що проводить хімічні аналізи.

Цей стандарт є дуже загальним документом і не торкається технічних аспектів. Проте, все частіше аналітичні лабораторії вибирають сертифікацію за стандартом ISO 9001, що дозволяє їм розширити коло діяльності. У заголовках ранніх версій даного стандарту присутній термін «забезпечення якості», однак зараз його прибра-

ли. Причиною послужило те, що поточний стандарт вимагає більшого, ніж забезпечення якості послуги. Також передбачається збільшення задоволеності замовника поряд з демонстрацією безперервного вдосконалення. На рис. 5.2 цей аспект представлений на схемі в блоці, зв'язаному з оцінкою результатів.

Зміни в лабораторній системі проводять, беручи до уваги існування зворотного зв'язку між замовником та/або лабораторією і офісом. Зміни проводять по завершенні роботи або за результатами внутрішнього аудиту. Керівництво проводить порівняльний аналіз, переглядає та оцінює всю систему і забезпечує ресурси, необхідні для введення змін, наприклад, придбання додаткового/іншого обладнання або найму персоналу. Велика увага приділяється оцінці ефективності роботи і заходам з підвищення задоволеності замовника.

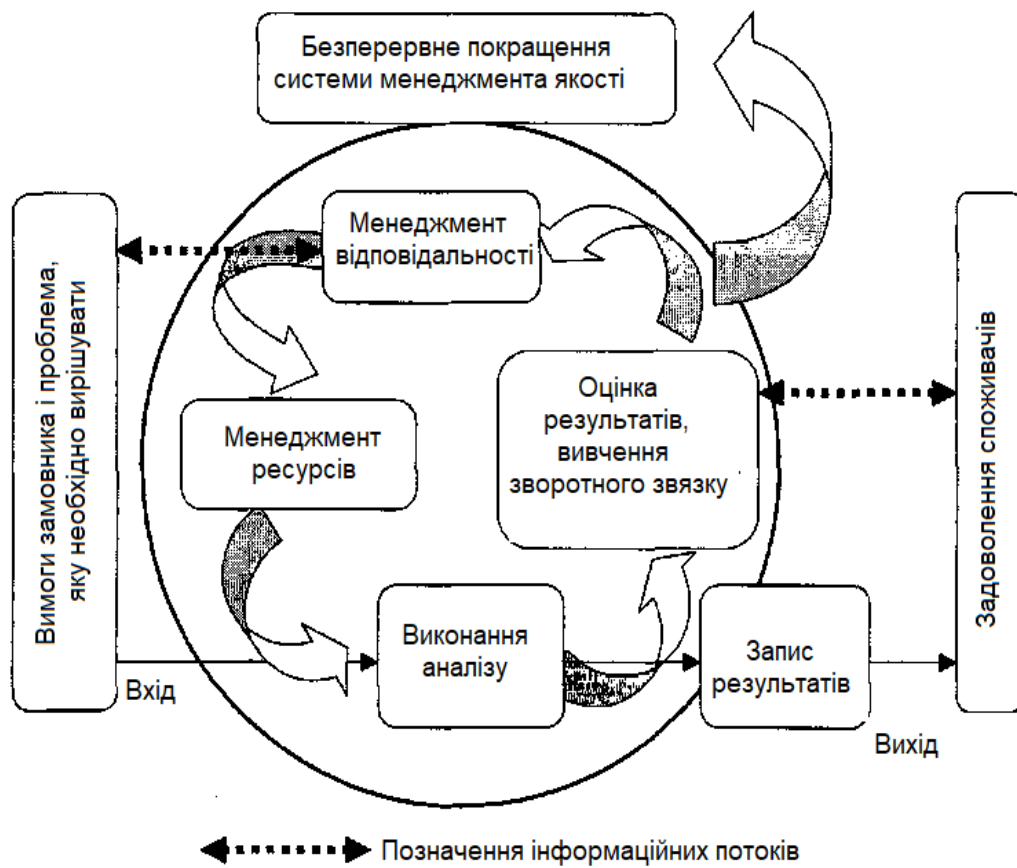


Рис. 5.2. Модель системи менеджменту якості, основаної на процесному підході.

5.1.6. Положення стандарту ISO/IEC 17025

Стандарт ISO/IEC 17025 «Загальні вимоги до компетентності випробувальних та калібрувальних лабораторій» відноситься до компетенції та способів її демонстрації. У той час як стандарт ISO 9001 носить досить загальний характер, ISO/IEC 17025 дуже специфічний. Акредитація видається на проведення конкретних випробувань в термінах області застосування, наприклад, аналіт, матриця, метод і інтервал концентрацій. Даний стандарт складається з двох основних розділів, один з яких описує вимоги менеджменту, а інший – технічні вимоги. Для відповідності вимогам даного стандарту в лабораторії повинна діяти система менеджменту якості, що відповідає принципам ISO 9001. Технічний розділ описує додаткові вимоги до лабораторії, яка бажає продемонструвати свою компетентність у виконанні аналізів і/або калібрування. Серед висвітлених питань – оцінка придатності методу, невизначеність вимірювань і застосування референтних матеріалів і вихідних еталонів для забезпечення простежуваності результатів, які видаються. Крім того, стандарт торкається процедури проведення лабораторією відбору проби, а також питання збереження проби. Для підтвердження якості результатів лабораторія повинна брати участь у міжлабораторних порівняннях, таких як програми PT.

5.1.7. Положення стандарту iso 15189

Цей стандарт був підготовлений спеціально для регламентування роботи медичних лабораторій, що виконують дослідження біоматеріалів людського організму. Подібні дослідження проводять з метою отримання інформації, необхідної для діагностики, запобігання та лікування хвороби або оцінки стану здоров'я людини. ISO 15189 регламентує ряд випробувань, що відносяться до клінічних вимірювань, наприклад, хімічним або мікробіологічним. Даний стандарт заснований на ISO 9001 та ISO/IEC 17025 і включає кореляцію між пунктами стандартів ISO 9001 та ISO/IEC 17025.

Термінологія даного стандарту дещо відрізняється від інших в тому сенсі, що відповідає конкретному направленню. Наприклад,

зміст терміну «лабораторія-рефері» (referral laboratories) в ISO 15189 дещо відрізняється від змісту терміну в стандарті ISO/IEC 17025. Якщо лабораторія-рефері є зовнішньою лабораторією, яка приймає проби для додаткових або підтверджуючих аналітичних процедур, то вона в більшій мірі аналогічна «контрактній лабораторії», як написано в ISO/IEC 17025. Також до ISO 15189 є Додаток, що відноситься до етичних питань стосовно лабораторної медицини.

5.2. ВІДБІР ПРОБ ТА ПІДГОТОВКА ДО АНАЛІЗУ

5.2.1. Важливість відбору проб

Відбір проб є важливим процесом, оскільки дозволяє зі знанням справи простежити історію матеріалу, що надходить в лабораторію для хімічного аналізу. Правильний відбір проб надає упевненості в тому, що заявлені показники будуть виявлені.

Відбір проби – процес відділення певним чином частини матеріалу для отримання інформації про загальний об'єм матеріалу.

Термінологія з відбору проб має змішані поняття, тому найкраще використовувати терміни з нормативних документів.

Наприклад, ISO/IEC17025 визначає відбір проб таким чином:

«Певна процедура, за допомогою якої частину речовини, матеріалу або продукту відбирають з метою проведення випробовування або калібрування репрезентативного зразка. Необхідність відбору проб може бути вказана у відповідній нормативній технічній документації, згідно з якою проводиться випробування або калібрування речовини, матеріалу або продукції».

Перед тим, як приступати до відбору проб або розробки схеми відбору проб, слід подумати: «Яка мета проведення аналізу?»

Відповідальність аналітика полягає в тому, щоб у процесі обговорення з замовником виявити реальну суть проблеми. Питання: «Скільки кадмію в цій пробі?» – Чи не є проба досить небезпечною? Ви завжди повинні питати, для чого потрібна ця робота або інформація. Від відповіді буде залежати: схема відбору проб, вибір аналітичного методу і прийнятний рівень підсумкового результату.

На жаль, схему відбору проб не завжди визначає аналітик. Проте, слід пам'ятати: аналітичний результат може залежати або не залежати від методу, який застосовується для аналізу, але він завжди буде залежати від плану відбору проб. Важливо знати потенційну величину невизначеності, пов'язаної з відбором проб, оскільки складова невизначеності відбору проби, може складати більше двох третин загальної невизначеності і спроба зменшити аналітичну невизначеність не завжди досягається.

Оцінка величини невизначеності, зв'язаної з відбором проби, може виявитися складною; докладні вказівки, як правило, є специфічними для даної галузі (*sector-specific*). Якщо вам необхідно оцінити невизначеність відбору проб, то слід звернутися до відповідних вказівок. Проте, якщо результати для контрольних проб представляють без урахування невизначеності відбору проб (*as-received*), то зосереджуються тільки на невизначеностях, зв'язаних з лабораторними операціями (такими як відбір частини проби, попередня обробка проби, вимірювання кількості присутнього аналіту).

Зв'язок між різними операціями наочно демонструє рис. 5.3, де показано схеми відбору проб та аналітичні операції. Це допомагає визначитися з термінами, які використовуються.

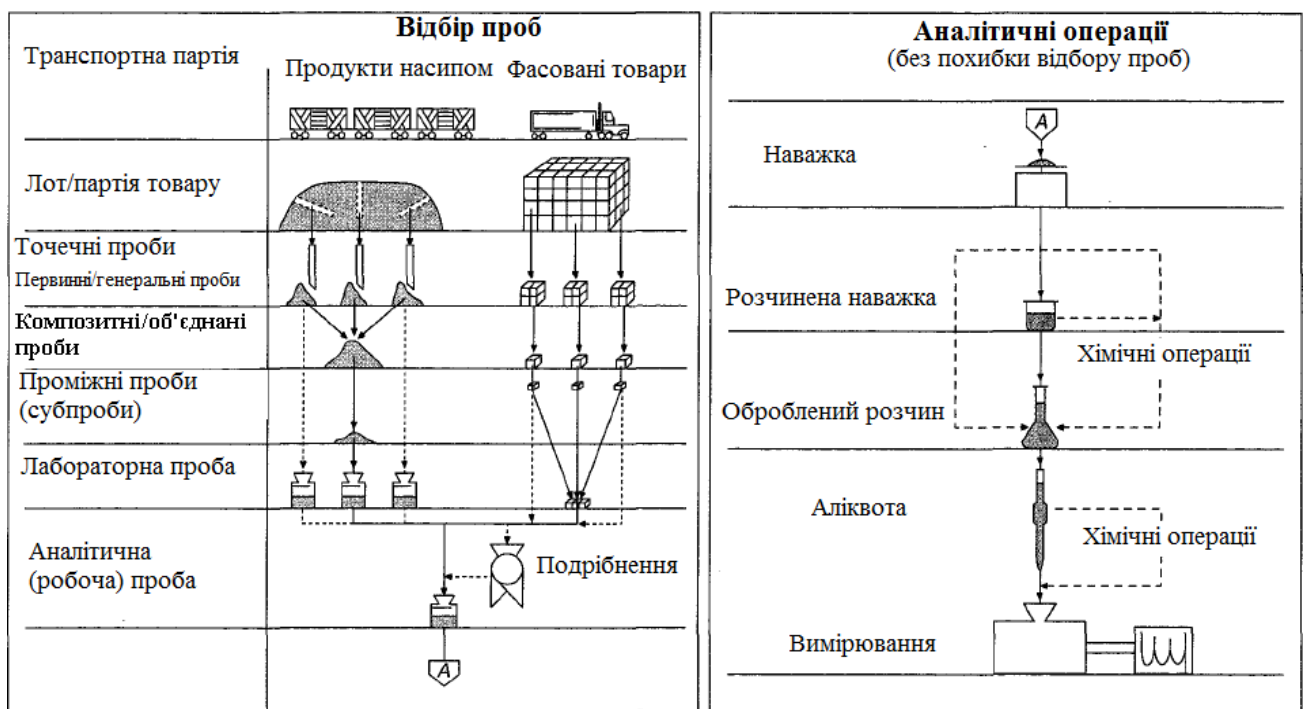


Рис. 5.3. Схема відбору проб і аналітичних операцій

Сипучі матеріали існують в різних формах. Серед прикладів, вантаж сипучого матеріалу:

- зерно розсипом;
- ґрунт із забрудненої ділянки;
- корабельний вантаж вугілля.

Для представлених прикладів основна особливість є спільною і полягає в тому, що матеріал не існує у вигляді окремих перманентно ідентифікованих одиниць.

Фасовані товари складаються з ідентифікованих одиниць, можуть бути пронумерованими. В окремих випадках сипучі матеріали можуть бути упаковані в блоки меншого об'єму, наприклад, в мішки або бочки. Такі блоки називають сегментами.

Примітка. Нижній знак «А» на схемі відбору проб відповідає верхньому «А» на схемі аналітичних операцій.

5.2.2. Ідентифікація видів проб

Транспортна партія вантажу (як сипучих матеріалів так і фасованих товарів) – певна кількість матеріалу, яка переміщується одним видом транспорту, на яку оформлено єдиний пакет товаро-супровідних документів.

Лот – певна кількість матеріалу, що представляє собою єдину сукупність з точки зору схеми відбору проб.

Товарна партія – певна кількість матеріалу, яку вироблено в однакових (або вважається однакових) умовах. Лот може складатися з однієї або декількох товарних партій, а в транспортну партію може, у свою чергу, входити один або декілька лотів. У більшості випадків лот або товарна партія занадто великі, що не дозволяє безпосередньо отримати прийнятну лабораторну пробу. Тому для отримання зразка, який буде прийнятий лабораторією, найчастіше необхідно провести ряд проміжних стадій відбору проби.

Точковими пробами називають порції матеріалу, взятого з лоту/товарної партії, за допомогою пристосування для відбору проб (пробовідбірника). Точкові проби часто комбінують для отримання об'єднаної або генеральної (первинної) проби. В окремих випадках лабораторну пробу відбирають безпосередньо з первинної проби.

В інших ситуаціях кілька первинних проб об'єднують або перемішують для одержання змішаної або збірної (комполітної) проби.

Лабораторна проба являє собою частину матеріалу, що доставляється в лабораторію для аналізу.

Лабораторну пробу найчастіше отримують з первинної або збірної проби шляхом проведення серії операцій з розділення і подрібнення матеріалу (наприклад, зменшення методом конуса і подальшого квартування, зменшення на жолобчастому скорочувачі).

Робоча частина (testportion) – певна кількість матеріалу, яка фактично використовується для аналізу. В аналітичній хімії робочу частину (наважку) проби іноді називають аналітичною частиною (*analyticalportion*). Якщо лабораторна проба є гомогенною, можливим стає прямий відбір робочої частини (наважки) без додаткової обробки проби.

Найчастіше наважку проби піддають обробці в кілька етапів перед тим, як отримують кінцеву аліквоту. Вимірювання аналітиком характеристики проводять в цій аліквоті.

Існує кілька підходів до опису поняття «проба». У першу чергу, пробу можна описувати термінами її фізичного стану (газоподібна, рідка або тверда). У разі необхідності матеріали можна додатково розділити на гомогенні і гетерогенні.

Інший підхід до опису поняття проба – характеристика проб, що доставляються в лабораторію і залежать від плану відбору проб. За цими ознаками проби поділяють на чотири види:

- представницькі;
- селективні;
- випадкові (рандомізовані);
- композитні (об'єднані) проби.

Представницька проба – проба є типовим зразком вихідного матеріалу при контролі певних його характеристик. *Слід уважно підходити до вибору характеристики, що представляє інтерес для аналітика. Можливо, проба буде представницькою і придатною для аналізу при масовій частці аналіту на рівні 5% (тобто 5 частин на 100), однак виявиться непридатною, якщо аналіт присутній на рівні 5 мг/кг (тобто 5 частин на мільйон). Крім того, важливо знати і розуміти метод аналізу, який буде використовуватися.*

Для отримання адекватної представницької проби слід брати до уваги стан вихідного матеріалу, який ми повинні досліджувати. Існує чотири типи систем.

Гомогенні – однорідна проба, хімічний склад і фізичні властивості якої у всіх частинах однакові або змінюються безперервно, без коливань (між частинами системи немає поверхневих розділень). Складові частини гомогенної проби неможна відділити одна від одної механічним шляхом. Наприклад, рослинна олія при 40 °С (при даній температурі олія знаходиться в рідкому стані); фільтрований водний розчин.

Гетерогенні – неоднорідна проба, яка складається із однорідних частин (фаз), які можуть відрізнитися одна від одної за складом і властивостями. Наприклад, пальмова олія при 15 °С (температура нижче точки плавлення пальмової олії); проба пластівців для сніданку (наприклад, мюслі).

Статична (замкнута) система – склад вихідного матеріалу залишається постійним по відношенню до положення в просторі і стабільним протягом часу, необхідного для відбору проб і дослідження. Можна навести безліч прикладів систем такого типу: олія в бочках; консервовані фрукти на товарному складі.

Динамічна система – в цьому випадку вихідний матеріал змінюється з плином часу. При відборі частини проби в будь-якому випадку виходить лише «моментальний знімок» стану системи в певний момент часу в певній точці простору. Цей результат неможливо відтворити, що викликає труднощі при статистичному контролі, внаслідок чого для даної системи не застосовують звичайні плани вибіркового контролю. Приклади: насичені і ненасичені олії при безперервному змішуванні; вода з естуарію, де солоність води змінюється з плином часу.

Селективна проба – пробу продумано відбирають згідно з планом відбору проб, мета якого – відбір та відстеження матеріалів з певними характеристиками. Відбір проби такого виду називають ще *спрямованим* або *сфокусованим* відбором.

Наприклад, при аналізі харчових продуктів може виникнути необхідність обмежити певну ділянку зіпсованого матеріалу лота, який не змішаний з доброякісним матеріалом:

- забруднення борошна продуктами життєдіяльності гризунів – шерстю або сечею;

- наявність у повітрі промислової зони токсичних газів, причому загальний рівень концентрації газів, можливо, є прийнятним, однак проба, відібрана в певному місці, може містити речовини в небезпечній концентрації.

Рандомізована (випадкова) проба – проба, взята за схемою випадкового відбору, дозволяє уникнути систематичної похибки при відборі проб і створити основу для статистичної інтерпретації результатів вимірювань. Три варіанти процесу відбору проб дозволяють отримати різні види рандомізованих проб.

Простий рандомізований (випадковий) відбір проб полягає у відборі точкових проб сипучого матеріалу таким чином, що вірогідність відбору будь-якої порції з об'ємистого матеріалу була однаковою. До такого виду вибору вдаються при недостатній кількості інформації про матеріал, який досліджують. Крім того, цей спосіб звичайно застосовують при відборі проб з товарної або транспортної партії промислового продукту для контролю якості.

Стратифікований рандомізований (випадковий) відбір проб передбачає поділ партії матеріалу на групи (страти) за попередньо визначеними критеріями. Потім у кожній страті проводять відбір проб за планом простої випадкової вибірки. Кількість проб, що відбираються в кожній страті, пропорційне її розміру (вага або об'єм). Мета стратифікованого відбору – підготовка зразка більш представницького порівняно зі зразком, який одержується при простому рандомізованому відборі.

Систематичний відбір проб – один з найбільш загальноприйнятих методів відбору проб. Він полягає у відборі точкових (миттєвих) проб з об'ємистого сипучого матеріалу через попередньо визначені інтервали згідно плану вибіркового контролю. Першу пробу вибирають випадково, а наступні проби відбирають згідно з попередньо розробленою схемою, наприклад, в кожній 5-й, 10-й точці інтервалу або в інших точках, за необхідністю.

При рандомізованому відборі всі проби, відібрані вищеписаними способами, мають рівні шанси опинитися вибраними, таким чином вдається уникнути систематичної похибки. Слід відзначити,

що рандомізована проба може бути одночасно і представницькою пробою – це залежить від природи матеріалу, частину якого беруть для аналізу.

Композитна (об'єднана) проба – відбір композитної (збірної) проби – спосіб зниження вартості робіт при необхідності аналізу великої кількості проб. Композитна проба складається з двох або більше частин матеріалу (відібраних одночасно), обраних таким чином, щоб представляти досліджуваний матеріал в цілому. Співвідношення компонентів композитної проби можна визначати, виходячи з параметрів маси (об'єму), часу або потоку. Компоненти композитної проби відбирають пропорційно кількості матеріалу, який вони представляють. Такий тип пробовідбору може виявитися прийнятним при проведенні експертизи продуктів харчування.

5.2.3. Суть і значення планів відбору проб

Відбір проб завжди проводиться з певною метою, і дана мета до деякої міри визначає процедуру відбору проби:

- Консервовані продукти харчування досліджують з метою перевірки герметичності банок, однорідності вмісту та виявлення шкідливих домішок.

- Зернові культури необхідно перевіряти протягом періоду росту для оцінки рівня вмісту пестицидів.

- Фармацевтичні продукти досліджують для визначення концентрації активних компонентів і побудови фармакокінетичних кривих.

- Проби харчових продуктів відбирають відповідно до нормативних документів для визначення відповідності продуктів вимогам, заявленим на етикетці або гігієнічних норм для споживачів.

Необхідно розробити план відбору проб, який визначає коли, де і як повинні відбиратися проби. *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC) дає наступне визначення поняття «план відбору проб»:

IUPAC – Міжнародний союз фундаментальної та прикладної хімії.

«Попередньо розроблена процедура відбору, вилучення, зберігання, транспортування і підготовки частин матеріалу для відділення їх від загальної маси в якості проб».

Із визначення видно, що план відбору проб має охоплювати всі аспекти процесу відбору, включаючи:

- кількість;
- локалізацію і розмір відібраних проб;
- інструкції формування композитних проб;
- ступеня подрібнення взятих частин матеріалу при приготуван-ні лабораторної проби;
- чи слід відбирати пробу один раз, або ж цей процес має повторюватися, і якщо так, то з якою частотою? Відповідь на це питання теж повинно міститися в плані відбору проб.

Якщо існують нормативні вимоги до аналізу, план вибіркового контролю називають схемою відбору проб або розкладом відбору проб. Термін «програма відбору проб» часто використовують для опису комбінації процедур, що поєднує кілька взаємопов'язаних схем відбору проб.

Обов'язковий план відбору проб можна скласти на підставі національних і міжнародних стандартів або відповідних документів.

Вказівками можуть бути загальні вказівки з відбору проб Комісії Codex Alimentarius, методики відбору проб за моніторингу якості води (наприклад, ISO 5667-1), методики відбору проб при контролі якості за якісними ознаками (серії стандартів ISO 2859) і методики відбору проб при контролі якості за кількісними показниками (ISO 3951).

5.2.4. Нормативні і юридичні вимоги

Існують інструкції зі складання схем відбору проб для ряду матеріалів, таких як добрива або харчові продукти. Діють Директиви ЄС, зв'язані з вибірковою контролем, наприклад, відбір проб фруктів і овочів при дослідженні на вміст залишкових пестицидів і визначенні слідів елементів у добривах. На міжнародному рівні Комісія Codex Alimentarius має певні схеми відбору проб, наприк-

лад, відбору проб харчових продуктів при визначенні залишків пестицидів. Вам слід ознайомитися з усіма нормативами, що відносяться до області, в якій ви працюєте.

Ви завжди повинні задавати питання: «Як будуть використані результати аналізу?» Якщо ви відбираєте проби для визначення відповідності вимогам контракту, тобто проба повинна містити мінімальну / максимальну кількість аналіту, то важливо знати, як будуть інтерпретовані дані під час написання висновку документу. Комісія Codex Alimentarius рекомендує наступні величини граничного вмісту елементів в харчовій солі:

- миш'як – не більше 0,5 мг/кг;
- мідь – не більше 2 мг/кг;
- олово – не більше 2 мг/кг.

Необхідно розуміти, що це означає: «Вміст в окремих зразках лота не повинно перевищувати ...» або ж «Середній вміст, розрахований по безлічі зразків, не повинен перевищувати ...».

Крім того, вам потрібно знати, чи виконані вимоги нормативних документів, якщо:

а) проба подрібненого сипучого матеріалу сформована з окремих точкових проб;

або

б) кожна точкова проба проаналізована окремо, а потім розрахована середня величина результатів.

Ці інтерпретації передбачають різні підходи. Зауважимо, що змішування матеріалу зразків перед аналізом (тобто усереднення результатів, отриманих при аналізі безлічі різних зразків) може призвести до того, що будуть пропущені «гарячі точки» – ділянки з підвищеною концентрацією аналіту в матеріалі. Це важливо, якщо метою аналізу є дослідження забруднення, яке може бути присутнім тільки в окремих зразках матеріалу.

В окремих випадках максимально допустимий вміст аналіту може бути зафіксовано юридично, тобто у встановлених законом граничних нормативах. Для цих ситуацій, можливо, викладені стандартні методики відбору проб. Наприклад, згідно Codex Alimentarius максимально допустима межа залишкового пестициду

циперметрину як у цитрусових фруктах, так і в персиках, становить 2 мг/кг.

Щоб правильно підготувати пробу для аналізу, ви повинні знати, що при аналізі цитрусових необхідно використовувати цілі фрукти – шкірку, серцевину, зерна, м'якоть і сік, в той час як при аналізі персиків беруть фрукт з видаленою плодоніжкою і кісточкою, проте залишковий вміст пестициду розраховують і виражають відносно цілісного об'єкту (включаючи кісточку), виключаючи плодоніжку. У деяких випадках виникає необхідність відбору певної кількості проб, який проводиться у присутності свідків.

5.2.5. Види відбору проб

Вірогідна вибірка

Рандомізований (випадковий) відбір проб дозволяє проводити статистичну оцінку результатів. Він необхідний, коли потрібно отримати представницьку пробу.

Невипадковий (направлений) відбір.

До цього виду відбору вдаються, коли неможливо відібрати представницьку пробу. Цей підхід відбору є правильним, якщо необхідно отримати селективну пробу. Існує три основних стратегії не випадкового відбору проб.

Умисний (недостатньо випадковий) відбір – вимагає володіти інформацією про досліджуваний матеріал при відборі специфічних зразків.

Пропорційний (квотний) відбір вимагає поділу транспортної партії на групи. Після того, як матеріал розділили на групи, проби з кожної групи відбирають за правилами умисної (не зовсім випадкової) вибірки.

Зручний відбір – передбачає відбір проб на підставі доступності та досяжності.

Відбір проб об'ємистих матеріалів

Цей спосіб відбору проб полягає у взятті проби з матеріалу, який не перебуває з дискретних, ідентифікованих або постійних одиницях. Об'ємистий матеріал може бути газоподібним, рідким або твердим.

Відбір проб для приймального контролю

Відбір проб для приймального контролю передбачає наявність заздалегідь складеного плану відбору проб для визначення відповідності партії товару певним приймальним критеріям. Основна мета відбору проб для приймального контролю – продемонструвати замовникові, що він отримає товар необхідної якості. При цьому слід пам'ятати, що фінансові ресурси обмежені, і вартість одиниці продукту повинна відображати вартість інспекції, так само, як і вартість виробництва товару.

Вибірковий приймальний контроль здійснюють за якісними або за кількісними показниками. При приймальному контролі за якісними ознаками зразок товару у товарній партії визнається відповідним або невідповідним за якістю. Кількість невідповідностей в партії підраховують і, у разі якщо їх кількість досягає певної величини, партію товару відхиляють. При приймальному контролі за кількісними показниками цікаву для дослідника характеристику вимірюють за числовою шкалою. Якщо середня величина, яка вимірюється відповідає встановленому значенню, відхиленню і потрапляє в допустимий інтервал для стандартного відхилення, то партію товару беруть.

Для ілюстрації відмінності між двома видами планів вибіркового контролю розглянемо приклад. Кукурудзяні пластівці продають у пакетах вагою по 500 г. При приймальному контролі за якісними ознаками всі пакети, вага яких становить 500 г і більше, проходять контроль, а пакети вагою менше 500 г відбраковують. Якщо число відбракованих одиниць не перевищує встановленого значення, то вся партія товару приймається.

Якщо приймальний контроль проводять за кількісними показниками, пакети зважують, реальні ваги усереднюють і розраховують стандартне відхилення величин. Якщо середня величина

відповідає заявленій середній вазі або перевищує його, а значення стандартного відхилення не вказує на значне не доваження, партію товару беруть.

5.2.6. Кількість проб і розмір проби

У плані відбору проб повинні бути детально викладені вимоги, пов'язані з кількістю та розміром первинних проб, які необхідно відібрати з лоту/партії товару. Крім того, план повинен містити опис процедури приготування лабораторної проби. Можливо, аналітик далекий від цих проблем, проте він повинен розуміти, наскільки ці моменти впливають на достовірність результатів будь-якого аналізу.

Більшість хімічних аналізів є деструктивними, і дослідженню не вдається піддати весь матеріал. У будь-якому випадку, це буде не надто ефективно з точки зору витрат. Може виникнути проблема з отриманням представницької проби об'ємистого матеріалу, про який відомо, що він не є гомогенним. План вибіркового контролю повинен бути складений так, щоб можна було дослідити ступінь гомогенності матеріалу.

Якщо метод аналізу пройшов валідацію для аналізу 1 г матеріалу, але в розпорядженні аналітика тільки 100 мг, слід перевірити, чи є метод досить стійким при зменшенні кількості досліджуваного матеріалу. Це необхідно з'ясувати до початку аналітичної роботи, тобто метод має пройти валідацію для аналізу 100 мг матеріалу. Навіть якщо метод аналізу визнаний досить стійким, зменшення масштабу аналізу є можливим лише в тому випадку, коли зменшена проба залишається представницькою в прийнятних межах. Це залежить від ступеню однорідності матеріалу.

Якщо відбір проб проводиться поза лабораторією, аналітик повинен бути проінформований про розмір і кількість аналітичних проб, які належить відібрати з лабораторної проби безпосередньо для аналізу.

Слід з обережністю використовувати термін «об'єм вибірки» (sample size) і завжди знати контекст, в якому його застосовують. Термін «об'єм вибірки» іноді відноситься до кількості проб, що

відбираються з більшого об'єму матеріалу, наприклад з лота або партії продукту. «Об'єм вибірки» – статистичний термін, який застосовується для опису кількості «одиниць», які вибрані з більшої сукупності. Це повинно бути відображено в плані відбору проб. Тим не менш, в лабораторії аналітик може вжити вираз *sample size* для позначення кількості матеріалу, робочої проби або наважки. Обидва значення терміна важливі, і їх слід вживати з розумінням при аналізі процесу відбору проб, незважаючи на те, що вищезазначений процес часто проходить без участі аналітика. Щоб уникнути змішувань понять, користуються певною термінологією, наприклад, такими термінами як об'єм робочої проби, величина наважки, кількість первинних проб і т. д.

5.2.7. Невизначеність відбору проби

Для того, щоб визначити, яку кількість проб нам потрібно, необхідно врахувати всі джерела невизначеності кінцевого результату. Розглянемо невизначеність, що виникає при відборі проб. Тут необхідно використовувати кілька термінів з математичної статистики, а саме: стандартне відхилення (s) і дисперсія (s^2).

Сумарна дисперсія кінцевого результату s^2_{total} являє собою суму двох доданків. Перший доданок виникає внаслідок варіацій складу лабораторних проб (природні властивості відібраного матеріалу) і діапазону, обумовленого методикою, що застосовується у відборі проб s^2_{sample} . Інший доданок $s^2_{analysis}$ виникає внаслідок похибок аналізу проби, проведеного в лабораторії:

$$s^2_{total} = s^2_{sample} + s^2_{analysis} .$$

Аналітичну дисперсію ($s^2_{analysis}$) можна визначити шляхом проведення повторних вимірювань проб, які достовірно є гомогенними. Потім можна розрахувати сумарну дисперсію. Для цього потрібно взяти, як мінімум, сім лабораторних проб і проаналізувати кожну з них (зауважимо, що величина s^2_{sample} характеризує невизначеність, пов'язану з приготуванням лабораторної проби, в той час як $s^2_{analysis}$ включає невизначеності, пов'язані з усіма операціями з

обробки проби в лабораторії, які необхідні для приготування робочої проби). Розраховують дисперсію отриманих результатів. Розрахована величина являє собою s^2_{total} , оскільки включає дисперсію, обумовлену аналітичним процесом, плюс всі додаткові дисперсії, що визначаються методикою відбору проби при підготовці лабораторної проби і розподілом аналізу у сипучому матеріалі.

Величина дисперсії, обумовлена відбором проби, дорівнює

$$s^2_{sample} = s^2_{total} + s^2_{analysis} .$$

5.2.8. Кількість первинних проб

У кожній області діяльності існують особливі вимоги до кількості первинних проб, які необхідно відібрати для аналізу. Для визначення кількості проб з кожного лоту користувалися простими емпіричними правилами, у тому числі формулами $n = \sqrt{N}$ і $n = 3 \times \sqrt[3]{N}$ (n – кількість проб; N – загальна кількість одиниць у лоті). В обох випадках n округлюють до цілого числа.

У планах відбору проб для різних сфер діяльності вказується кількість проб, які слід відбирати з лоту.

5.3. ВАЛІДАЦІЇ АНАЛІТИЧНИХ МЕТОДИК ТА ПРАВИЛЬНІСТЬ ПРОВЕДЕННЯ ВИМІРЮВАНЬ

Згідно з міжнародним стандартом ISO / ІЕС 17025, «валідація методики» – це «підтвердження шляхом дослідження та подання об'єктивних доказів того, що конкретні вимоги до специфічного цільового використання (методики) виконуються». Це означає, що за допомогою методики, що пройшла валідацію, при правильному її застосуванні можна отримувати результати, прийнятні для особи, що приймає рішення на їх підставі. При цьому потрібне глибоке розуміння, для чого потрібні були аналітичні результати, і яким має бути якість наданих результатів, тобто яка невизначеність вимірювань. Це визначає вимоги до робочих характеристик методики. Процес валідації методики являє собою ряд запланованих експериментів, в ході яких визначають її робочі характеристики. У процесі валідації методики зазвичай оцінюють наступні характеристики: вибірковість; прецизійність; повернення; лінійність в робочому діапазоні; межа виявлення; межа визначення, градування і стійкість методики.

Схема процесу валідації представлена на рис. 5.4.

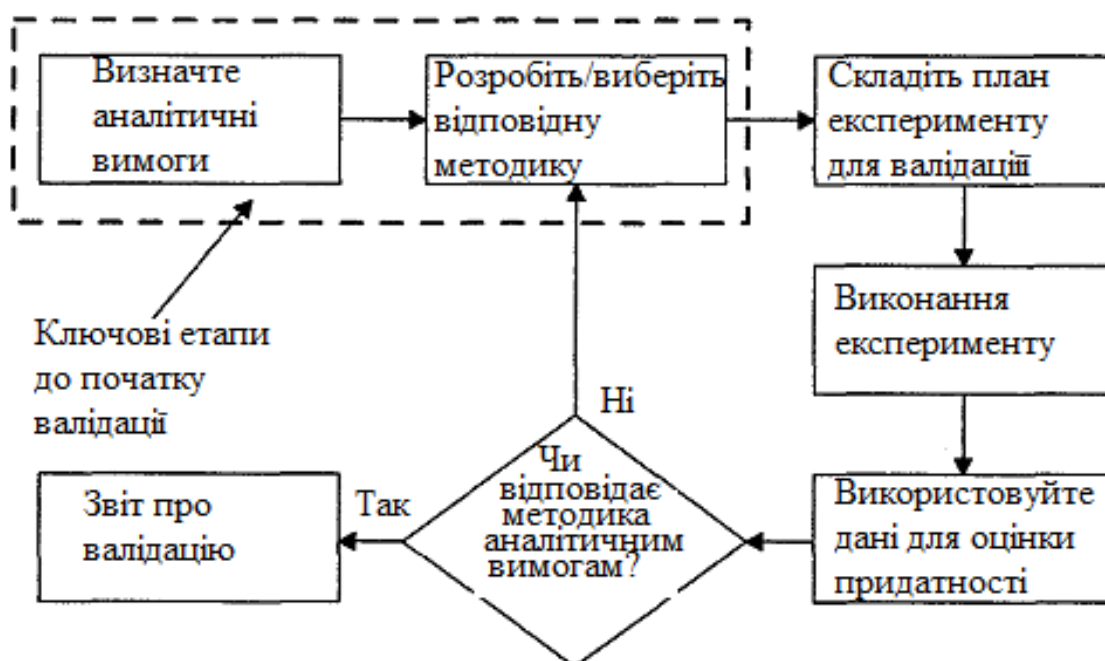


Рис. 5.4. Схема процесу валідації методики

Якщо для необхідного аналізу не існує адекватної методики, то слід адаптувати існуючу методику або розробити нову. Адаптована або знову розроблена методика потребує оптимізації визначення робочих характеристик, для підтвердження того, що методику можна використовувати для рутинних лабораторних аналізів. Потім збирають свідчення, необхідні для демонстрації відповідності методики заданій меті. Рівень валідації, тобто необхідний масштаб експерименту (кількість дослідів), залежить від конкретної проблеми та об'єму доступної інформації.

На рис. 5.5 представлені підходи до проблеми, якими можна скористатися для прийняття рішення про необхідний рівень валідації. Якщо методика опублікована і відомі її робочі характеристики, лабораторія повинна лише підтвердити свою здатність досягти зазначених в методиці робочих характеристик. Важливі параметри, такі як селективність, повернення і робочий діапазон, необхідно перевіряти. Якщо отримана інформація є задовільною, методику можна з упевненістю застосовувати на практиці. Така обмежена валідація, де всі процедури спрямовані на підтвердження опублікованих встановлених характеристик, називається *верифікацією*.

Можливість тривалого постійного ефективного застосування методики необхідно перевірити за допомогою відповідних процедур контролю. Якщо стандартна методика вважається невідповідною (наприклад, стара методика, що не пройшла повної валідації, застосовується для проведення важливого дослідження; або ж ситуація, коли дані валідації, які застосовувалися лише до певної проби, в той час як доводиться працювати з проблематичними пробами), буде потрібна додаткова перевірка її на придатність. Лабораторія повинна, як мінімум, продемонструвати здатність відповідати нормативам, викладеним у специфікації вимог до вимірювань.

У кінцевому рахунку, об'єм проведених валідаційних досліджень повинен забезпечити впевненість відповідності методики заданій меті, з урахуванням ризику, прийнятого як для лабораторії, так і для замовника. Наприклад, при проведенні дуже важливо-

го вимірювання необхідно ретельним чином провести процедуру валідації методики – іншого шляху просто немає.

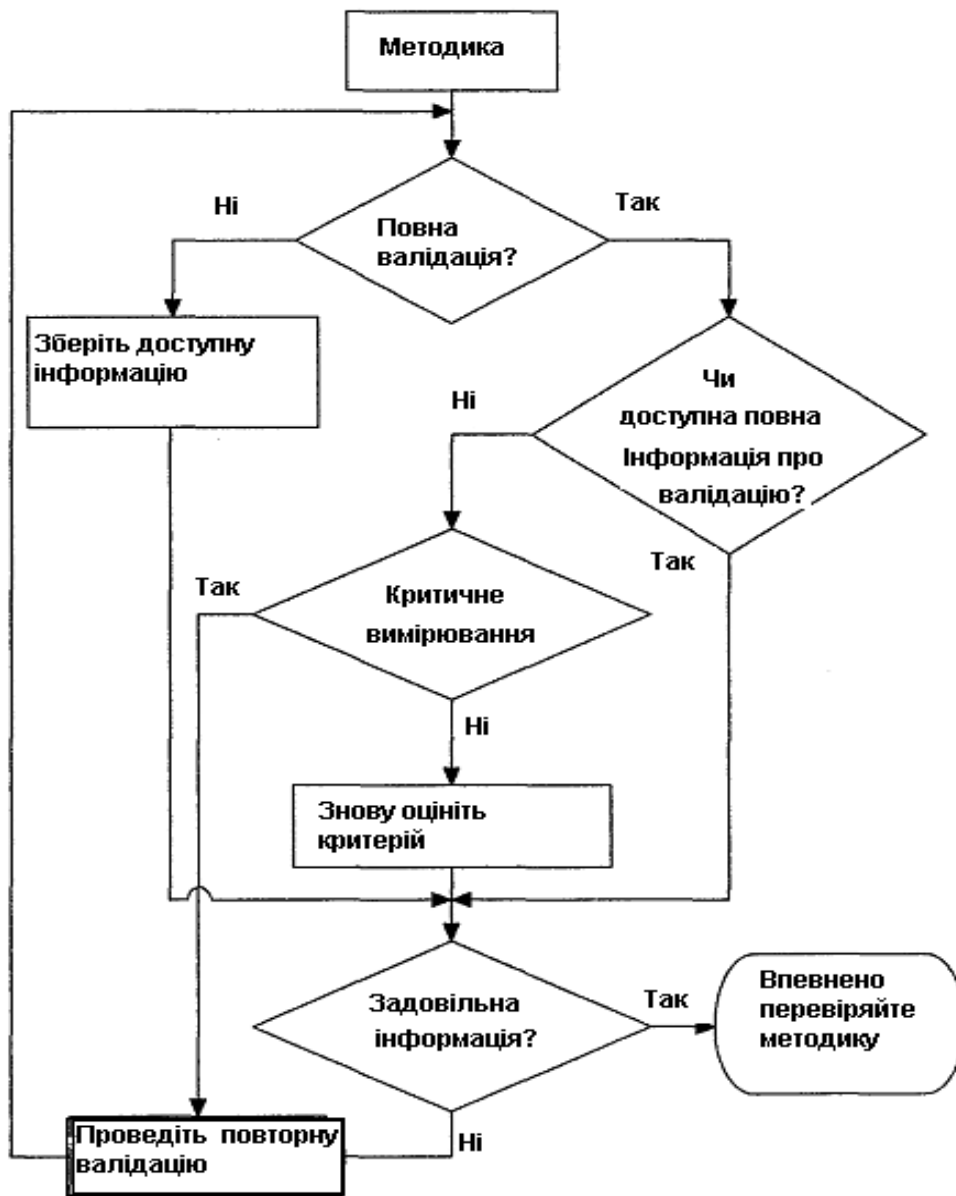


Рис. 5.5. Визначення необхідного рівня валідації – схема вибору

Слід відзначити, що необхідний рівень валідації залежить від можливого ризику для лабораторії та замовника у разі надання помилкових даних.

З плином часу настає момент, коли потрібна модифікація методики, оскільки в лабораторії відбуваються зміни політики закупівель, наприклад, зміна постачальника реагентів, або ж модифікація з метою забезпечення прийнятності методики для дещо іншого застосування, наприклад, при розширенні робочого інтервалу концентрацій. У таких ситуаціях не потрібна валідація за повною процедурою; необхідно провести перевірку з використанням раніше проаналізованих проб або матеріалів порівняння з аналогічною матрицею. Потрібно перевірити такі параметри, як межу виявлення, прецизійність, повернення та лінійність. Можливо, буде необхідність замінити один метод іншим, наприклад, перейти від GC-FID до GC-MS. У цьому випадку слід продемонструвати, що результати, отримані за новою методикою, відповідають результатам, отриманим за загальноприйнятими методами. Кращий підхід у даній ситуації – «парні порівняння». Проби поділяють на дві партії; першу партію аналізують старою методикою, а іншу – із застосуванням нової методики. Потім результати піддають статистичному аналізу.

Якщо немає даних валідації методики, то всі відповідні параметри необхідно досліджувати. Ступінь ретельності, з якою проводиться дослідження, залежить від таких моментів як «критичність» (важливість) вимірювання та доступність даних з валідації аналогічних методик. Часто в лабораторії, тривалий час використовують певну методику із задовільними результатами, але з відсутністю документації, яка підтверджує робочі характеристики методики. Здавалося б, немає потреби вимагати повної повторної валідації методики, яка успішно працює протягом кількох років. Однак необхідність об'єктивних свідчень не дозволяє приймати на віру достовірність даної методики вимірювань. Можлива послідовність дій представлена нижче.

- Вивчіть доступну інформацію, включаючи інформацію з контрольних карт; характеристики, отримані на етапах програми перевірки кваліфікації; літературу та інформацію з валідації споріднених методик, а також дані порівняння з іншими методиками. Скористайтеся доступною інформацією і професійними оцінками при розгляді кожного істотного пункту процедури

валідації, а також підписання і здачі відповідним чином оформлених і документованих звітів.

- Визначте істотні моменти, що вимагають подальшої уваги і надайте інформацію, якої не вистачає. Якщо достовірність методики не викликає серйозних сумнівів, можна продовжувати нею користуватися. Однак, по закінченню обґрунтованого періоду роботи методики, повинна бути надана нова інформація за результатами валідаційних досліджень, що включає експериментальні дані і професійні думки.

Важливо, щоб будь-яка з обраних методик мала розумне наукове обґрунтування в умовах, де вона буде застосовуватися. Крім того, необхідно продемонструвати, що обладнання, яке належить використовувати в роботі, придатне і негативно не вплине на результати дослідження. Це відноситься до всіх типів обладнання. Демонстрація можливостей обладнання називається «перевіркою придатності обладнання». Персонал, що виконує валідаційні дослідження, повинен бути достатньо кваліфікованим і компетентним для виконання покладених на нього обов'язків.

У список включаються процеси, що визначають значення робочих характеристик приладу і контрольні перевірки якості. Важливі робочі характеристики представлені в табл. 5.1, яке нагадує складання пазлу. Чим більше фрагментів потрапляє на свої місця, тим ясніше стає картина. Різниця в тому, що при валідації методики не завжди необхідно використовувати всі фрагменти. У табл. 5.1 відображені чотири різних ситуації, що вимагають дослідження різних параметрів. Важливим є те, щоб процедура була спланована, інакше вона може стати дуже громіздкою і неефективною. Перед тим, як приступати до планування процедури валідації методики, слід володіти термінами статистики та статистичними розрахунками.

Слід звернути увагу, що в табл. 5.1 відсутній рядок «Відбір проб». Незважаючи на те, що відбір проб є важливим моментом аналітичної роботи, він не включений до процедури валідації методики. Передбачається, що в розпорядженні аналітика є достатня кількість матеріалу проби, і що методика проходить

валідацію з використанням матеріалів, що володіють аналогічними або дуже близькими хімічними і фізичними властивостями.

Таблиця 5.1. – Робочі характеристики, необхідні для валідації при різних видах аналізу

Параметр	Тип аналізу			
	Кількісний	Основний компонент	Аналіз слідів	Фізичні властивості
Вибірковість/специфічність	+	+	+	+
Лінійність/робочий діапазон		+	+	+
Межа виявлення	+		+	
Межа кількісного визначення			+	
Повернення/вилучення		+	+	+
Прецизійність		+	+	+
Стійкість	+	+	+	+

Є ще два параметри, що характеризують результати валідації, але не є частиною процедури. Це невизначеність вимірювань і метрологічна простежуваність. Якщо врахувати ці моменти на етапі планування процедури валідації методики, то інформація, отримана в ході валідації, буде цінним внеском в оцінку невизначеності вимірювань. Простежуваність залежить від робочих процедур при реалізації методики і матеріалів, які застосовуються.

5.3.1. Селективність

При розробці методики необхідно довести, що за допомогою відповідної методики вимірюється вміст аналіту, який нас цікавить. Одним із завдань валідації методики є підтвердження визначення вмісту певного аналіту. Тобто, можливість методу однозначно виявляти і визначати конкретний аналіт в присутності інших супутніх компонентів називають *селективністю* або *специфічністю*. У деяких областях діяльності ці терміни взаємозамінні, і це

може викликати непорозуміння. *Селективність* – термін, рекомендований для застосування в галузі аналітичної хімії, що відображає ступінь можливості застосування даного методу для визначення аналітів у зазначених умовах у присутності сполук з аналогічними властивостями. Селективність підвищується при вимірюванні унікальних для даного матеріалу характеристик, наприклад, поглинання на певній довжині хвилі або при відділенні аналіту від інших речовин, присутніх у пробі.

При розробці методики селективності необхідно приділяти належну увагу. Тому, стандартні зразки з добавками потенційно заважаючих речовин порівнюють з сумішами відомого складу, які аналогічні за складом до реальних проб. Серйозні перешкоди необхідно усувати, менш значними перешкодами можна знехтувати, включивши їх вплив у повернення методики і зв'язану з нею невизначеність вимірювання.

Якщо при аналізі складних проб виникають сумніви в придатності методики чітко ідентифікувати аналіт і виміряти його вміст, то необхідно проводити перевірку методики використавши матеріал порівняння з близькою за складом матрицею або проаналізувати пробу альтернативною методикою, що пройшла валідацію.

5.3.2. Діапазон вимірювань

У процесі валідації встановлюють співвідношення між аналітичним сигналом і концентрацією речовини, яка досліджується. Слід також переконатися в тому, що калібрувальна крива в інтервалі лінійності методики не вносить надмірно великої невизначеності вимірювання (невизначеність за рахунок калібрування повинна бути приблизно на 20 % меншою невизначеності, яка вноситься самим значним компонентом). Крім того, потрібно побудувати калібрувальний графік, який знадобиться при рутинному використанні досліджуваної методики. Було б розумно провести перевірку деяких (або всіх) нижчеперелічених параметрів для того, щоб переконатися в тому, що вони не виходять за рамки меж, встановлених нормативами.

Чутливість – швидкість зміни сигналу вимірювального інструменту при зміні концентрації. Параметр можна наочно представити як кут нахилу калібрувальної кривої. Справді, чим більша чутливість, тим більша здатність методики розрізняти близькі концентрації, оскільки невелика різниця концентрацій призведе до значної зміни спостережуваного аналітичного сигналу (відгуку). Чутливість може змінюватися при зміні концентрацій, як показано на рис. 5.6., проте часто лінійність калібрувальної кривої зберігається в широкому діапазоні концентрацій.

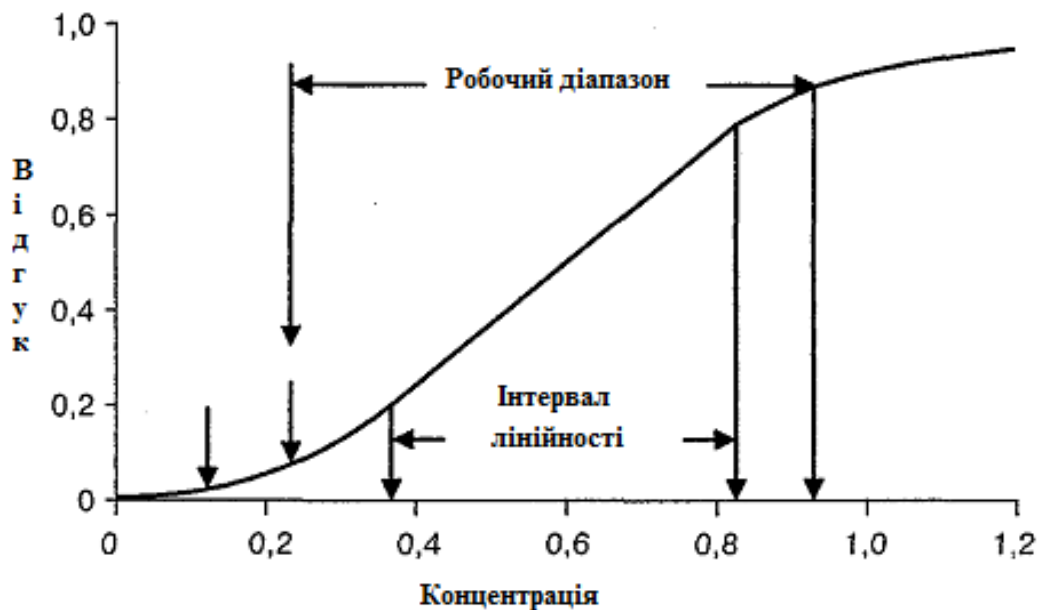


Рис. 5.6. Калібрувальна крива і деякі ключові робочі характеристики

Лінійність і *робочий діапазон* методики визначають шляхом аналізу проб з різними концентраціями аналіту для визначення діапазону концентрацій, в якому зберігається лінійність калібрувальної кривої і прийнятна невизначеність вимірювання. Лінійність можна оцінити шляхом візуального аналізу калібрувальної залежності виміряних значень аналітичного сигналу (відгуку) від відомої концентрації або статистичними методами. Для визнання методики придатною для застосування не обов'язкова ідеальна лінійність калібрувальної кривої. Досить вивести рівняння, що зв'яже

аналітичний сигнал (відгук) з концентрацією – ця залежність називається калібрувальною функцією. *Робочий діапазон* – це область з прийнятною невизначеністю результатів. Він може бути ширше, ніж інтервал лінійності калібрувальної функції. Нижня область робочого діапазону обмежується межею кількісного визначення (LoQ), а верхня область закінчується там, де зміна концентрації викликає недостатню зміну аналітичного сигналу (відгуку), як показано на рис. 5.6.

Для вимірювань, призначених для виявлення аналіту або виявлення його відсутності, порогову детектуючу концентрацію можна визначити за результатами паралельних вимірювань у всьому робочому діапазоні концентрацій. Ці дані дозволяють визначити концентрацію, відповідну точці відсікання – момент переходу від достовірного детектування до відсутності детектування. На кожному рівні концентрації необхідно провести близько 10 вимірювань. Положення точки відсікання залежить від прийнятної кількості помилкових негативних результатів. З таблиці 5.2. видно, що в розглянутому прикладі позитивна ідентифікація аналіту не є надійною при концентраціях нижче 100 мкг/г.

Таблиця 5.2. Відгуки в 10 паралельних аналізах за різних рівнів концентрацій

Концентрація (мкг/г)	Виявлено / не виявлено
200	10/00
100	10/00
75	5/50
50	1/90
25	0/10
0	0/10

Перевірка лінійності

Лінійність є мірою здатності методики видавати аналітичний сигнал, прямо пропорційний концентрації аналіту в пробі. Іноді потрібна певна обробка аналітичного сигналу (через математичну функцію) перед оцінкою лінійності. Кількісна оцінка лінійності

може бути отримана різними статистичними методами за даними, які описуються лінійною та вищими функціями.

Визначення лінійності зазвичай вимагає більшої кількості стандартів (і більшої кількості паралельних вимірювань для кожної концентрації), ніж для звичайної калібровки при регулярному використанні методики, що пройшла валідацію. Зауважимо, що при встановленні лінійності немає необхідності в незалежному приготуванні розчинів відомої концентрації. Лінійність повинна існувати в межах, визначених для даної методики концентрацій аналіту і матриці, і охоплювати діапазон концентрацій, який перевищує очікуваний діапазон концентрацій у пробах, наприклад, на $\pm 20\%$.

Для забезпечення достовірної оцінки лінійності проводять дослідження.

- Розподіліть значення концентрацій (x) калібрувальних розчинів рівномірно у всьому досліджуваному діапазоні. Одне або два значення на кінцях діапазону називають «важелями» («leverage») прямої.

- Дослідіть не менше 6 рівнів концентрацій. Проводьте вимірювання у випадковому порядку.

- На кожному рівні проводите від 2 до 6 паралельних вимірювань.

- Переконайтеся в тому, що значення аналітичного сигналу (відгуки) при аналізі проб близькі до середніх значень відгуку, \bar{y} , калібрувального набору. Це зменшить внесок у похибку оцінки лінії регресії за методом найменших квадратів.

- Для оцінки лінійності інструментального відгуку можна використовувати чисті речовини.

- Для визначення діапазону лінійності методики слід використовувати сертифіковані стандартні зразки або зразки з внесеними добавками з аналогічною матрицею.

- Оцініть лінійність візуальним аналізом графіка залежності відгуку від концентрації.

- Перевірте наявність викидів (різко виділених результатів). Якщо ви виявили результати, що викликають підозру, перевірте за допомогою статистичних тестів, наприклад, тесту Діксона або

критерію Граббса. Не відсівайте викиди просто на підставі статистики.

- Можна використовувати й інші статистичні параметри, включаючи аналіз залишків і дисперсійний аналіз. Аналіз може вказати на необхідності перевірки функції нелінійного відгуку.

Детальний розгляд питання про оцінку лінійності виходить за рамки цієї книги, проте кілька загальних зауважень викладено нижче. Важливо встановити однорідність дисперсії («гомоскедастичність») методики у всьому робочому діапазоні. Це можна зробити, виконавши по 10 паралельних вимірювань в крайніх областях діапазону. Розрахувати дисперсію в кожній групі результатів і провести статистичне випробування (F-тест), щоб перевірити, чи значна статистична відмінність між цими двома дисперсіями.

Спочатку лінійність оцінюють шляхом візуального аналізу з нанесенням на графік даних, а потім проводять статистичну оцінку. Лінійність сигналу приладу необхідно встановлювати, оскільки без цієї інформації важко виявляти причини нелінійності. Додаткові статистичні параметри включають коефіцієнт кореляції (r , r^2 і т. д.), графік залишків, стандартне відхилення залишків і критерії значимості для кута нахилу графіка і точки перетину з осями координат. Слід пам'ятати, що коефіцієнт кореляції r не є мірою лінійності – він просто вказує на ступінь зв'язку між залежними і незалежними змінними, наприклад, сигналом приладу і концентрацією аналіту. Важливо провести візуальний аналіз графіка залишків для перевірки трендів. Необхідно провести дослідження лінійності методики для затвердження протоколу градування при використанні даної методики в майбутньому.

5.3.3. Звіт валідації та документація

Валідацію методики проводять, щоб надати об'єктивні свідчення того, що вона придатна для зазначеного застосування. Внаслідок цього потрібна формальна оцінка валідаційної інформації на відповідність специфікації вимог до вимірювань та іншим важливим робочим параметрам методики. Незважаючи на те, що

валідація описується як послідовний процес, в реальності може знадобитися неодноразове повторення процедур для оптимізації робочих параметрів методики, наприклад, якщо робочий параметр виходить за рамки зазначених меж, необхідне уточнення методики з повторною валідацією.

При валідації методики отримують інформацію про ефективність методики, її можливості та обмеження при застосуванні для рутинного аналізу із статистичним контролем. Отриману інформацію можна використовувати для встановлення меж контролю якості «QC limits». Межі попередження та дії зазвичай встановлюються на рівні, які в два і три рази перевищують міжлабораторну відтворюваність відповідно. При регулярному використанні методики потрібно періодичне вимірювання зразків для контролю з нанесенням результатів на контрольні карти, щоб підтвердити відповідність методики вимогам статистичного контролю. *Частота перевірок у рамках контролю якості зазвичай встановлюється на рівні не менше 5 % від загальної кількості проб, які досліджуються лабораторією.* Якщо методика є новою, то частота перевірок може бути набагато більшою.

Процес валідації не може вважатися завершеним до пред'явлення докладного опису методики та записів, зроблених у ході валідаційного дослідження. Відповідальна особа повинна підписати документ про відповідність методики вимогам, тобто про її «відповідність заданій меті». Документ сприяє постійному застосуванню методики у вказаних межах з певними робочими параметрами. Це, у свою чергу, гарантує, що при використанні методики в різних лабораторіях в різний час для аналізу однієї і тієї ж речовини, результати вимірювань виявляться схожими. Крім того, документацію буде потрібно для процедур із забезпечення якості, при наглядових перевірках і підписанні контрактів.

Зміни в методиці вносять при появі нових варіантів її застосування і нових технологічних розробок. Ці зміни необхідно формально реалізувати і зафіксувати після відповідної валідації. *Періодичний аналіз методики, яка використовується лаборато-*

рією зазвичай проводиться один раз на два роки а, у разі потреби, її перегляд вважається «належною лабораторною практикою».

Система контролю документів, включає обмеження на неофіційне копіювання, необхідна для того, щоб забезпечити впевненість у тому, що лабораторія використовує затверджену методику в останній редакції. Це вимагає уваги до деталей, серед яких слід відзначити наступні: номер редакції; хто затвердив методику; хто вніс поправки; час видання; термін дії; кількість примірників і їх власники і т. д. Існує безліч форматів документації, однак стандартний формат представлений в ISO 78-2:1999; на підставі стандарту розроблені форми документів, представлені в Додаток 1 до даного розділу.

5.3.4. Організація лабораторного процесу

Організація лабораторного процесу охоплює ряд якостей, таких як акуратність, охайність, старанність, вдумливість, обережність, організованість і самодисципліна. Хімік, що володіє зазначеними якостями і застосовує їх у своїй роботі, швидше отримає правильні результати (і отримає їх з першого разу), ніж хімік, якому ці якості не властиві.

Хіміки, робота яких оцінюється доброю організацією лабораторного процесу, приступаючи до дослідження, обов'язково повинні досконально розуміти, що їм належить зробити. Вони завжди свідомо контролюють свої дії.

Переданалітична стадія

Розглянемо виробничий процес, коли ви отримали завдання: провести аналіз партії проб за допомогою вказаного методу, що пройшов попередню валідацію. Зрозуміло, ви не станете приступати до роботи негайно; спочатку слід скласти план дій, потім визначити, яке обладнання, реактиви і т. д. знадобляться для виконання роботи.

Перед тим, як приступити до роботи, хімік повинен:

- розмістити проби в певному місці;

- переконалися в наявності примірника методики в останній редакції;

- прочитати текст методики, якщо він не цілком вивчений;

- перевірити наявність всього обладнання, необхідного для аналізу, і доступність його на весь період роботи;

- переконалися, що все необхідне обладнання знаходиться в робочому стані, не забруднено і відповідним чином відкаліброване;

- спланувати послідовність роботи, а також послідовність операцій на кожній стадії.

- взяти до уваги процедуру контролю точності.

Перевірити, чи є які-небудь стадії критично важливими, чи повинна робота виконуватися без перерв, і чи є необхідність в завершенні аналізу в той же день. Наприклад, складність методу може лімітувати кількість проб, які можна обробляти одночасно.

Скласти розклад, який допоможе йому планувати роботу:

- врахувати всі правила безпеки, зв'язані з методикою та окремими реактивами;

- врахувати всі фактори, які можуть вплинути на результати, наприклад, при виконанні поточної або завершеної роботи можуть з'явитися джерела забруднення;

- починати роботу тільки при доступності витяжної шафи, лабораторної витяжки, чистого боксу або зони. Правила безпечності і можливість забруднення визначають місце проведення роботи;

- виділити місце для проведення робіт на чистому лабораторному столі, так щоб можна було вільно розмістити все необхідне обладнання;

- переконалися в наявності відповідного лабораторного одягу; як правило, досить лабораторного халата і захисних окулярів, проте при виконанні деяких методик будуть потрібні додаткові засоби захисту, наприклад, рукавички;

- оповістити весь персонал лабораторії про потенційні проблеми. Перед початком роботи підготувати рекомендації з надання першої допомоги. Там, де присутні певні загрози безпеки, можливо, буде потрібно особливий контроль;

- переконалися, що увесь необхідний посуд чистий, не пошкоджений і відповідним чином відкалібрований, якщо це необхідно. Увесь необхідний посуд потрібно приготувати до початку роботи. Слід дотримуватися обережності при митті скляного посуду та іншого обладнання; наприклад, мірний посуд не можна сушити в сушильній шафі, оскільки це може привести до систематичного спотворення і порушення калібрування;

- перевірити реактиви, стандарти та зразки порівняння, щоб переконалися в їх класі чистоти. Якщо реактиви та проби для контролю якості вимагають підготовки, це необхідно зробити заздалегідь. Якщо є запас приготовлених реактивів, слід перевірити їх придатність для використання. Всі реактиви повинні бути правильно марковані;

- планувати процедуру ліквідації відходів, наприклад, використаних проб, реактивів і забрудненого обладнання;

- планувати процедуру очищення обладнання;

- перевірити наявність свідоцтва кваліфікації фахівця, що виконує аналіз.

Аналіз

Під час роботи звертайте увагу на наступні моменти:

- врахуйте всі деталі, що відносяться до кожної проби, зробіть позначки про стан проби – дайте перехресне посилання у відповідному документі;

- перевірте температуру, при якій зберігаються проби, перед тим, як відкривати контейнери;

- проводьте процедуру відбору аналітичної проби, переконавшись, що кожна аліквота правильно маркована на кожній стадії аналізу, щоб забезпечити простежуваність до початкової проби;

- там, де обладнання (або пристосування) використовують по кілька разів для аналізу різних проб, необхідно переконалися в їх адекватному очищенні перед кожним використанням, щоб запобігти перехресному забрудненню;

- якщо в методиці не вказано інше, необхідно проводити градування в певній послідовності; якщо градування задовільне,

проведіть контроль перевірки якості (КЯ); якщо результати перевірки задовільні, приступайте до аналізу проб;

- якщо проби аналізують партіями, то, можливо, з'явиться необхідність періодичних перевірок градування та контролю якості в ході аналізу проб однієї партії;

- точно дотримуйтесь тексту методики; не піддавайтеся спокусі скоротити деякі етапи – це лише викличе проблеми і неминуче призведе до затягування аналізу;

- реєструйте спостереження, дані і незвичайні деталі при реалізації методики, відповідно до прописаних рекомендацій.

Тут важливо виділити ключову ідею; гарне планування перед початком роботи, а також акуратна і стабільна робота дозволяють звести до мінімуму кількість виникаючих проблем.

Після аналіз

Після закінчення практичної роботи приступайте до наступних дій:

- на підставі отриманих даних розрахуйте результат, звертаючи увагу на явні помилки – не відповідають значення результатів вимірювань паралельних проб, позитивні результати там, де слід очікувати негативних і т. д.;

- перевірте наявність помилок при переписуванні і помилок у розрахунках. Найчастіше цю роботу замість безпосереднього виконавця краще виконає інша людина. Перевіряючий не повинен в обов'язковому порядку бути старшим за посадою, однак він повинен розуміти принципи, що лежать в основі роботи, перевірку якої він виконує. Якщо ви працюєте в складі групи аналітиків, ви можете перевіряти роботу один одного ;

- проби слід зберігати, щонайменше, до закінчення складання задовільного звіту. Пробу можна зберігати і довше, залежно від політики лабораторії, або повернути замовнику, або ж знищити. Всі акти знищення проб повинні проводитися відповідно до правил техніки безпеки, чинними в лабораторії (їх слід сформулювати відповідно до національного законодавства в галузі праці і техніки безпеки;

• ділянка лабораторії, на якій виконували роботу, а також обладнання та пристосування слід ретельно дезінфікувати, очистити і привести в порядок, підготувавши їх до виконання наступного завдання. Реактиви та хімічні стандарти з малими термінами зберігання необхідно утилізувати при дотриманні відповідних правил техніки безпеки. Висновок, який потрібно зробити виходячи з вищевикладеного, такий: на кожній стадії роботи слід проявляти максимум старання. Але навіть у цьому випадку прості помилки можуть закрастися при виконанні вимірювання. Однак це легко виявити при перехресних перевірках. Результати паралельних вимірювань, які погано збігаються, можуть виявитися ключем до ідентифікації проблем всієї вимірювальної системи. Найважливіша частина роботи – приведення в порядок робочого місця та обладнання після закінчення роботи; ви зобов'язані самостійно ліквідувати загрози безпеці, можливо, створені вами. Коротше кажучи, залиште все в такому вигляді, в якому хотіли б отримати.

Калібрування

Проведення будь-яких вимірювань полягає в порівнянні невідомої величини (наприклад, робочої проби) зі стандартом. Стандарт забезпечує зв'язок зі шкалою виміру, яка застосовується (наприклад, лінійка служить для вимірювання довжини, стандартні ваги – для вимірювання мас, чисті хімічні речовини – для визначення кількості присутньої сполуки). Це показано на рис. 5.7.

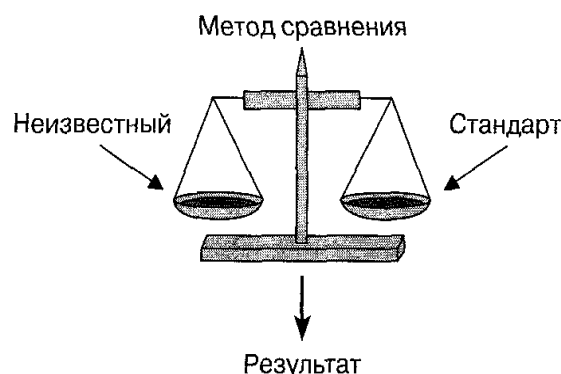


Рис. 5.7. Ілюстрація принципів вимірювань

Калібрування – сукупність операцій, що виконуються з метою визначення співвідношення між сигналом приладу і відповідними значеннями стандарту, наприклад, хімічної речовини відомої концентрації або значення маси, приписане контрольній гирі.

Калібрування інструментів і обладнання (наприклад, скляного посуду) включає порівняння вимірюваної величини з еталонним значенням. Наприклад, для калібрування сигналу спектрофотометра вибирають певний зразок порівняння і в зазначених умовах вимірюють відповідний йому сигнал спектрофотометра. Потім виміряну величину порівнюють із значенням, відомим з літератури. Проводять корекцію результатів подальших вимірювань, або змінюють налаштування приладу.

Крім того, термін «калібрування» (градування) використовують для опису процесу, в ході якого проводять кілька вимірів з метою встановити залежність між аналітичним сигналом і концентрацією речовини. По ряду вимірювань сигналу приладу за різних концентрацій можна побудувати калібрувальний (градувальний) графік (залежності сигналу від концентрації) і вивести калібрувальну (градувальну) функцію, тобто лінійне рівняння або рівняння кривої. Далі, можна виміряти сигнал приладу при невідомій концентрації і за градувальним графіком визначити кількісне значення величини, яке шукають.

На рис. 5.8 наведено приклад градувального графіка та лінійного рівняння, що описує співвідношення між сигналом і концентрацією. Для показаної на малюнку прямої $y = 53,22x + 0,286$, а квадрат коефіцієнта кореляції (r^2) становить 0,9998.

Розчини чистих хімічних речовин відомої концентрації, які використовують для калібрування приладів, часто називають «стандартними розчинами». Проте, термін «стандарт» має безліч різних значень – його використовують там, де йдеться про «стандартні методи» (методи порівняння), і для позначення документа, наприклад, стандарт ISO / ІЕС 17025. При вживанні цього терміну, слід переконатися в тому, що його значення трактується однозначно.

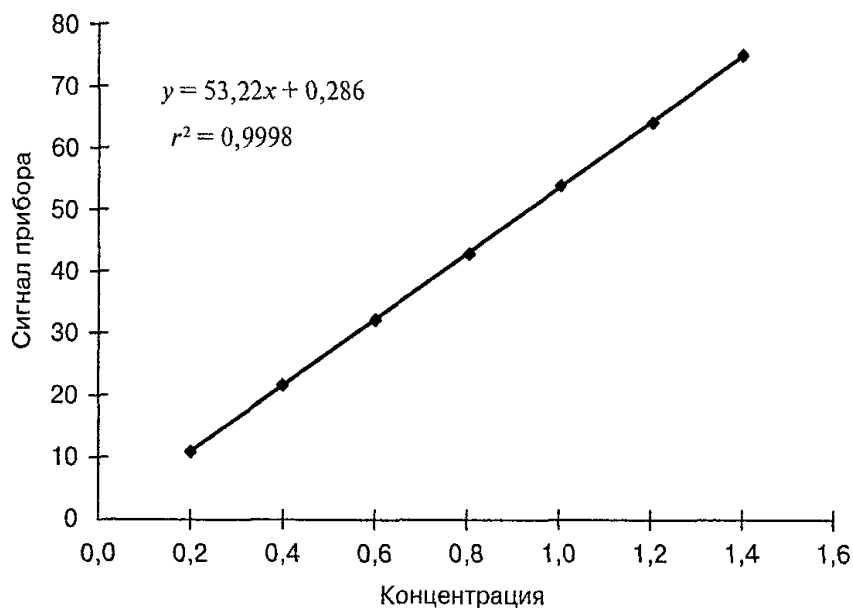


Рис. 5.8. Приклад градуированого графіка

Калібрування за допомогою предметів і матеріалів з цілком певними характеристиками широко застосовується в усьому науковому співтоваристві. Вимірювання фундаментальних базових фізичних величин (довжини, маси, часу, електричного струму, термодинамічної температури і сили світла) проводяться відповідно до давно усталеної системи визнаних міжнародних стандартів, які називають також первинними еталонами. Їх використовують для калібрування матеріалів з менш точно встановленими характеристиками, які називають вторинними еталонами, еталонами порівняння і робочими еталонами. Робочі еталони використовують для калібрування приладів, призначених для вимірювань конкретних характеристик досліджуваного матеріалу або визначення кількості речовини, яку досліджують в досліджуваному матеріалі. Оскільки кожен еталон порівнюють з вищою в ієрархії еталоном (для кожного вказана невизначеність), можна співвідносити результат вимірювання безпосередньо з первинним еталоном. Можливість співвіднесення результату вимірювання з єдиним стандартом (еталоном) називається метрологічною простежуваністю. При фізичних вимірах зазвичай існує пряма простежуваність, проте

вважається, що при хімічних вимірах простежуваність може виявитися проблематичною.

Розглянемо наступний приклад. Уявімо, що групі людей запропонували виміряти довжину прямої лінії за допомогою власної лінійки. Ймовірно, кожна людина отримає результат, який буде дещо відрізнятися від інших, навіть якщо все точно слідували єдиною методикою виконання вимірювань, оскільки лінійки виготовлені і градуйовані різними способами. Лінійки виготовляють з дерева, пластмаси або сталі – всі ці матеріали поведуться по-різному при зміні атмосферних умов. Проте, якби кожен учасник експерименту міг порівняти градування своєї лінійки з градуванням якоїсь «стандартної» лінійки і внести поправку в свій результат через поправочний коефіцієнт, то розкид результатів, ймовірно, був би набагато меншим. Ми привели простий приклад калібрувального експерименту. «Стандартна» лінійка являє собою еталон, щодо якого порівнюють і калібрують інші лінійки. Вимірювання довжини лінії, проведене кожною людиною, простежується до «стандартної» лінійки. Калібрування і простежуваність до стандарту покращує порівнянність вимірювань.

Калібрування за допомогою відповідних фізичних стандартів у більшості випадків є прямою, безпосередньою процедурою. Багато аналітичних методик передбачають взяття точної наважки (певної кількості) речовини – калібрування шкали ваг включає використання фізичного калібранта, такого як еталонна гиря. Більше проблем виникає у аналітика з хімічним калібруванням, оскільки єдиного стандартного зразка, з яким можна було б провести порівняння, для кожного вимірюваної речовини (наприклад, холестерину в сироватці крові), не існує. Метрологічна простежуваність в хімічному аналізі забезпечується наступними способами: по-перше, за допомогою чистих хімічних речовин, а по-друге, шляхом використання зразків з типовими матрицями, в яких чітко визначено кількість присутнього аналіту. Останній із згаданих видів стандарту відомий як матричний зразок порівняння.

Базовою одиницею, прийнятої в хімічних вимірах, є моль – одиниця кількості речовини. Моль – кількість речовини, що містить стільки ж атомів, молекул, іонів або інших структурних одиниць,

скільки міститься атомів у 0,012 кг вуглецю ^{12}C). Це єдина величина в системі СІ, яка не має розмірності. Практично майже неможливо виділити моль чистої речовини. Речовини чистотою більш 99,9% рідкісні; єдиний виняток представляє срібло, яке можна отримувати з чистотою 99,9995% (срібло «п'ять дев'яток»).

Інша проблема полягає в тому, що не завжди можна виділити весь аналіт з матриці проби, а ефективність хімічного вимірювання, можливо, залежить від складу матриці: сигнал від певної кількості чистого хімічної речовини може відрізнитися від сигналу такої ж кількості речовини в присутності інших хімічних речовин. Якщо можливо кількісне виділення аналіту який шукають з матриці проби, то для калібрування можна використовувати чисті хімічні речовини. Ступінь вилучення аналіту з матриці проби необхідно визначити в процесі валідації методу.

Для забезпечення простежуваності результату вимірювання все, що впливає на результат (впливають величини) повинні простежуватися до національних і міжнародних еталонів. Не потрібно надмірних зусиль для того, щоб забезпечити простежуваність в лабораторії з працюючою системою менеджменту якості, проте для цього потрібне повне розуміння застосовуваного методу. Крім того, необхідно знати невизначеність, зв'язану з кожною величиною, яка впливає. Один із способів отримання метрологічно-простежуваних результатів – використання первинного методу. Міжнародне бюро мір і ваг (BIPM) визначає первинний метод як метод, що має високі метрологічними характеристиками, дію якого можна до кінця зрозуміти і повністю описати, для якого можна вказати значення повної невизначеності в одиницях системи СІ. Приклади первинних методів включають титрометричний і гравіметричний методи. У багатьох випадках не представляється можливим застосувати первинні методи, інші методи є прийнятними, наприклад, метод нейтронної активації і метод ізотопного розведення.

Загальний шлях забезпечення метрологічної простежуваності показаний на рис. 5.9.

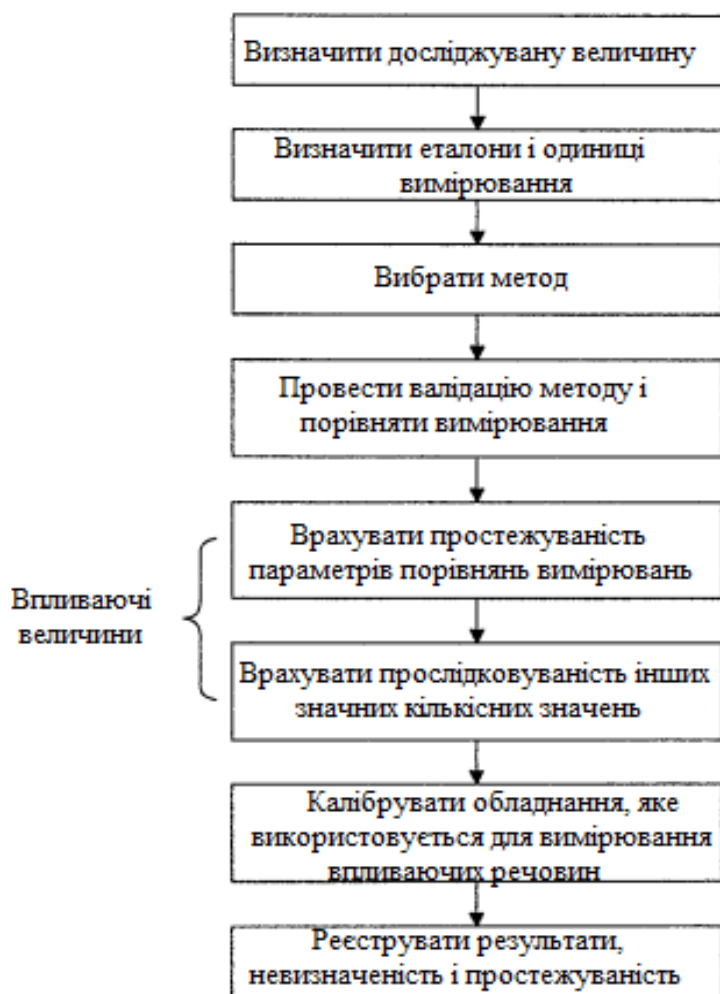


Рис. 5.9. Стратегія забезпечення простежуваності

При встановленні простежуваності важливо, щоб вимірювана величина визначалася однозначно. Розглянемо приклади: екстракція кадмію з ґрунту за допомогою вказаної суміші кислот або вимірювання концентрації металу певною мірою окислення, наприклад, Fe (II) або Fe (III). У звіті про результат аналізу повинні бути вказані одиниці виміру – відомі та прийнятні; переважні одиниці системи СІ. Метод, який використовується має пройти валідацію; в цьому випадку при точному проходженні тесту методики результати повинні «відповідати заданій меті». Клас точності скляного посуду повинен бути вказаний в методиці, на-

приклад, «піпетки й мірні колби класу А», виготовлені з відповідним зазначеним допуском. Вимірювальні прилади необхідно регулярно калібрувати і верифікувати їх характеристики щодня.

Застосовувані хімічні речовини повинні являти собою або речовини відомого класу чистоти, або зразки порівняння. Всі параметри рівняння вимірювання повинні простежуватися. Крім того, можуть з'явитися інші змінні, що впливають на результат, але не враховані в рівнянні вимірювання. Найчастіше для отримання несуперечливих результатів потрібна контролювати температуру, час і рН реакційного середовища. У подібних випадках ці параметри теж повинні бути простежені.

Забезпечення метрологічної простежуваності

Зразки порівняння застосовуються як еталони порівняння. До еталонів порівняння звертаються, коли не представляється можливим використовувати національні чи міжнародні еталони або первинні методи. Еталонам порівняння приписані певні значення, і їх можна використовувати для калібрування вимірювальних систем та валідації методів. Крім того, їх можна використовувати для ідентифікації речовин. Приклади еталонів порівняння включають: зразки порівняння (див. нижче), фізичні стандарти (маси, температури) і стандартні довідкові дані (атомне число). Зразок порівняння – це загальний термін, що до особливого класу матеріалів, що застосовуються в якості еталонів порівняння при хімічних вимірах.

А. Зразки порівняння

Термін «зразок порівняння (RM)» визначається як «матеріал або речовина досить однорідне і стабільне стосовно однієї або декількох надійно встановлених характеристик, щоб відповідати заданій меті в процесі проведення вимірювань».

Доповнимо дане визначення.

- RM – узагальнюючий термін .
- Характеристики можуть бути як якісними, так і кількісними, наприклад, ідентифікація речовин або його форми.

- RM використовують у процесі калібрування вимірювальної системи, для оцінки методики вимірювання, для приписування значень іншим матеріалам, а також при контролі якості.

- У процесі даного конкретного виміру RM можна використовувати тільки з однією метою.

Пункт 4 є дуже важливим, оскільки підкреслює принцип – зразок порівняння, використаний при валідації методики, не можна використовувати знову для рутинного градуювання. Можна використовувати матеріал того ж типу, але від іншого постачальника. Не можна використовувати один і той же матеріал для градуювання і в якості зразка для контролю якості.

Як приклади RM можна навести такі:

- чисті речовини – пестициди з вказаною ступеню чистоти або розчин пестицидів із зазначеними концентраціями (маса/об'єм);

- стандартні розчини: нікель, розчинений в кислоті з вказаною концентрацією (маса/об'єм);

- розчин гідроксиду натрію з вказаною концентрацією (молярна);

- матричні зразки порівняння – природні матеріали: річкові опади з зазначеними концентраціями металів; сухе молоко з вказаним вмістом жиру і паста з крабів з вказаними концентраціями слідових елементів;

- матричні RM – матеріали з внесеними добавками: озерна вода з додаванням мікродомішок і сухе молоко з внесеними добавками органічних домішок;

- фізико-хімічні стандарти – бензойна кислота з вказаною точкою плавлення; п-ксилол з вказаною температурою спалаху; пісок із зазначеним розподілом часток за розмірами і полімери з вказаним розподілом по молекулярній вазі.

Термін «сертифікований зразок порівняння (CRM) визначається як «зразок порівняння, попередня метрологічна достовірна процедура валідації для оцінки однієї або декількох характеристик, яка супроводжується сертифікатом, що підтверджує значення величини відповідної характеристики, зв'язану з нею невизначеність і метрологічну простежуваність».

- Метрологічна достовірність процедури виготовлення та сертифікації зразків порівняння викладені, серед іншого, в ISO Guide 34 і ISO Guide 35.

- У ISO Guide 31 представлено настанову із зберігання сертифікатів.

Деякі виробники/постачальники зразків порівняння випускають свою продукцію під різними найменуваннями. Наприклад, стандартні зразки порівняння (SRM) представляють собою сертифіковані зразки порівняння, що випускаються Національним інститутом стандартів і технологій (NIST), а Європейські зразки порівняння (ERM) представляють собою CRM, вироблені за участю трьох європейських виробників стандартних матеріалів, а саме BAM (Федеральний інститут дослідження та випробувань матеріалів, Німеччина), IRMM (Європейська комісія. Об'єднаний дослідницький центр, Інститут матеріалів порівняння і вимірів, Бельгія) і LGC (Великобританія).

Сертифіковані зразки порівняння знаходять наступне застосування:

- забезпечення метрологічної простежуваності результатів;
- підтвердження ідентичності матеріалів;
- градування та верифікація процесів вимірювання в рутинних умовах;
- перевірка (верифікація) коректності застосування стандартних методів;
- розробка та валідація нових методів вимірювань;
- визначення значень величин для інших матеріалів, які можна використовувати в якості вторинних стандартів (калібрів);
- внутрішній контроль якості та схеми забезпечення контролю якості.

Розробка і атестація сертифікованих зразків порівняння – процес дорогий. Через це сертифіковані зразки порівняння використовуються, як правило, при первинній валідації методу. Застосування сертифікованих зразків порівняння для щоденного контролю якості навряд чи виправдано економічно, хоча їх можна використовувати для «калібрування» інших, більш дешевих вторинних

матеріалів, за допомогою яких доцільно проводити рутинний контроль якості.

Б. Хімічні стандарти

Термін «хімічні стандарти» застосовують для позначення хімічних речовин (як правило, індивідуальних речовин), для яких надійно визначена чистота.

Хімічні стандарти можна використовувати для калібрування двома різними способами. Можна застосовувати їх як «зовнішні» стандарти – в цьому випадку вимірювання проводять окремо, не вводячи їх до складу проби; або ж в якості стандартів «внутрішніх» – в цьому випадку стандарт додають у пробу, вимірювання проби і стандарту проводять одночасно, тобто аналізують єдину «збагачену» пробу. Ці два різних підходи часто позначають термінами «зовнішня стандартизація» і «внутрішня стандартизація».

Зовнішня стандартизація

Для зовнішньої стандартизації використовують один або кілька хімічних стандартів відомої концентрації; вимірювання проводять в той же час, що і вимірювання проби, тими ж засобами, якими визначають вміст аналіту в пробах. Чисті хімічні стандарти однієї концентрації можна використовувати для визначення коефіцієнтів чутливості приладів (очікуваної величини, зміни сигналу при зміні концентрації аналіту). При проведенні валідаційних досліджень хімічні стандарти різної концентрації (як правило, щонайменше, сім концентрацій, включаючи холосту пробу) використовують для побудови градуювального графіку. Якщо подібне дослідження показало, що залежність аналітичного сигналу від концентрації є лінійним, то для побудови градуювального графіку можна використовувати меншу кількість концентрацій при застосуванні методу для аналізу проб. Тому коефіцієнт відгуку при вказаній концентрації дорівнює градієнту графіка у зазначеній точці, тобто **чутливості**.

Концентрацію аналіту в пробах визначають за градуювальним графіком шляхом знаходження значення концентрації, відповідного значенню виміряного сигналу. Зауважимо, що при використанні

градувальних графіків не можна виходити з припущення про те, що графік проходить через точку (0,0), якщо це не підтверджено вимірюванням відповідної холостою проби. Розрахунок концентрації аналіту в пробі за допомогою градувального графіку можна проводити тільки в інтервалі концентрацій, обмеженому максимальною і мінімальною концентрацією хімічного стандарту або величиною сигналу «холостої» проби. Не намагайтеся екстраполювати графік за межу зазначеного інтервалу. Пам'ятайте, що значення концентрацій, що визначаються за допомогою градувального графіку, будуть більш надійні в середній ділянці графіку і менш надійні в крайніх областях зазначеного діапазону.

Зовнішні хімічні стандарти використовують у багатьох ситуаціях. В ідеальному випадку, матриці хімічних стандартів повинні збігатися з матрицями проб для того, щоб забезпечити впевненість у тому, що прилад в процесі вимірювання хімічного стандарту дає відгук, аналогічний відгуку при вимірюванні проби. В окремих випадках процесам підготовки проби і вимірювання властиві похибки, які можуть привести до втрати аналіту. У подібних ситуаціях хімічні стандарти слід обробити так само, як і проби, щоб втрати в пробах були еквівалентні втрат у стандарті. У деяких випадках велика похибка з'являється в момент введення проби або стандарту у вимірювальний прилад. Наведемо приклад – ручне введення проби малого об'єму в капілярну колонку газового хроматографа. Потрібна неабияка майстерність для того, щоб вводити постійний об'єм в колонку. Нерідко розкид величин об'єму становить 10–50 %. Вплив варіацій на результат можна усунути, змінивши процедуру. Хімічний стандарт А використовують для побудови калібрувального графіка, а другий хімічний стандарт В додають на етапі вимірювання як до розчину хімічного стандарту А, так і до розчину проби. У цьому випадку будують графік залежності відношення сигналу стандарту А до сигналу стандарту В від концентрації. У цьому випадку концентрація аналіту не залежить від розміру проби або техніки введення проби.

Внутрішня стандартизація

Внутрішня стандартизація полягає в додаванні хімічної стандарту до розчину проби, щоб забезпечити можливість ефективного одночасного вимірювання стандарту і проби. Внутрішні хімічні стандарти можуть являти собою реальний аналіт; аналіт, позначений ізотопом; або ж близьку за хімічним складом речовину. Останнє зазвичай вибирають з числа речовин, імовірно відсутніх в пробі, яке, як вважають, буде проявляти себе в процесі вимірювань аналогічно аналіту. Існує кілька способів застосування внутрішніх стандартів, а іноді вони служать різній меті.

Як згадувалося в останньому абзаці, при додаванні близької хімічної речовини, як до хімічних стандартів, так і до проб, проблеми з розкидом об'єму введеної проби усуваються. Існує інший варіант використання хімічних стандартів подібного роду, тобто стандартів, які є внутрішніми калібрантами. У процесі вимірювання внутрішній стандарт повинен демонструвати характеристики, аналогічні характеристикам проби, проте сигнали повинні бути помітними. Коли близьку речовину додають на ранньому етапі процесу вимірювання, можна припустити, що всі втрати аналіту в результаті процесу вимірювання в рівній мірі проявляться у впливі на хімічний стандарт і аналіт. Таким чином, поправки до результату на компенсацію, наприклад, неповного вилучення, не буде потрібно. Концентрацію аналіту в пробі визначають за співвідношенням двох сигналів (один сигнал – від стандарту, другий – від проби).

Деякі методи включають процедуру внесення стандартної добавки. Ця процедура полягає в додаванні відомої кількості внутрішнього хімічного стандарту, ідентичного аналіту, до розчину проби. Очевидно, що, якщо внутрішній хімічний стандарт являє собою ту ж речовину, що і аналіт, який визначається то для того, щоб визначити вміст аналіту в пробі, необхідно провести два виміри, а саме: один вимір без додавання хімічного стандарту, другий – з доданням стандарту. Є кілька способів виконання процедури внесення стандартної добавки: тут описані дві з них. Додавання хімічного стандарту, аналогічного аналіту, називають також «spiking» (введення добавки).

При виконанні аналізу першим методом – методом стандартних добавок – до проби додають тільки одну порцію стандарту. В цьому випадку вихідна концентрація аналіту А визначається наступним рівнянням:

$$X = \frac{YAC}{[B - (DA)]}$$

де Y – концентрація доданого внутрішнього хімічного стандарту;

A – аналітичний сигнал для невідомої концентрації аналіту;

B – сумарний сигнал (аналіт невідомої концентрації плюс доданий хімічний стандарт).

$$C = (\text{Об'єм}_{\text{стандарту}}) / (\text{Об'єм}_{\text{проби}} + \text{Об'єм}_{\text{стандарту}})$$

$$D = (\text{Об'єм}_{\text{проби}}) / (\text{Об'єм}_{\text{проби}} + \text{Об'єм}_{\text{стандарту}})$$

Прийнято користуватися внутрішніми хімічними стандартами високих концентрацій, додаючи їх в об'ємах відносно малих порівняно з об'ємом проби. У подібних випадках, там, де об'єм проби набагато більший об'єму доданого хімічного стандарту, D = 1 і C визначається рівнянням:

$$\text{Об'єм}_{\text{стандарту}} / \text{Об'єм}_{\text{проби}} = C', \text{ де}$$

C – коефіцієнт розведення для хімічного стандарту. Рівняння (3.1) спрощується до рівняння (3.2):

$$X = \frac{YAC'}{(B - A)}$$

Альтернативна процедура внесення стандартних добавок полягає в додаванні декількох порцій відомої кількості хімічного стандарту до розчину проби. Візьміть рівні об'єми розчину проби (рекомендується взяти сім порцій). До всіх цих розчинів, за винятком одного, додайте різні відомі кількості чистого аналіту. Розбавте всі розчини до досягнення однакового об'єму. Виміряйте

аналітичний сигнал кожного розбавленого розчину. Побудуйте графік залежності сигналу від концентрації аналіту. Відрізок, що відсікається графіком в негативній області осі X (при $x = 0$) являє концентрацію аналіту в розчині проби. Процедура проілюстрована на рис. 5.4, де продовжена лінія від точки А до точки В прямо вказує концентрацію речовини в пробі, яку шукають. Оскільки графік залежності аналітичного сигналу від концентрації являє собою пряму лінію, шукана концентрація може бути також одержана діленням відрізка, що відсікається графіком на осі ординат, на кут нахилу прямої. З рівняння прямої, представленого на рис. 5.10, $y = 69,1 x + 7165$, розраховуємо концентрацію аналіту в пробі, вона становить $103,7 \text{ мкг/дм}^3$. Щоб мінімізувати невизначеність отриманого значення концентрації, важливо дослідити концентрації у великому інтервалі доданих значень. Внесення стандартних добавок може виявитися корисним підходом у тих випадках, коли неможливе зовнішнє калібрування через те, що на сигнал приладу впливає матриця проби.

Ні методика внутрішньої стандартизації, ні методика зовнішньої стандартизації, не допускають різної поведінки проб і хімічних стандартів через матричні ефекти в пробах або різний стан аналіту в пробах і в хімічних стандартах.

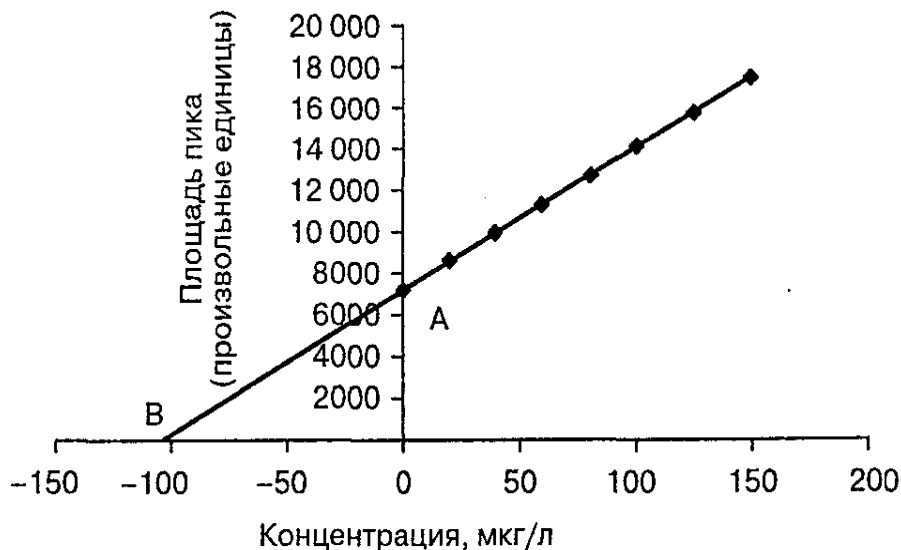


Рис. 5.10. Графік стандартних розведень

Хімічний стандарт слід піддавати тій же аналітичній обробці, що й проби, але навіть у цьому випадку слід пам'ятати, що повне вилучення аналіту з матриці проби може виявитися неможливим, якщо аналіт міцно зв'язаний з матрицею. Це необхідно враховувати при розробці аналітичних методів.

Введення добавок розчину шуканого аналіту в пробу також є ефективним способом підтвердження присутності аналіту. При аналізі методом газової або рідинної хроматографії матриця проби нерідко впливає на хроматографічний процес, викликаючи відмінність в часах утримування піків аналіту в пробі і в хімічному стандарті. Таким чином, не можна з упевненістю визначити, чи викликаний при аналізі проби пік, який досліджується присутністю аналіту або ж він відповідає якійсь іншій речовині. Шляхом внесення добавок хімічного стандарту в пробу і вимірювання хроматографічним часом утримування збільшеного піку, можна підтвердити ідентифікацію аналіту.

5.4. ПРАВИЛА ПРОВЕДЕННЯ КОНТРОЛЮ ЯКОСТІ ТА ОБРОБКА ДАНИХ

5.4.1. Контроль якості

Заходи проводяться залежно від конкретної ситуації. Вони являють собою засіб оцінки поточних робочих характеристик методу, який використовується, а також загальних процедур, які виконуються лабораторією. Існує два види контролю якості, а саме: внутрішній контроль якості та зовнішня оцінка якості.

Перед детальнішим розглядом цих питань слід пояснити, для чого необхідний контроль якості. Як сказано вище, до нього вдаються для того, щоб переконатися в правильності роботи аналітичної системи. Якщо аналогічні вимірювання проводяться багаторазово, то не слід очікувати отримання абсолютно однакових результатів усіх вимірювань. Незначні відхилення результатів природно виникають через невеликі (прийнятних) відмінностей аналітичних систем. Контроль якості використовують для моніторингу відхилень методу (або методики) результатів дослідження, які виникають через непередбачені впливи. Повторний (багатократний) аналіз зразків контролю являє собою найпоширенішу систему моніторингу. Статистична теорія, що лежить в основі системи контролю якості, докладно викладається в контрольних картах.

Дії, які спрямовані на контроль якості, залежать від аналітичної проблеми, яку необхідно вирішити. Заходи формуються в наступному переліку:

- аналіз холостих проб;
- аналіз контрольних проб;
- аналіз повторних проб;
- аналіз «сліпих» проб;
- аналіз хімічних стандартів і добавок.

А. «Холості» проби

«Холоста» проба – це проба, яка максимально близька за складом до аналітичних проб, проте в ній повинен бути відсутній аналіт.

«Холості» проби використовують для того, щоб визначити, яку похибку вносить хімічний склад матриці, який безпосередньо не вимірюється.

Наприклад, ви можете розчиняти пробу в нітратній кислоті при підготовці її до аналізу на вміст слідів Купруму і Ніколу методом атомно-абсорбційної спектрометрії. Досить імовірно, що азотна кислота, так само як і проба, містить ті ж метали в слідових кількостях. Тому аналіз «холостої» проби повинен полягати в аналізі нітратної кислоти, яка не містить проби. Всі реактиви, застосовувані в процесі підготовки проби до аналізу, слід перевіряти для того, щоб не було спотворень результатів вимірювань. Аналіз всіх реактивів за відсутності проби називають іноді «холостим» дослідом.

Б. Зразки контролю (ЗК)

При контролі якості зразки контролю (ЗК) являють собою засіб оцінки варіацій результатів аналізу всередині аналітичних серій і між серіями. Зразок контролю являє собою матеріал, характеристики якого повністю вивчені лабораторією, яка проводить аналітичні вимірювання, або ж третьою стороною. Зразок контролю аналогічний за складом типовим аналітичним пробам, є стабільним, гомогенним матеріалом, доступним у великих кількостях, щоб його можна було використовувати протягом тривалого періоду часу для забезпечення достовірності результатів.

Зразки для контролю не обов'язково досліджувати «повністю». Головна вимога – однорідність і стабільність. Зразок для контролю також не обов'язково повинен бути «аналогічний за складом» робочим пробам. Призначення зразка для контролю – демонструвати стан вимірювального процесу, а для цього достатньо того, щоб він поведився у випробуваннях подібно робочим пробам.

В якості зразка контролю (ЗК) можна використовувати зразок порівняння. Стабільність і гомогенність зразка порівняння забезпечує впевненість у тому, що причиною відхилень результатів аналізу є варіації аналітичного методу, а не зміни в складі зразка. Моніторинг відхилень результатів аналізу зразка контролю зазвичай здійснюють за допомогою контрольних карт. Подібні контрольні

карти застосовують для демонстрації статистичного стану вимірювальної системи. Знаходиться вона в статистично стабільному стані, чи проявляє ознаки виходу з стабільного стану, або ж уже вийшла з-під контролю? Не можна розглядати результати аналізу контрольних проб, якщо метод не проходить статистичний контроль; в такому випадку необхідно досліджувати причини цього.

В. Повторні проби

Повторні проби дозволяють проводити перевірку менш формальну, ніж звичайні зразки контролю. У ході аналітичного процесу проби можна аналізувати як одиничні, парні, потрійні і т. д. Як правило, повторна проба являє собою звичайну пробу, яку повторно використовують в аналізі в тій же серії, або в іншій серії проб.

Вивчають відхилення між двома групами результатів для того, щоб переконатися в тому, що відхилення знаходяться в прийнятних межах. Перевищення очікуваних величин відхилень (наприклад, відхилення перевищує заявлену повторюваність методу) вказує на можливі неполадки аналітичної системи. Аналітик, як правило, обізнаний про наявність повторних проб у серії.

Г. Сліпі проби

Сліпі проби являють собою проби, що включаються в аналітичну серію і про які аналітику або може бути відомо, що в серії присутні сліпі проби, проте не знає, які з них. Сліпі проби може розсилати замовник для перевірки роботи лабораторії, або ж керівництво лабораторії для перевірки функціонування конкретної системи. Результати аналізу сліпих проб обробляють так само, як результати аналізу повторних проб – замовник чи керівник лабораторії перевіряють серії результатів для того, щоб оцінити, чи є прийнятним рівень відхилення між результатами повторних вимірювань сліпої проби, або ж між результатами, що досліджуються з очікуваною величиною.

Д. Хімічні стандарти і добавки

Існують два способи застосування хімічних стандартів в хімічному аналізі. По-перше, їх необхідно використовувати для того, щоб переконатися в правильній роботі приладу – це повсякденна операція, іноді її називають перевіркою придатності системи. Цей вид контролю, як правило, не пов'язаний з аналізом конкретних проб і тому є, строго кажучи, швидким способом оцінки якості, ніж способом контролю. По-друге, хімічні стандарти застосовують для градуювання вимірювальних приладів. Вимірювання стандартів можна проводити окремо від проб (зовнішня стандартизація) або у складі проб (внутрішня стандартизація).

5.4.2. Лабораторне середовище

На жаль, багатьом хімікам – аналітикам доводиться працювати в лабораторіях, абсолютно не пристосованих для проведення необхідних досліджень. Це може серйозно вплинути на якість експонованих результатів. На якість аналітичної роботи може вплинути декілька чинників. Одна з важливих умов: при аналізі проби, яка містить дуже малу кількість досліджуваного аналіту, необхідно виключити всі потенційні джерела забруднення цим аналітом, а також інші джерела, що можуть забруднити пробу домішками і спотворити результат.

Крім забруднення проб, важливими питаннями впливу навколишнього середовища лабораторії є деградація компонентів проби і втрати аналіту в результаті діяльності мікроорганізмів, випаровування або сорбції.

Лабораторне середовище менше впливає на якість вимірів, ніж пряме забруднення.

Потенційні джерела забруднення:

- апаратуру та обладнання, яке контактує з пробами;
- аналіт;
- інші аналіти;
- інші проби;
- реактиви та розчинники;
- чисті хімічні речовини, які використовуються для приготування стандартів;

- повітряне середовище лабораторії;
- лабораторне середовище (в цілому).

Фактори, що впливають на якість

- вібрація;
- бруд;
- сонячне світло;
- радіація;
- електричні й магнітні поля;
- шум;
- температура;
- вологість.

Невеликі зміни температури і вологості в лабораторії, можуть надавати прихований вплив.

5.4.3. Планування лабораторії

Якщо лабораторія сконструйована спеціально для виконання аналітичних робіт, то в ній вплив навколишнього середовища на аналітичний процес зведений до мінімуму. Найчастіше вирішення цих проблем може бути зв'язано з великими витратами, тому при плануванні лабораторії йде пошук компромісу між витратами і зменшенням впливу чинників, що заважають. Якщо лабораторія розміщується в звичайному будинку, пошук рішення може виявитися ще більш важчим. Багато проблем можна вирішити шляхом введення невеликих змін в організацію роботи лабораторії. Вплив сонячного світла можна зменшити, скориставшись щільними шторами, система кондиціонування повітря допоможе стабілізувати температуру, вологість і зменшити вміст пилу в повітрі лабораторії. Серйозні проблеми можуть бути пов'язані з джерелами вібрації, їх вплив можна зменшити шляхом установки спеціальних меблів, призначеної для ізоляції чутливого обладнання від зовнішніх джерел вібрації.

Розміщення обладнання

При організації нової лабораторії перед керівником (менеджером) стоїть завдання: прийнявши в експлуатацію приміщення з усіма його недоліками і недосконаlostями, розмістити в ньому всі лабораторні меблі та обладнання так, щоб забезпечити найкращу роботу апаратури.

Більшість хіміків прибувають в лабораторію, в якій їм належить працювати, коли вона вже запущена в експлуатацію. Все має бути розміщено на своїх місцях і, бажано, розміщено правильно. Але це не можна сприймати як само собою зрозуміле. Постійно погана робота окремих одиниць обладнання повинна змусити аналітика задатися питанням: чи може обладнання бути причиною невдач? Надзвичайно важливо знати, які саме чинники навколишнього середовища призводять до появи похибок при використанні конкретного методу або поганій роботі аналітичного устаткування.

Моніторинг змін

У сучасних лабораторіях для виявлення небажаних змін стану лабораторного середовища та попередження персоналу застосовуються автоматичні сенсорні пристосування. Основні параметри лабораторного середовища, такі як температура, вологість і забрудненість повітря, можна безперервно відстежувати за допомогою сенсорних пристроїв. Результати спостережень можна передавати на записуючий пристрій або ж у комп'ютерну систему лабораторного менеджменту, яка може здійснити коригувальні дії або подати звуковий сигнал у разі перевищення граничного значення певного параметра.

5.4.4. Обладнання, скляний посуд і пристосування

У цьому розділі ми розглянемо питання, пов'язані з лабораторним обладнанням. Термін «обладнання» описує всі предмети, що використовуються в лабораторії для проведення аналітичної роботи, за винятком хімічних реактивів. У попередньому розділі ми розглянули взаємозв'язок між характеристиками обладнання та лабораторного середовища і показали, що необхідно уважно стави-

тися до розміщення обладнання. У цьому розділі ми розширимо огляд і глибше обговоримо проблему.

Вибір

Існує кілька факторів, які слід враховувати при виборі обладнання для конкретного застосування.

При виборі обладнання, наявного в наявності, вам слід взяти до уваги такі моменти як придатність, тобто «відповідність заданій меті», стан, чистоту і, в окремих випадках, відповідність робочих характеристик обладнання характеристикам, представленим в специфікації. При купівлі нового обладнання, важливо продумати всі можливі варіанти його застосування. Після цього можна приступити до складання специфікації з урахуванням «відповідності заданим цілям», вартості (як початкової, так і вартості поточних витрат) та простоти в експлуатації. Менш очевидні пункти, які все ж таки необхідно враховувати, включають розмір, вагу, вимоги до енергопостачання, репутацію виробника (з точки зору надійності), простоту в експлуатації обладнання та доступність запасних частин. Будь-яке обладнання працює з певними обмеженнями. Наприклад, можливі обмеження по кількості визначення речовини або по точності виконання вимірювань. Якщо ви спробуєте використовувати обладнання з перевищенням його можливостей, то незалежно від того, наскільки правильно ви експлуатуєте обладнання, ви не отримаєте достовірних результатів. Там, де мова йде про конкретний інструмент, «відповідність заданій меті» означає наявність певних характеристик, необхідних для виконання конкретної роботи. Це відноситься до всього обладнання, і до великого, і до малого. Наприклад, мішалка повинна працювати задовільно, виконуючи поставлене завдання, залишаючись при цьому практично інертною. Існує формальна процедура оцінки придатності обладнання для виконання завдання – вона називається Кваліфікація обладнання або Валідація обладнання.

Придатність

Перед тим як використовувати будь-яку одиницю обладнання, потрібно підтвердити придатність обладнання до використання. Якщо воно придатне, проблем немає, а якщо не придатне, то що потрібно зробити для того, щоб повернути його в задовільний стан? Чи існують способи застосування приладу в його нинішньому або частково відновленому стані? Якщо на це питання негативна відповідь, то сенсу тримати прилад на балансі немає; позбудьтеся від нього – тоді, принаймні, ви будете впевнені в тому, що ніхто не скористається ним через непорозуміння. Якщо обладнання можна полагодити, але не прямо зараз, то на ньому повинна бути наклейка: «Несправне і очікує ремонту», щоб дане устаткування не використали випадково.

Особлива стаття – скляний посуд і пристосування. Скло легко б'ється, а лагодження виробів зі скла доцільне лише в разі пошкодження дорогих складних пристосувань. Навіть невеликі пошкодження, такі як сколені ділянки, можуть привести до провалу експерименту, що може виявитися небезпечним і потребують витрат. Ризик використання пошкодженого обладнання не часто буває виправданим. Від пошкодженого мірного скляного посуду або пристосувань необхідно позбавлятися незалежно від виду ушкодження, оскільки лагодження, швидше за все, призведе до втрати волюметричних характеристик посуду або пристосування, наприклад, значення місткості, витрати і т. д.

Калібрування і очищення скляного посуду важливі, якщо, наприклад, об'єм скляної мірної колби безпосередньо впливає на результати дослідження (приготування градуювальних розчинів, титрування тощо).

Кваліфікація обладнання

Первинна вимога, що відноситься до будь-якого обладнання (будь-то мірна колба, сушильна шафа для висушування проб або атомно-абсорбційний спектрометр, що застосовується для визначення слідових кількостей металів) полягає в тому, що обладнання має «відповідати заданій меті». Будь-яка діяльність лабораторії, наприклад, валідація методик, безпосередньо залежить від правиль-

ного функціонування та «відповідності заданій меті», що застосовується. Правила GLP та Міжнародні стандарти, такі як ISO 9001 та ISO / ІЕС 17025 вимагають, щоб обладнання було придатним для відповідного застосування. Крім того, контрольні-наглядові органи та органи з акредитації постійно вимагають від лабораторій свідчень про те, що обладнання «відповідає заданій меті». Кваліфікація (валідація) обладнання представляє собою формальний процес, метою якого є документальне підтвердження того, що інструмент «відповідає заданій меті», підтримується в робочому стані, відкалібрований і придатний для застосування. Формальна сутність і необхідність надання документальних свідчень робить процедуру дещо більш скрупульозною порівняно з рутинною процедурою, що проводиться в більшості лабораторій.

Процес кваліфікації включає 4 етапи.

- Кваліфікація проекту .
- Кваліфікація монтажу.
- Кваліфікація функціонування .
- Кваліфікація в експлуатації.

Кваліфікація проекту – етап планування, що передуює купівлі нового інструменту або вибору інструменту з числа наявних для виконання конкретного завдання. На цьому етапі слід звернути увагу на те, як використовуватиметься інструмент і що в цьому випадку потрібно розуміти під «відповідністю заданій меті». Глибина дослідження питання залежить від складності завдання та ризику, зв'язаного з прийняттям неправильного рішення. Можливо, рішення про придатність наявного в лабораторії інструменту для роботи за новою методикою, буде прямим і безпосереднім. Може бути, процедура обмежиться перевіркою документації, необхідної для підтвердження теоретичної здатності інструменту працювати в необхідному інтервалі концентрацій з вказаною для даного методу систематичною похибкою і прецизійністю. Дослідження на «відповідність заданій меті» для нового інструменту може зажадати складної процедури, що закінчується виробленням формальної специфікації, в якій представлені необхідні робочі характеристики інструмента й інші фактори, що відносяться до його експлуатації.

Кваліфікація монтажу потрібна, в першу чергу, при купівлі нового обладнання. На цій стадії виконується перевірка з метою підтвердження того, що отриманий інструмент відповідає специфікації і правильно встановлений в обраному місці у відповідному лабораторному оточенні. Це відноситься як до технічних засобів, так і до програмного устаткування. На цьому етапі розумно скористатися систематизованим списком, щоб забезпечити впевненість, в тому, що перевірено абсолютно все. На цій стадії перевіряють все, що пов'язано з монтажем аж до первісного сигналу при подачі електроживлення, якщо це необхідно. Крім того, відзначимо, що іноді слід повторити окремі аспекти процедури кваліфікації монтажу після переміщення або модернізації приладу.

Кваліфікація функціонування – підтвердження того, що інструмент функціонує відповідно до встановлених вимог лабораторного докільця. Значення процедури можна оцінити як демонстрацію того, що основні робочі характеристики інструменту відповідають специфікації, і істотних відмінностей між значеннями заданих і реальних величин немає. Наприклад, коли насос налаштований на швидкість потоку $1,0 \text{ см}^3/\text{хв}$, а реальна величина швидкості потоку знаходиться в межах заданого допуску ($0,95$ до $1,00 \text{ см}^3/\text{хв}$), то різниця не є істотною, на відміну від, наприклад, $0,7$ або $1,3 \text{ см}^3/\text{хв}$.

Кваліфікація в експлуатації сприяє вирішенню двох завдань. У першу чергу, вона служить для демонстрації правильного функціонування апаратури в цілому. Крім того, кваліфікація в експлуатації підтверджує, що при зміні характеристик інструменту (наприклад, обумовлених зносом ущільнення поршня насоса) поточні робочі характеристики «відповідають заданій меті». Свідомство правильного функціонування апаратури в цілому можна отримати за допомогою незалежної системи контролю (наприклад, в хроматографії це «тест-колонка» або «контрольна суміш») або за результатами щоденних перевірок придатності методу (придатність системи, калібрування і аналітичний контроль якості). Перевірка за допомогою тест-колонки та контрольної суміші має ряд переваг. Вона дозволяє оцінити ефективність роботи обладнання за допомогою добре розробленої процедури контролю і проводити порівняння результатів з даними, які були отримані раніше, або

будуть отримані в майбутньому. Вона дозволяє також порівнювати робочі характеристики інструменту з аналогічними параметрами інших приладів, що знаходяться в лабораторії або де б то не було.

Можливо, вам покажеться, що ця процедура вимагає великих додаткових зусиль. Але в даному випадку не ви приймаєте рішення про періодичність проведення подібних перевірок. Етап 1 проводять один раз – або при виборі інструмента з числа наявних, або при купівлі нового інструменту. Етап 2 також проводиться, як правило, одноразово – при доставці або переміщенні інструменту. Етап 3 здійснюють регулярно, проте не надто часто, його слід проводити після первинного монтажу нового обладнання. Частота перевірок залежить від ряду факторів, включаючи наступні:

- «критичність» робочих параметрів інструменту;
- ступінь навантаження на інструмент – високі робочі навантаження можуть викликати прискорене зношування інструменту; в цьому випадку потрібно ретельна перевірка перед кожним використанням;
- особливості методу, який здійснюється за допомогою даного інструменту: наприклад, застосування агресивних розчинників викликає прискорене зношування компонентів насоса;
- навколишнє середовище – інструмент мобільної лабораторії, можливо, буде потрібно тестувати частіше, ніж інструмент, що знаходиться в приміщенні з системою кондиціонування повітря;
- рекомендації виробника.

Завжди рекомендується проводити етап 3 після сервісного обслуговування. Свідчення, що підтверджують безперервну задовільну роботу обладнання (етап 4), отримують за результатами щоденних перевірок роботи методу (наприклад, контролю стабільності системи, градування і аналітичного контролю якості). Можна поради встановити порогові значення робочих параметрів інструменту, вихід за які означає, що інструмент більш непридатний до використання. Кожен етап кваліфікації необхідно повністю документувати, щоб свідчення, що підтверджують робочі параметри, можна було надати для перевірки в будь-який призначений час.

Очищення

Очищення є обов'язковим компонентом експлуатації обладнання, особливо при повторному використанні інструменту; проте термін відноситься також до процесу очищення обладнання після використання в «брудному» оточенні. Мета очищення – підтвердження того, що при використанні вимірювального (або іншого) устаткування, ризик забруднення від попередніх проб, хімічних реактивів, стандартів і лабораторного середовища, зведений до мінімуму. У більшості випадків процес очищення включає введення хімікатів у системи, які очищаються. Після очищення обладнання потрібно ретельно промити для видалення слідів хімікатів, що застосовувалися для очищення, а потім висушити.

При очищенні слід переконатися в тому, що в процесі очищення не виникне проблем серйозніших, ніж проблема початкового забруднення. Деякі потенційні проблеми абсолютно очевидні, в той час як інші приховані – особливо там, де хімічні реакції можуть привести до фізичного пошкодження обладнання. Наприклад, принцип дії капілярного віскозиметра з U-подібною трубкою заснований на законах капілярних явищ, в яких основну роль відіграють такі параметри як «змочуваність» і поверхневий натяг. Деякі розчинники або детергенти/сурфактанти, застосовувані для очищення, можуть викликати необоротні зміни змочуваності поверхні капіляра. При очищенні мірного скляного посуду слід уникати машинного миття, надмірних температур і застосування сильних кислот/лугів або сурфактантів.

Очищення тонких інструментів або їх компонентів може призвести до їх пошкодження, через що виникнуть проблеми більш серйозні, ніж викликані початковим забрудненням. Якщо в керівництві з експлуатації інструменту немає чіткої інструкції з очищення, адресованої аналітику, безпечніше доручити цю процедуру інженеру з експлуатації обладнання. Якщо виникають сумніви, зверніться до експерта. Інші джерела інформації про очищення доступні у виробників очищувальних засобів. Якщо процедура очищення проводиться перед важливим дослідженням, її слід задокументувати .

Сушка

При сушінні обладнання після очищення слід також дотримуватися обережності. Існує чотири основних способи сушіння обладнання:

- фізична сушка за допомогою абсорбуючого матеріалу;
- ополіскування летючим розчинником з наступним його випаровуванням при кімнатній температурі;
- видалення розчинника при кімнатній температурі в потоці повітря;
- видалення розчинників при підвищеній температурі.

Останній спосіб зручний і, як правило, безпечний. Більшість лабораторій обладнано промисловими сушильними печами (шафами) для сушіння скляного посуду. З'являється спокуса сушити всю скляну посуду тільки так, а проте, в двох випадках це неприйнятно. Гарячу сушильну піч, так само як і будь-який інший джерело тепла, не рекомендується застосовувати для видалення органічних розчинників. Крім того, не слід сушити при підвищених температурах мірний скляний посуд. Скло розширюється при нагріванні, і процес цей може виявитися не цілком оборотним, тому нагрівання слід уникати – воно може призвести до порушення калібрування і виходу значення за рамки допуску. Більш відповідний спосіб сушіння в цьому випадку – сушка в потоці повітря; при цьому приміщення необхідно добре вентилувати, переважно проводити процедуру у витяжній шафі.

5.4.5. Хімічні реактиви та витратні матеріали

У цьому розділі йдеться про правильне використання хімічних реактивів та інших витратних матеріалів у процесі хімічного аналізу. У розділ включені рекомендації щодо застосування розчинників, реагентів (речовин, що відіграють особливу роль, що безпосередньо беруть участь в хімічному процесі) та інших матеріалів, необхідних для дослідження, але не вступають в хімічні взаємодії. Кілька прикладів використовуваних матеріалів представлено нижче.

Реактиви – агенти-окиснювачі та відновники, індикатори, осушувачі, буферні розчини, комплексоутворювачі, кислоти й луги.

Розчинники – вода, органічні розчинники і надкритичні флюїди.

Витратні матеріали – фільтрувальний папір, кипілки, втулки для апаратів Сокслета, сорбенти для хроматографічних колонок.

При роботі з цими матеріалами слід звертати увагу на такі аспекти як клас чистоти, маркування, виготовлення, утримання, зберігання, безпека, стабільність і утилізація. Всі згадані аспекти розглянуті в наступних розділах . Більшість рекомендацій даного розділу застосовуються при роботі з пробами.

Клас чистоти

Для більшості хімічних реактивів, що використовуються в лабораторіях, існує кілька класів чистоти, що визначаються, як правило, концентрацією присутніх у них домішок, загалом, чим чистіше реактив, тим вище його вартість, в каталозі виробника вказані класи чистоти хімічних реактивів, наявних у продажу, разом зі специфікаціями їх чистоти. Необхідно пам'ятати, що в специфікації, можливо, вказані не всі присутні в реактиві домішки. Природа домішок може виявитися важливою (або не важливою), залежно від того, як буде використаний реактив.

Наприклад, в виготовлених промисловим чином мінеральних кислотах, таких як сульфатна, хлористоводнева або нітратна, неминуче присутні в невеликих концентраціях домішки металів. Якщо кислота призначена для використання в простій реакції, присутність невеликих кількостей металів, ймовірно, не виявиться важливим фактором. Однак, якщо кислоту використовують для мінералізації проби з наступним визначенням слідів металів методом атомно-абсорбційної спектрометрії, то цілком очевидно, що присутність домішок металів може істотно спотворити результати аналізу. Для вищеописаного застосування необхідно скористатися кислотами високого ступеня чистоти, які практично не містять домішок металів.

Аналогічно, існує безліч способів застосування органічних рідин. Наприклад, гексан, що містить, як правило, домішки ароматичних сполук, згідно з низкою методик застосовують для екстракції з проб неполярні хімічні сполуки. При подібному застосуванні

наявність домішок в гексані може виявитися важливим (або не важливим) фактором. Проте, якщо гексан призначений для використання в якості розчинника в УФ-спектроскопії або аналізу методом ВЕРХ з детектуванням по УФ-поглинання або флуоресцентним детектуванням, то слід враховувати, що присутність ароматичних домішок зробить гексан менш прозорим в УФ-області. Важливо вибрати відповідний клас чистоти реактивів.

Маркування

Маркування – досить істотний аспект лабораторного менеджменту. Правильний дизайн і застосування етикеток забезпечує користувача чіткою інформацією про ідентичність і статус реактивів, хімічних стандартів, апаратури і устаткування. Існує ряд вимог, яким повинна відповідати етикетка на контейнері.

- Етикетка повинна бути надійно прикріплена до корпусу (але не до кришки) контейнера.

- На етикетці має бути достатньо місця для розміщення всієї необхідної інформації.

- Напис на етикетці має бути практично незмивним або захищеним від розмивання або забруднення.

З вищесказаного можливі винятки, тому слід пам'ятати про призначення етикетки. При приготуванні вагових розчинів часто доводиться використовувати кілька ідентичних контейнерів з кришками. У цьому випадку важливо чітко маркувати і контейнер, і відповідну кришку. Іноді етикетки не можуть зберігати постійну вагу – в цьому випадку написи, зроблені безпосередньо на контейнері, можуть виявитися кращим виходом з положення. Виливати і наливати рідини/розчинники слід з великою обережністю, щоб інформація на етикетці не виявилася втраченою.

Приготування реактивів

Часто виникає необхідність у приготуванні окремих реактивів. Можливо, комусь це здається звичайною лабораторною роботою, проте її значення часто недооцінюють. Тут зазвичай з'являється джерело похибки, і є сенс витратити час на те, щоб переконатися, що реактиви і особливо хімічні стандарти приготовані правильно.

Тут працюють дуже прості принципи. Дотримуйтесь робочих інструкцій, дотримуйтесь правил техніки безпеки, використовуйте обладнання належним чином і завжди пам'ятайте: необхідно переконатися в тому, що ви розумієте, що робите, перед тим, як приступити до роботи.

Деякі інструкції можна тлумачити неправильно, якщо не прочитати їх уважно.

Утилізація відходів

Важливим аспектом належної лабораторної практики є утилізація відходів хімічних реактивів, проб і витратних матеріалів. Існують надзвичайно суворі нормативи, що стосуються відходів, які зливаються безпосередньо в каналізаційну мережу. Можливо, допустимо зливати безпосередньо в каналізацію деякі хімікати одночасно з великими обсягами води. Існують особливі інструкції по збору та ліквідації відходів інших матеріалів, і їм необхідно слідувати. До них включені такі способи як збір окремих типів хімічних відходів у контейнери для подальшого знищення спалюванням або захоронення і т. д.

Сховища, такі як холодильники, морозильні камери та лабораторні шафи необхідно регулярно перевіряти і позбавлятися від накопичених непотрібних предметів. Реактиви та стандарти із закінченими термінами придатності; проби, яких необхідність зберігання відпала, слід ліквідувати відповідно до правил. Записи, що містять інформацію про те, що, коли і, ймовірно, яким чином ліквідовано, повинні бути в ідеальному порядку.

5.4.6. Технічне обслуговування та калібрування обладнання

Розумно розраховувати на те, що нове обладнання буде працювати з максимальною ефективністю, проте воно може швидко прийти в непридатність, якщо його неправильно обслуговують і належно не калібрують. Технічне обслуговування обладнання може бути плановим або ж виконаним з метою ремонту. Деякі прості операції в рамках технічного обслуговування може виконувати користувач, проте в більшості випадків відповідальність за нього

бере на себе виробник, постачальник або сертифікований агент. Звернення за «професійним технічним обслуговуванням» може бути умовою гарантійних зобов'язань, а ремонт «власними силами» може призвести до визнання гарантії недійсною.

При необхідності планового обслуговування укладається контракт на регулярне профілактичне технічне обслуговування інструмента з частотою, що залежить від характеру технічного обслуговування. Планове обслуговування являє собою спосіб підтвердження того, що інструмент знаходиться в «доброму стані», а також ідентифікації довгострокових проблем. Планове технічне обслуговування не дає гарантії від раптової поломки інструменту, хоча іноді в угоду з виробником включають пункт про пільгове обслуговуванні в разі раптової поломки.

Технічне обслуговування з метою усунення пошкодження передбачає виклик інженера лише у випадку поломки інструменту, яку не може усунути користувач. Якщо користувач не здійснював щоденний догляд за інструментом, то досить імовірно, що інструмент просто «заїздили», що викликало поломку. Таким чином, більша частина відповідальності за збереження інструменту лягає на користувача.

Профілактичне обслуговування є більш досконалим способом підтримки інструментів у робочому порядку. На перший погляд здається, що контракт на профілактичне обслуговування є більш дорогим варіантом з двох можливих. Однак у довгостроковій перспективі, з урахуванням таких факторів як термін служби інструменту і втрата часу через простій, виявляється, що цей варіант більш дешевий.

У проміжку між зовнішніми сервісними візитами співробітники лабораторії повинні виконувати прості щоденні операції з обслуговування обладнання. Природно, інструмент слід утримувати в чистоті, зокрема, необхідно якнайшвидше очищати обладнання від пролитих хімічних речовин. Інші прості способи перевірки, які можна виконувати в лабораторії, як правило, перераховані у «Вказівках» виробника.

Регулярне калібрування і верифікація підтверджують, що параметри, які вимірюються конкретним інструментом, можуть

бути співвіднесені з визнаним стандартом. Частота калібрування інструмента може бути різною, залежно від способу застосування. Якщо в ході верифікації робочих характеристик інструменту було показано, що інструмент підтримує точність калібрування протягом приблизно трьох місяців, то калібрування слід повторювати з інтервалом близько двох місяців. Проте, верифікація (перевірка придатності системи) виконується кожен раз при виконанні аналізу проб. При виконанні деяких критично важливих аналізів калібрування слід проводити для кожної партії проб або, у надзвичайних випадках, для кожної окремої проби.

Сучасні інструменти з мікропроцесорним управлінням найчастіше забезпечені «внутрішнім стандартом» і проходять автоматичну верифікацію кожного разу при використанні інструменту. Це може виявитися досить корисним, якщо стандарт може бути порівняний з калібрувальними стандартами, який необхідний при перевірці. Щоб це перевірити, необхідно провести підтверджуючий вимір вручну з використанням зовнішнього стандарту. Наприклад, перевірку внутрішнього стандарту маси на електронних вагах можна провести за допомогою набору каліброваних гир. Якщо в результаті процедури підтвердження виявляється, що показання приладів виходять за рамки заданих допусків, то потрібно провести певні коригувальні дії. Ймовірно, доведеться заново налаштувати інструмент, щоб вимірювання проводилися відповідно до специфікації; можливо, буде потрібно візит спеціаліста з технічного обслуговування.

У «зразковому господарстві» процедури верифікації повинні бути повністю документовані. Там, де лабораторія прагне відповідати певному стандарту менеджменту якості, існують суворі вимоги до управління згаданою документацією. Калібрування/верифікація є дуже важливим аспектом проведення вимірювання; весь процес вимірювання опирається на надійне калібрування. Документація повинна включати інформацію про реальну процедуру та якусь «область техніки» до вказівок, коли слід проводити коректувальні дії, які корегувальні дії необхідно зробити, а також як реєструвати дані про калібрування. Хід процедур калібрування/верифікації слід акуратно і ретельно документувати,

оскільки крім того, що ці документи служать доказом правильного функціонування системи, вони вказують на погіршення робочих характеристик інструменту і необхідність коригувальних дій або технічного обслуговування. Наприклад, відгук спектрометра при введенні певного хімічного стандарту довгий час залишався постійним, оскільки прилад працював справно. У міру розвитку дефекту в детекторі спектрометра відгук на хімічний стандарт змінювався, що відображають результати, отримані в ході верифікації.

Лабораторія повинна скласти план, що містить наступну інформацію: які робочі характеристики слід перевіряти для кожного приладу; чому необхідні подібні перевірки і як їх треба проводити. Документи, що встановлюють періодичність технічного обслуговування та перевірки робочих характеристик для певних інструментів представлені в «Посібнику з якості в аналітичній хімії» СІТАС/Eurachem.

5.4.7. Основи статистики

Сукупності та вибірки

При проведенні хімічного аналізу ми майже завжди зацікавлені в вимірах щодо малої кількості проб, обраних із набагато більшої кількості потенційних проб. Таким чином, отримані дані представляють вибірку з набагато більшою сукупності даних. Ми використовуємо наші вибірові дані для оцінки характеристик відповідної сукупності даних, з яких зроблена вибірка.

Опис розподілу даних

Аналітику доручили визначити концентрацію холестеролу в упаковці спреду з низьким вмістом жиру. Аналітик взяв з упаковки десять проб і визначив концентрацію холестеролу в кожній пробі. Результати дослідження представлені в табл. 5.3.

Таблиця 5.3. – Результати визначення холестеролу

Холестерол	мг/100 г
271,4	268,4
267,8	269,6
268,7	272,5
269,6	270,1
269,7	268,6

Ці десять результатів є вибіркою з великої за об'ємом сукупністю даних, оскільки теоретично аналітик міг би відібрати з упаковки спреду з низьким вмістом жиру набагато більше проб. Через неминучі випадкові похибки результати повторних вимірів завжди відрізняються один від одного. На рис. 5.11. представлена частотна діаграма (гістограма) даних. Стовпці уздовж горизонтальної осі представляють діапазон результатів, а по вертикальній осі відкладають частоти, з якими результати з'являються в кожному діапазоні (стовпці).

Аналітика можуть зацікавити три оцінки, які можна зробити на підставі даних, представлених на рис. 5.11, а саме:

- оцінка дійсної величини параметра, що вимірюється (тобто реальній концентрації холестеролу в упаковці спреду);
- оцінка розкиду результатів (тобто наскільки різняться результати окремих вимірювань);
- оцінка розбіжності оціночних значень істинних величин для різних наборів даних.

На рис. 5.12 представлена частотна діаграма для більшої вибірки даних (1000 експериментальних точок), яка була побудована виходячи з набору даних, представлених в табл. 5.3, за допомогою комп'ютерної програми.

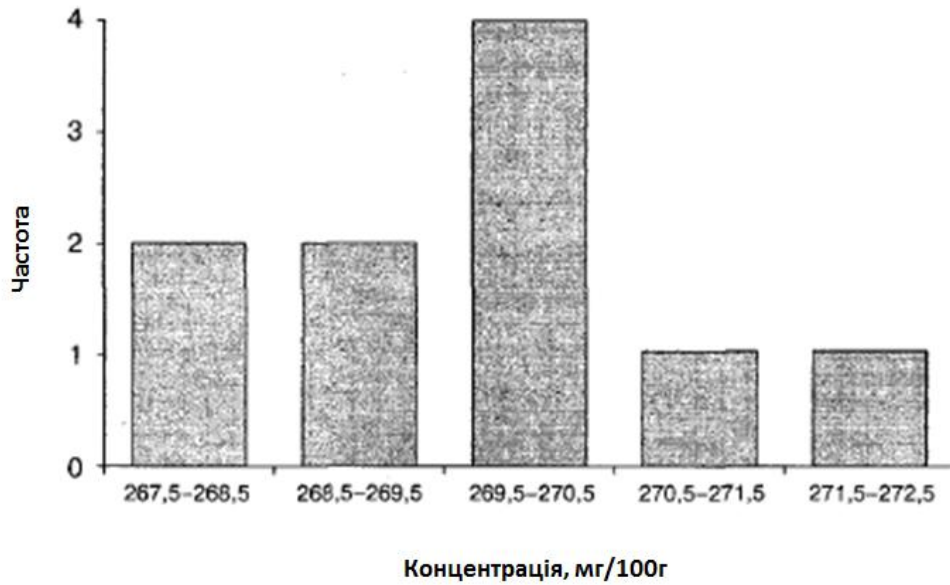


Рис. 5.11. Частотна діаграма (гістограма) даних, представлених в табл. 5.3

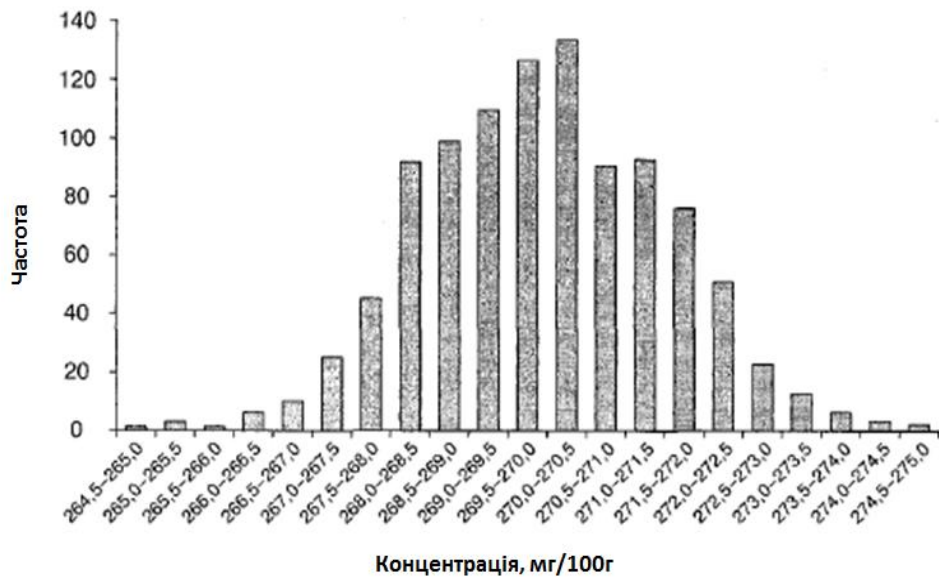


Рис 5.12. Розподіл набору даних, імітованих на підставі даних, представлених у табл. 5.3

При великому об'ємі вибірки гістограма представляє набагато чіткішу картину розподілу даних. Потрібно звернути увагу, що результати сконцентровані в центральній частині гістограми, а

розподіл є приблизно симетричним. Нарешті, для дуже великого масиву даних і великої кількості стовпців, як показано на рис. 5.13, чітко проявляється форма генеральної сукупності. Тепер, коли сукупність даних обмежена плавною кривою, ми можемо, в принципі, визначити рівняння цієї кривої. Розподіл, представлений на рис. 5.13, називають «нормальним розподілом».

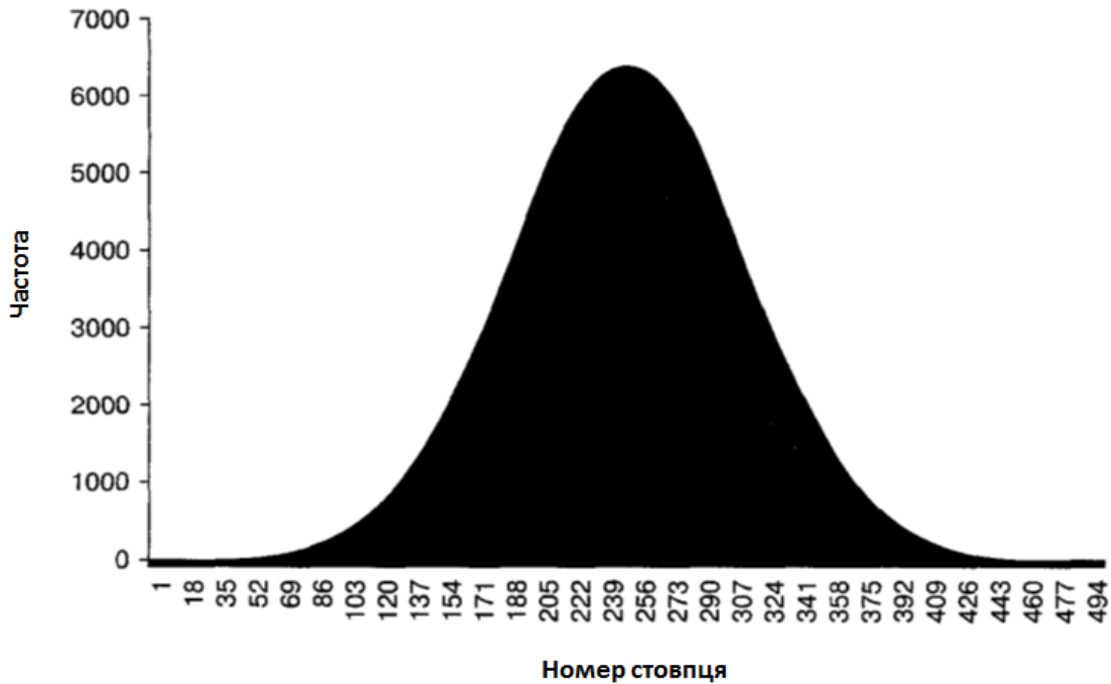


Рис.5.13. Ілюстрація нормального розподілу даних

Нормальний розподіл описує звичайну картину розподілу результатів вимірювань. Цей тип розподілу даних називають також розподілом Гаусса. Більшість результатів вимірювань, багаторазово повторених, укладаються в розподіл Гаусса. При нормальному розподілі більшість результатів групується біля центрального значення, кількість результатів убиває з видаленням від центру. Розподіл існує в нескінченному інтервалі, і значення можуть виявитися на вельми великій відстані від центру, хоча ймовірність цього дуже мала.

Сукупність даних з нормальним розподілом можна охарактеризувати двома параметрами. Центр розподілу одиниць сукупності характеризує параметр μ , а розкид значення характеризує параметр

σ , як показано графічно на рис. 5.14. Параметр μ називають середнім генеральної сукупності, а σ – стандартним відхиленням генеральної сукупності.

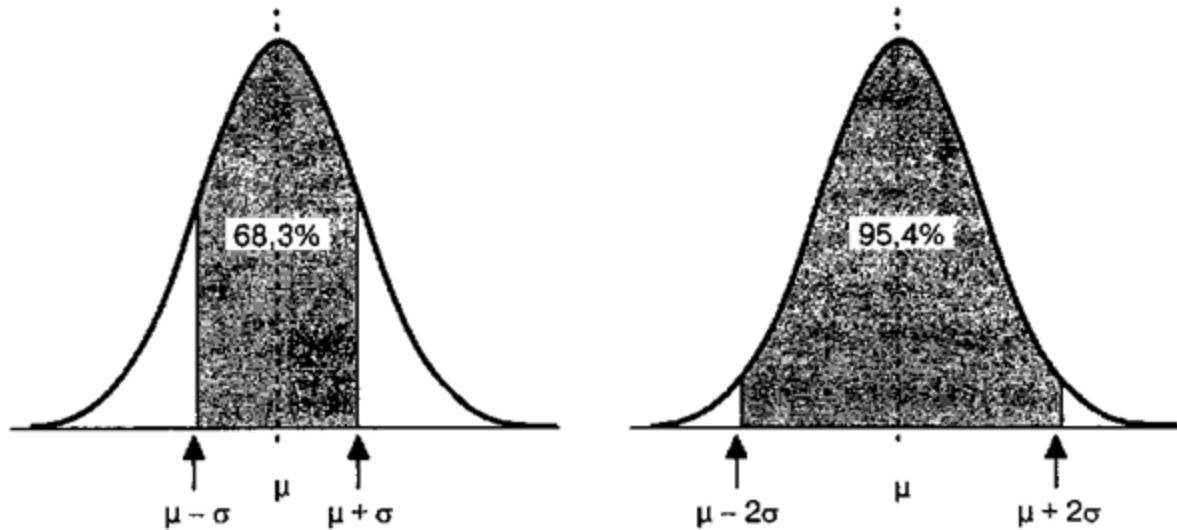


Рис. 5.14. Площі під кривою нормального розподілу

При нормальному розподілі даних 68,3 % значень потрапляють в інтервал ± 1 стандартне відхилення від середнього, а 95,4 % значень знаходяться в інтервалі ± 2 стандартних відхилення від середнього, як показано на рис. 5.14.

Крім того, 99,7 % значень потрапляють в інтервал ± 3 стандартних відхилення від середнього. Таким чином, майже всі значення при нормальному розподілі потрапляють в інтервал ± 3 стандартних відхилення від середнього.

Основні розрахунки

Аналітики зазвичай працюють з вибіркою з більшої сукупності даних. До вибірки вдаються для оцінки характеристик генеральної сукупності, таких як середнє і стандартне відхилення.

А. Середнє

Середнє арифметичне вибірки, x , що включає n експериментальних точок, визначають за формулою:

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n}$$

Якщо вибірка є випадковою, то \bar{x} є найкращою оцінкою середнього генеральної сукупності μ :

$$\mu = \frac{\sum_{i=1}^N x_i}{N}$$

де N – кількість експериментальних точок в генеральній сукупності.

Б. Дисперсія

Дисперсія генеральної сукупності, σ^2 є середньоквадратичне відхилення кожного значення від середнього генеральної сукупності:

$$\sigma^2 = \frac{\sum_{i=1}^N (x_i - \mu)^2}{N}$$

Дисперсія вибірки, s^2 , дорівнює:

$$s^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}$$

В. Стандартне відхилення

Стандартне відхилення являє собою *квадратний корінь* з дисперсії. Стандартне відхилення сукупності розраховують за формулою:

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (x_i - \mu)^2}{N}}$$

в той час як стандартне відхилення вибірки розраховують за формулою:

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

Стандартне відхилення вибірки, s , дозволяє оцінити стандартне відхилення сукупності, σ . Величину $(n - 1)$ в рівняннях часто називають *числом ступенів свободи*, яке в статистичних таблицях часто позначають грецькою буквою ν . За цією величиною роблять висновок про надійність статистичних оцінок, таких як величина стандартного відхилення. Число ступенів свободи – це число експериментальних точок (n) за вирахуванням числа параметрів, які використані для оцінки даних. У випадку стандартного відхилення вибірки, наприклад, $\nu = n - 1$, оскільки середнє значення, яким скористалися при обчисленні s вже було розраховано з тих же даних.

Г. Відносне стандартне відхилення і коефіцієнт варіації

Найчастіше користуються відносними оцінками розкиду даних, особливо у випадках, коли, наприклад, розкид результатів зростає при підвищенні концентрації аналіту. Відносне стандартне відхилення (RSD) є мірою розкиду даних в порівнянні з середньою величиною по масиву даних:

$$RSD = \frac{s}{\bar{x}}$$

Відносне стандартне відхилення відомо також як коефіцієнт варіації (CV). Величину RSD часто висловлюють у відсотках:

$$\%RSD = \%CV = 100 \times \frac{s}{\bar{x}}$$

Д. Стандартне відхилення середнього

При певному постійному розкіді даних (стандартне відхилення, s), у міру збільшення масиву даних, наша впевненість в оцінці середньої величини X , що є точним поданням середнього по сукупності, μ , зростає.

У міру збільшення кількості спостережень, n , в кожній вибірці, стандартне відхилення середніх значень зменшується. Це показано на рис. 5.15.

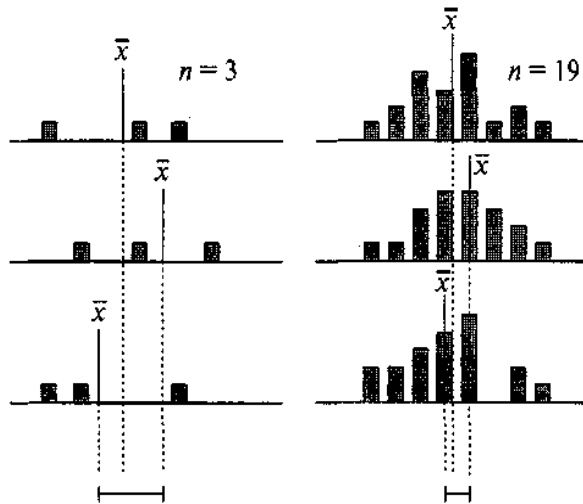


Рис. 5.15. Зменшення дисперсії середніх значень при збільшенні обсягу вибірки n

Стандартне відхилення середнього, $s(\bar{x})$, являє собою оцінку дисперсії середніх величин:

$$s(\bar{x}) = \frac{s}{\sqrt{n}}$$

де S – стандартне відхилення вибірки, а n – кількість експериментальних точок у вибірці

Е. Довірчий інтервал для середнього

Довірчий інтервал позначає інтервал значень, в який з певним рівнем достовірності потрапляє істинне середнє. Його розраховують шляхом множення стандартного відхилення середнього на відповідне значення $t_{(v, \alpha)}$

$$\bar{x} \pm t_{(v, \alpha)} \times \frac{s}{\sqrt{n}}$$

де $t_{(v, \alpha)}$ – є t-критерій Стьюдента, взятий зі статистичних таблиць (таблиця значень t-критерію Стьюдента подано в Додатку 2). Відповідна величина t залежить від $(n - 1)$, тобто кількості ступенів свободи і від необхідного рівня вірогідності. У багатьох статистичних таблицях рівень вірогідності представлений через α – ймовірність попадання величини за межі вказаного інтервалу. Рівень вірогідності, виражений у відсотках, дорівнює $100 \times (1 - \alpha)$. Наприклад, для 95 % достовірності, α дорівнює 0,05.

Крім того, використовується поняття «рівень значущості». Це величина, виражена у відсотках: 95 % рівень вірогідності відповідає 5 % рівнем значущості. Якщо відомий довірчий інтервал, то можемо сказати: «Частка випадків збігу середнього, що досліджується з істинним середнім в межах зазначеного інтервалу дорівнює $(1 - \alpha)$ ». Точно також, частка випадків випадання середнього за межу зазначеного інтервалу за аналогічних експериментів дорівнює α .

Контрольні питання

1. Організація системи управління якістю в лабораторії:
 - роль персоналу у системі управління якістю;
 - розроблення плану перевірки компетентності персоналу;
 - послідовність дій щодо оцінювання та підтримання компетентності персоналу;
 - аналіз потенційних проблем із замовниками;
 - методи вимірювання задоволеності.
2. Кількість проб і розмір проби:
 - невизначеність відбору проби, кількість первинних проб.
3. Відбір субпроби:
 - методика відбору субпроби.
4. Важливість правильної пробопідготовки і зберігання проб.
5. Робочі характеристики методик, які використовуються.
6. Робочі характеристики вибраних методик для визначення аналітів:
 - розділення тонкошаровою хроматографією;
 - розділення газовою або рідинною хроматографією.
7. Причини неправильних аналітичних результатів.
8. Розрахунок правильності зміщення.
9. Перевірка лінійності.
10. Проведення метрологічної простежуваності:
 - зразки порівняння;
 - хімічні стандарти.
12. Запис розподілення даних.
13. Стандартне відхилення.
14. Відносне стандартне відхилення.
15. Вірогідний інтервал для середнього.
16. Застосування статистичних методів у програмах перевірки кваліфікації лабораторії.

РЕКОМЕНДОВАНА ЛІТЕРАТУРА

1. Загальні вимоги до компетентності випробувальних та калібрувальних лабораторій: ДСТУ ISO/IEC 17025:2006. – [Введ. в дію 27 грудня 2006 р.]. – К.: Держспоживстандарт України, 2007. – 26 с.

2. Медичні лабораторії. Вимоги до якості та компетентності: ДСТУ EN ISO 15189:2015. – [Введ. в дію 01 січня 2016 р.]. – К.: Держспоживстандарт України, 2016. – 20 с.

3. Одноралов В. М. Калібрування та повірка засобів вимірювальної техніки: відмінності та збіжності / В. М. Одноралов // Метрологія. – 2014. – С. 49–52.

4. Причард Э. Контроль качества в аналитической химии / Э. Причард, В. Барвик // Перевод с англ. языка под ред Болдырева И. В. – СПб.: ЦОП «Профессия», 2012. – 320 с.

5. Системи управління якістю. Вимоги: ДСТУ ISO 9001:2015 (ISO 9001:2015, IDT). – [Введ. в дію 31 грудня 2015 р.]. – К.: ДП «УкрНДНЦ», 2016. – 22 с.

6. Системи управління якістю. Основні положення та словник термінів: ДСТУ ISO 9000:2015 (ISO 9000:2015, IDT). – [Введ. в дію 12 грудня 2015 р.]. – К.: ДП «УкрНДНЦ», 2016. – 45 с.

7. Суліма Л. О. Вимоги до керівництва медичних лабораторій згідно міжнародного стандарту ISO 15189:2003 / Л. О. Суліма // Збірник наукових праць ОДАТРЯ. – 2013. – № 1(2). – С. 37–40.

8. Accuracy (Trueness and Precision) of Measurement Methods and Results – Part 1: General Principles and Definitions, ISO 5725-1:1994, International Organization for Standardization (ISO), Geneva, Switzerland, 1994.

9. Accuracy (Trueness and Precision) of Measurement Methods and Results. – Part 2: Basic Method for the Determination of Repeatability and Reproducibility of a Standard Measurement Method, ISO 5725-2:1994, International Organization for Standardization (ISO), Geneva, Switzerland, 1994.

10. Accuracy (Trueness and Precision) of Measurement Methods and Results – Part 3: Intermediate Measures of the Precision of a Standard Measurement Method, ISO 5725-3:1994, International Organization for Standardization (ISO), Geneva, Switzerland, 1994.

11. Accuracy (Trueness and Precision) of Measurement Methods and Results – Part 4: Basic Methods for the Determination of the Trueness of a Standard Measurement Method', ISO 5725-4:1994, International Organization for Standardization (ISO), Geneva, Switzerland, 1994.

12. Accuracy (Trueness and Precision) of Measurement Methods and Results – Part 5: Alternative Methods for the Determination of the Precision of a Standard Measurement Method, ISO 5725-5:1998, International Organization for Standardization (ISO), Geneva, Switzerland, 1998.

13. Miller, J. N. and Miller, J. M., *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry*, 5th Edition, ISBN 0-13-129192-0, Pearson Education Ltd, Harlow, UK, 2005.

14. Sargent, M. and Holcombe, G., *VAM Bull*, Iss. 34, 19-23 (2006). [<http://www.nmschembio.org.uk>] (accessed 8 November, 2007).

15. Statistical Methods for Use in Proficiency Testing by Interlaboratory Comparisons, ISO 13528:2005, International Organization for Standardization (ISO), Geneva, Switzerland, 2005.

ЧАСТИНА VI

СТАНДАРТИ І СТАНДАРТИЗАЦІЯ В ЛАБОРАТОРНІЙ ПРАКТИЦІ

Стандарт – норма, зразок, мірило, основа; типовий вигляд виробів, що задовольняє певні умови по відношенню якості, хімічного складу, фізичних властивостей, міри, ваги і т. д. Стандарт означає: 1) встановлення в нормативному (загальнодержавному чи відомчому) порядку строго визначених параметрів якості, форм і розмірів виробів, обов'язкових для виробників і споживачів; 2) узагальнення багатьох виробів до невеликого числа типових, що дозволяє більш раціонально організувати виробництво.

Стандартизація має велике значення для підвищення продуктивності праці, для зниження собівартості і кращої організації виробництва. Особливої уваги питанням стандартів та стандартизації надається в усіх галузях народного господарства, у тому числі експериментальних та наукових дослідженнях.

Обладнання, посуд і техніка безпеки роботи в лабораторії

ДСТУ 2295–93 Прилади холодильні електричні побутові.
Загальні технічні умови

ДСТУ 3021-95 Випробування і контроль якості продукції.
Терміни та визначення

ДСТУ 3911-99 Охорона природи. Поводження з відходами.
Виявлення відходів і подання інформаційних даних про відходи.
Загальні вимоги

ДСТУ 2708-06 Метрологія. Повірка засобів вимірювальної техніки. Організація та порядок проведення

ДСТУ EN 45002-98 Загальні вимоги до атестації випробувальних лабораторій

ДСТУ ISO 3696-2003 Вода для застосування в лабораторіях.
Вимоги та методи перевірення

ДСТУ ISO 10993-2:2004 Біологічне оцінювання медичних виробів. Частина 2. Вимоги щодо утримання тварин

ДСТУ ISO 14644-1:2004 Чисті приміщення і пов'язані з ними контрольовані середовища. Частина 1. Класифікація чистоти повітря

ГОСТ 24104-88 Весы лабораторные общего назначения и образцовые. Общие технические условия (Ваги лабораторні загального призначення і зразкові. Загальні технічні умови)

ГОСТ 28498-90 Термометры жидкостные стеклянные. Общие технические требования. Методы испытаний (Термометри рідинні скляні. Загальні технічні вимоги. Методи випробувань)

ГОСТ 14919-83 Электроплиты, электроплитки и жарочные электрошкафы бытовые. Общие технические условия (Електроплити, електроплитки і жарочні шафи побутові. Загальні технічні умови)

ГОСТ 9147-80 Посуда и оборудование лабораторные фарфоровые. Технические условия (Посуд і обладнання лабораторні фарфорові. Технічні вимоги)

ДСТУ ISO 4787:2009 Посуд лабораторний скляний. Посуд мірний. Методи використання та перевіряння місткості (ISO 4787:1984, IDT)

ДСТУ ISO 1042:2005 Посуд лабораторний скляний. Колби мірні з однією позначкою (ISO 1042:1998, IDT)

ГОСТ 29169-91 (ISO 648-77) Посуда лабораторная стеклянная. Пипетки с одной отметкой (Посуд лабораторний скляний. Піпетки з однією міткою)

ГОСТ 25336-82 Посуда и оборудование лабораторные стеклянные. Типы, основные параметры и размеры (Посуд і обладнання лабораторні скляні. Типи, основні параметри і розміри)

ГОСТ 20292-74 Приборы мерные лабораторные стеклянные. Бюретки, пипетки. Технические условия (Прилади мірні лабораторні скляні. Бюретки, піпетки. Технічні умови)

ГОСТ 24104-88 Весы лабораторные общего назначения и образцовые. Общие технические условия (Терези лабораторні загального призначення та зразкові. Загальні технічні умови)

ГОСТ 12026-76 Бумага фильтровальная лабораторная. Технические условия (Папір фільтрувальний лабораторний. Технічні вимоги)

ГОСТ 21240-2005 Скальпели и ножи медицинские. Общие технические требования и методы испытаний. (Скальпелі та ножі медичні. Загальні технічні вимоги і методи випробувань)

ГОСТ 9412-93 Марля медицинская. Общие технические условия (Марля медична. Загальні технічні умови)

ГОСТ 24760-81 Халаты медицинские женские. Технические условия (Халати медичні жіночі. Технічні умови)

ГОСТ 25194-82 Халаты медицинские мужские. Технические условия (Халати медичні чоловічі. Технічні умови)

ГОСТ 12.1.003-83 ССБТ. Шум. Общие требования безопасности. (ССБ. Шум. Загальні вимоги безпеки)

ГОСТ 12.1.004-91 ССБТ. Пожарная безопасность. Общие требования (ССБП. Пожежна безпека. Загальні вимоги)

ГОСТ 12.4.013-89 Средства защиты работающих. Общие требования и классификация (Засоби захисту працюючих. Загальні вимоги та класифікація)

ГОСТ 12.1.005-88 ССБТ. Общие санитарно-гигиенические требования к воздуху рабочей зоны (ССБП. Загальні санітарно-гігієнічні вимоги до повітря робочої зони)

ГОСТ 12.1.007-76 ССБТ. Вредные вещества. Классификация и общие требования безопасности (ССБП. Шкідливі речовини. Класифікація та загальні вимоги безпеки)

ГОСТ 12.1.018-93 ССБТ. Пожаровзрывобезопасность статического электричества. Общие требования (ССБП. Пожежовибухобезпека статичної електрики. Загальні вимоги)

ГОСТ 12.1.019-79 ССБТ. Электробезопасность. Общие требования и номенклатура видов защиты (ССБП. Електробезпека. Загальні вимоги та номенклатура видів захисту)

ГОСТ 12.1.030-81 ССБТ. Электробезопасность. Защитное заземление, зануление (ССБП. Електробезпека. Захисне заземлення, занулення)

ГОСТ 12.4.021-75 ССБТ. Системы вентиляционные. Общие требования (ССБП. Системи вентиляційні. Загальні вимоги)

ГОСТ 17.2.3.02-78 Охрана природы. Атмосфера. Правила установления допустимых выбросов вредных веществ промышленными предприятиями (Охорона природи. Атмосфера. Правила

встановлення допустимих викидів шкідливих речовин промисловими підприємствами)

ДСТУ EN 1040:2004 Засоби хімічні дезінфекційні та антисептичні. Основна бактерицидна активність. Частина 1. Метод випробування та вимоги (стадія 1) (EN 1040:1997, IDT)

ISO 15883-2:2006 Washer-disinfectors -- Part 2: Requirements and tests for washer-disinfectors employing thermal disinfection for surgical instruments, anaesthetic equipment, bowls, dishes, receivers, utensils, glassware, etc. (Мийки-дезінфектори – Частина 2: Вимоги та випробування мийок-дезінфекторів із використанням термічної дезінфекції хірургічних інструментів, анестезіологічного обладнання, мисок, тарілок, приймачів, посуду, виробів зі скла, і т. д.)

Вимоги до роботи з біологічним матеріалом

ISO 3826-1:2013 Plastics collapsible containers for human blood and blood components – Part 1: Conventional containers (Пластмаси складні контейнери для людської крові та компонентів крові – Частина 1: Звичайні контейнери)

ISO/PAS 18761:2013 Use and handling of medical devices covered by the scope of ISO/TC 84 – Risk assessment on mucocutaneous blood exposure (Використання та обіг медичних виробів, що підпадають під сферу ISO / TC 84 – Оцінка ризику слизових оболонок при контакті з кров'ю)

ISO 6710:1995 Single-use containers for venous blood specimen collection (Одноразові контейнери для збору зразків венозної крові)

ISO 10993-4:2002 Biological evaluation of medical devices – Part 4: Selection of tests for interactions with blood (Біологічна оцінка медичних виробів – Частина 4: Вибір тестів, взаємодіючих з кров'ю)

ISO 27368:2008 Analysis of blood for asphyxiant toxicants – Carbon monoxide and hydrogen cyanide (Аналіз крові для ядучих токсикантів – окису вуглецю і ціаністого водню)

Методи визначення вуглеводів

ISO 15197:2013 In vitro diagnostic test systems – Requirements for blood-glucose monitoring systems for self-testing in managing

diabetes mellitus (Діагностична тест-система *in vitro* – вимоги до систем моніторингу глюкози крові в самотестуванні цукрового діабету)

ISO 10504:2013 Starch derivatives – Determination of the composition of glucose syrups, fructose syrups and hydrogenated glucose syrups – Method using high-performance liquid chromatography (Похідні крохмалю – визначення складу сиропів глюкози, фруктози сиропи і гідрогенізованих сиропів глюкози – Метод з використанням високо-ефективної рідинної хроматографії)

ISO 1743:1982 Glucose syrup – Determination of dry matter content – Refractive index method (Глюкозний сироп – Визначення вмісту сухої речовини – Метод показника заломлення)

ДСТУ 2211-93 Крохмаль та крохмалепродукти. Терміни та визначення

ДСТУ ISO 5554:2005 Продукти м'ясні. Метод визначення вмісту крохмалю (контрольний метод)

ДСТУ ISO 6493:2008 Корми для тварин. Визначення вмісту крохмалю поляриметричним методом

ISO 10520:1997 Native starch – Determination of starch content – Ewers polarimetric method. (Нативний крохмаль – Визначення вмісту крохмалю – Поляриметричний метод Еверса)

ДСТУ ISO 15914:2008 Корми для тварин. Метод ферментативного визначення загального вмісту крохмалю

ISO 1666:1996 Starch – Determination of moisture content – Oven-drying method (Крохмаль – Визначення вмісту вологи – Метод висушування в печі)

ДСТУ ISO 5381-2001 Продукти гідролізу крохмалю. Метод визначання вмісту води. Модифікована методика Карла Фішера

ISO 12779:2011 Lactose – Determination of water content – Karl Fischer method (Лактоза – Визначення вмісту води – Метод Карла Фішера)

ДСТУ ISO 11214:2004 Крохмаль модифікований. Визначення вмісту карбоксильної групи в окисненому крохмалі

ДСТУ ISO 11213-2001 Крохмаль модифікований. Визначення вмісту ацетилю. Ензиматичний метод

ДСТУ ISO 5377-2001 Продукти гідролізу крохмалю. Визначення відновлювальної здатності і декстрозного еквівалента. Метод Лейна і Ейнана з постійним титром

ДСТУ ISO 10504:2004 Продукти гідролізу крохмалю. Визначення складу глюкозних сиропів, фруктозних і гідрогенізованих глюкозних сиропів методом рідинної хроматографії високо роздільної здатності

ISO 11215:1998 Modified starch – Determination of adipic acid content of acetylated di-starch adipates – Gas chromatographic method. (Модифікований крохмаль – Визначення вмісту адипінової кислоти ацетильованих дикрохмальних адипатів – Метод газової хроматографії)

ISO 11216:1998 Modified starch – Determination of content of carboxymethyl groups in carboxymethyl starch. (Модифікований крохмаль – Визначення вмісту карбоксиметильних груп у карбоксиметильованому крохмалі)

ДСТУ ISO 13965:2007 М'ясо та м'ясні продукти. Визначення масової частки крохмалю та глюкози ферментативним методом

ISO 11543:2000 Modified starch – Determination of hydroxypropyl content – Method using proton nuclear magnetic resonance (NMR) spectrometry (Модифікований крохмаль – Визначення вмісту гідроксопропільних груп – Метод з використанням протоноядерномагнітно-резонансної спектроскопії)

ISO 22662:2007 Milk and milk products – Determination of lactose content by high-performance liquid chromatography (Reference method) (Молоко і молочні продукти. Визначення вмісту лактози методом високоефективної рідинної хроматографії (стандартний метод))

ДСТУ ISO 5765-1:2005 Молоко сухе, суміші для морозива сухі та плавлений сир. Визначення вмісту лактози. Частина 1. Ферментний метод з використанням глюкозного компоненту лактози

ДСТУ ISO 5765-2:2005 Молоко сухе, суміші для морозива сухі та плавлений сир. Визначення вмісту лактози. Частина 2. Ферментний метод з використанням галактозного компонента лактози

ISO 22662:2007 Milk and milk products – Determination of lactose content by high-performance liquid chromatography (Reference

method) (Молоко і молочні продукти – Визначення вмісту лактози з допомогою високоефективної рідинної хроматографії)

ISO 5548:2004 Caseins and caseinates – Determination of lactose content – Photometric method (Казеїни і казеїнати – Визначення вмісту лактози – Фотометричний метод)

ISO 26462:2010 Milk – Determination of lactose content – Enzymatic method using difference in pH (Молоко – Визначення вмісту лактози – Ензиматичний метод за використання відмінності в pH)

ДСТУ 3661-97 Цукор. Метод визначення сахарози ISO 2911:2004 Sweetened condensed milk – Determination of sucrose content – Polarimetric method (Підсолоджене конденсоване молоко – Визначення вмісту сахарози – Поляриметричний метод)

Методи визначення жирів

ISO 3657:2013 Animal and vegetable fats and oils – Determination of saponification value (Тварини і рослинні жири і масла – Визначення омилення)

ISO 3961:2013 Animal and vegetable fats and oils – Determination of iodine value (Тварини і рослинні жири і масла – Визначення йодного числа)

ISO/TS 22113:2012 Milk and milk products – Determination of the titratable acidity of milk fat (Молоко і молочні продукти – Визначення відтитрованої кислотності молочного жиру)

ISO 17678:2010 Milk and milk products – Determination of milk fat purity by gas chromatographic analysis of triglycerides (Reference method) (Молоко та молочні продукти – Визначення чистоти молочного жиру на газ хроматографічного аналізу тригліцеридів (контрольний метод))

ISO 1211:2010 Milk – Determination of fat content – Gravimetric method (Reference method) (Молоко – Визначення вмісту жиру – Гравіметричний метод (контрольний метод))

ISO/TS 22113:2012 Milk and milk products – Determination of the titratable acidity of milk fat (Молоко та молочні продукти – Визначення титрометричної кислотності молочного жиру)

ДСТУ ISO 5555-2003 Жири тваринні і рослинні та олії. Відбирання проб

ДСТУ ISO 661:2004 Жири тваринні і рослинні та олії. Готування випробного зразка

ДСТУ ISO 2450:2007 Вершки. Визначення масової частки жиру гравіметричним методом (контрольний метод)

ДСТУ ISO 8381:2007 Продукти дитячого харчування на основі молока. Визначення вмісту жиру гравіметричним методом (контрольний метод)

ДСТУ ISO 1735:2005 Сир і плавлений сир. Гравіметричний метод визначення вмісту жиру (контрольний метод)

ДСТУ ISO 6320-2001 Жири та олії тваринні і рослинні. Визначання показника заломлення

ISO 1739:2006 Butter – Determination of the refractive index of the fat (Reference method) (Масло вершкове – Визначення показника заломлення жиру (контрольний метод))

ДСТУ ISO 5511:2006 Насіння олійне. Визначення вмісту олії. Спектрометричний метод ядерного магнітного резонансу низької здатності з використанням безперервної хвилі (Швидкий метод)

ДСТУ ISO 3961:2004 Жири тваринні і рослинні та олії. Визначання йодного числа

ДСТУ 4569:2006 Жири тваринні і рослинні та олії. Методи визначення йодного числа

ISO 23065:2009 Milk fat from enriched dairy products – Determination of omega-3 and omega-6 fatty acid content by gas-liquid chromatography (Молочний жир зі збагачених молочних продуктів – Визначення вмісту омега-3 і омега-6 жирних кислот за допомогою газорідинної хроматографії)

ДСТУ ISO 7847:2006 Жири тваринні і рослинні та олії. Визначання поліненасичених жирних кислот з дис-, цис-1,4-дієновою кислотою

ДСТУ ISO 15884/IDF 182:2008 Жир молочний. Метод приготування метилових ефірів жирних кислот

ДСТУ ISO 15885/IDF 184:2008 Жир молочний. Визначення жирнокислотного складу методом газорідинної хроматографії

ДСТУ ISO 1241-2002 Олії ефірні. Визначання ефірного числа до та після ацетилювання та оцінювання вмісту вільних і загальних спиртів

ДСТУ ISO 875-2002 Олії ефірні. Оцінювання змішуваності з етанолом

ДСТУ ISO 1388-5:2004 Етанол для промислового використання. Методи випробування. Частина 5. Візуальний колориметричний метод. Визначання вмісту альдегідів

ДСТУ ISO 1388-5:2004 Етанол для промислового використання. Методи випробування. Частина 5. Візуальний колориметричний метод. Визначання вмісту альдегідів

ДСТУ ISO 1279:2006 Олії ефірні. Визначення карбонільного числа потенціометричними методами з використанням гідрохлориду гідроксиламіну

ДСТУ ISO 1614-2003 Гліцерин технічний. Відбирання проб і методи випробування. Загальні вимоги

ДСТУ ISO 1066:2004 Мило. Визначення вмісту гліцерину титрометричним методом

ДСТУ ISO 3657:2004 Жири тваринні і рослинні та олії. Визначення числа омилення

ДСТУ ISO 1067:2004 Мило. Визначення неомильних, неомилених та омильних речовин

ISO 28198:2009 Vegetable fats and oils – Determination of toluene insoluble matter (Овочеві жири та олії – Визначення толуол-нерозчинної речовини)

ДСТУ ISO 6799-2002 Жири та олії тваринні і рослинні. Визначення складу стеринової фракції. Газохроматографічний метод

ДСТУ ISO 3594-2001 Жир молочний. Виявлення рослинного жиру методом газорідинної хроматографії стеринів (контрольний метод)

ISO 12078:2006 Anhydrous milk fat – Determination of sterol composition by gas liquid chromatography (Reference method) (Безводний молочний жир – Визначення стерольного складу методом газорідинної хроматографії (контрольний метод))

ДСТУ ISO 18252/IDF 200:2009 Жир молочний зневоднений. Визначення складу стеарину методом газорідинної хроматографії. Практичний метод

ДСТУ ISO 3960-2001 Жири і олії тваринні і рослинні. Визначення пероксидного числа

ДСТУ ISO 3976-2001 Жир молочний зневоднений. Визначення пероксидного числа (контрольний метод)

ДСТУ ISO 3976-2001 Жири молочні зневоднені. Визначення перекисного числа

ДСТУ ISO 6886-2003 Жири тваринні і рослинні та олії. Визначення стійкості до окиснювання (Прискорена проба на окиснюваність)

ISO 27107:2008 Animal and vegetable fats and oils – Determination of peroxide value – Potentiometric end-point determination (Тваринні та рослинні жири і масла – Визначення перекисного числа – Потенціометричне визначення кінцевої точки)

ДСТУ ISO 3960-2001 Жири тваринні і рослинні та олії. Визначення перекисного числа

ДСТУ ISO 1740:2005 Жир молочний та масло. Визначення кислотності жиру (контрольний метод)

ДСТУ ISO 1740:2005 Жир молочний та масло. Визначення кислотності жиру (контрольний метод)

ДСТУ ISO 14156:2005 Молоко та молочні продукти. Методи екстрагування ліпідів та ліпорозчинних сполук

ДСТУ ISO/TS 17764-1:2005 Корми для тварин. Визначення вмісту жирних кислот. Частина 1. Готування метилових ефірів

ДСТУ ISO/TS 17764-2:2005 Корми для тварин. Визначення вмісту жирних кислот. Частина 2. Газохроматографічний метод

ДСТУ ISO 9832:2004 Жири тваринні і рослинні та олії. Визначення залишкового вмісту технічного гексану

ДСТУ ISO 9832:2004 Жири тваринні і рослинні та олії. Визначення залишкового вмісту технічного гексану

ДСТУ ISO 5508-2001 Жири та олії тваринні й рослинні. Аналізування методом газової хроматографії метилових ефірів жирних кислот

ДСТУ ISO 5509-2002 Жири та олії тваринні і рослинні. Приготування метилових ефірів жирних кислот

ISO 12966-3:2009 Animal and vegetable fats and oils – Gas chromatography of fatty acid methyl esters – Part 3: Preparation of methyl esters using trimethylsulfonium hydroxide (TMSH) (Тваринні та рослинні жири і масла – Газова хроматографія метилових ефірів

жирних кислот. Частина 3: Виділення метилових ефірів за використання триметилсульфонія гідроксиду (TMSPP)

ДСТУ ISO 5558:2004 Жири тваринні і рослинні та олії. Визначання та ідентифікування антиоксидантів. Метод тонкошарової хроматографії

ГОСТ 23042-86. Мясо и мясные продукты. Методы определения жира.

Методи визначення білка

ISO 15323:2002 Dried milk protein products – Determination of nitrogen solubility index (Білкові продукти сухого молока. Визначення показника розчинності нітрогену)

ISO 12243:2003 Medical gloves made from natural rubber latex – Determination of water-extractable protein using the modified Lowry method (Медичні рукавички з натурального гумового латексу – Визначення вмісту водорозчинного білка, який екстрагується водою, за допомогою модифікованого методу Лоурі)

ДСТУ ISO 21572:2006 Продукти харчові. Методи аналізу для визначення генетично модифікованих організмів і похідних продуктів. Методи, які ґрунтуються на аналізі білків

ДСТУ ISO 8968-2:2005 Молоко. Визначення вмісту азоту. Частина 2. Метод із використанням блоку для спалювання (макрометод)

ДСТУ ISO 8968-3:2005 Молоко. Визначення вмісту азоту. Частина 3. Метод із використанням блоку для спалювання (прискорений напівмікрометод)

ДСТУ ISO 8968-4:2005 Молоко. Визначення вмісту азоту. Частина 4. Метод визначення небілкового азоту

ДСТУ ISO 8968-5:2005 Молоко. Визначення вмісту азоту. Частина 5. Метод визначення білкового азоту

ДСТУ ISO 1871:2003 Продукти харчові сільськогосподарські. Загальні настанови щодо визначання вмісту азоту методом К'ельдаля

ДСТУ ISO 8968-1:2005 Молоко. Визначення вмісту азоту. Частина 1. Метод К'ельдаля

ДСТУ ISO 937:2005 М'ясо та м'ясні продукти. Визначення вмісту азоту (контрольний метод)

ISO 20541:2008 Milk and milk products – Determination of nitrate content – Method by enzymatic reduction and molecular-absorption spectrometry after Griess reaction (Молоко і молочні продукти – Визначення вмісту нітратів – Метод ферментативного відновлення і молекулярно-абсорбційної спектроскопії після реакції Грісса)

ДСТУ ISO 1594-2003 Сечовина (карбамід) технічна. Визначення вмісту золи

ДСТУ ISO 6654:2005 Корми для тварин. Визначення вмісту сечовини

ДСТУ ISO 1592-2003 Сечовина (карбамід) технічна. Визначення вмісту азоту. Титриметричний метод після дистилювання

ДСТУ ISO 6655:2004 Корми для тварин. Визначення вмісту розчинного азоту після оброблення пепсином у розведеній соляній кислоті

ДСТУ ISO 4274-2003 Сечовина (карбамід) технічна. Визначення вмісту біурету. Методи полуменевої атомної та фотометричної абсорбції

ДСТУ ISO 2754-2003 Сечовина (карбамід) технічна. Визначення вмісту біурету. Фотометричний метод

ДСТУ ISO 5983:2003 Корми для тварин. Визначення вмісту азоту і обчислювання вмісту сирого білка. Метод К'ельдаля

ISO 5983-2:2009 Animal feeding stuffs – Determination of nitrogen content and calculation of crude protein content – Part 2: Block digestion and steam distillation method (Корми для тварин – Визначення вмісту азоту та розрахунок вмісту сирого білка – Частина 2: Блок травлення і перегонки з водяною парою метод)

ISO 20483:2006 Cereals and pulses – Determination of the nitrogen content and calculation of the crude protein content – Kjeldahl method (Зернові і бобові – Визначення вмісту азоту і розрахунок вмісту сирого протеїну – Метод К'ельдаля)

ISO/TS 17837:2008 Processed cheese products – Determination of nitrogen content and crude protein calculation – Kjeldahl method (Плавлені сирні продукти – Визначення вмісту азоту і підрахунок сирого протеїну – Метод К'ельдаля)

ISO 5549:1978 Caseins and caseinates – Determination of protein content (Reference method) (Казеїни і казеїнати – Визначення вмісту білка (контрольний метод))

ДСТУ ISO 17129/IDF 206:2009 Молоко сухе. Визначення білків сої та гороху з використанням капілярного електрофорезу з наявністю додецилсульфату натрію. Перевірочний метод

ISO/TS 16634-2:2009 Food products – Determination of the total nitrogen content by combustion according to the Dumas principle and calculation of the crude protein content – Part 2: Cereals, pulses and milled cereal products (Харчові продукти – Визначення загального вмісту азоту шляхом спалювання згідно з принципом Дюма і розрахунок вмісту сирого білка – Частина 2: Зернові, бобові й мелені зернові продукти)

ISO 16634-1:2008 Food products – Determination of the total nitrogen content by combustion according to the Dumas principle and calculation of the crude protein content – Part 1: Oilseeds and animal feeding stuffs (Харчові продукти – Визначення загального вмісту азоту шляхом спалювання згідно з принципом Дюма і розрахунок вмісту сирого білка – Частина 1: Олійні культури та корми для тварин)

ГОСТ 25011-81. Мясо и мясные продукты. Методы определения белка.

Методи визначення ензимів

ISO 23893-1:2007 Water quality – Biochemical and physiological measurements on fish – Part 1: Sampling of fish, handling and preservation of samples (Якість води – Біохімічні та фізіологічні вимірювання на рибах – Частина 1: Приготування проб з риб, користування ними та їх збереження)

ISO/TS 23893-2:2007 Water quality – Biochemical and physiological measurements on fish – Part 2: Determination of ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) (Якість води – Біохімічні та фізіологічні вимірювання на рибах – Частина 2: Визначення етоксирезоруфін-О-діетилази (*EROD*))

Методи визначення вітамінів

ДСТУ ISO 12080-2:2009 Молоко знежирене сухе. Визначення вмісту вітаміну А. Частина 2. Метод з використанням високоефективної рідинної хроматографії

ДСТУ ISO 14565:2004 Корми для тварин. Визначення вмісту вітаміну А методом рідинної хроматографії високороздільної здатності

ДСТУ ISO 6558-2:2004 Фрукти, овочі та продукти перероблення. Визначення вмісту каротину. Частина 2. Стандартні методи

ДСТУ ISO 14892:2009 Молоко знежирене сухе. Визначення вмісту вітаміну D методом високоефективної рідинної хроматографії

ДСТУ ISO 6867:2005 Корми для тварин. Методи визначення вмісту вітаміну Е з використанням високоефективної рідинної хроматографії

ДСТУ ISO 9936:2004 Жири тваринні і рослинні та олії. Визначення вмісту токоферолів і токотриєнолів. Метод високоефективної рідинної хроматографії

ДСТУ ISO 6867:2005 Корми для тварин. Методи визначення вмісту вітаміну Е з використанням високоефективної рідинної хроматографії

ДСТУ 4687:2006 Комбікорми, премікси, вітамінні препарати, продукція птахівництва. Методи визначення вітамінів А, Е, В2 та каротиноїдів

ДСТУ 2117-93 Продукти переробки овочів та фруктів. Метод визначення вітаміну РР

ДСТУ EN 12823-1:2005. «Продукти харчові. Визначення вмісту вітаміну А методом рідинної хроматографії високороздільної здатності. Частина 1. Вимірювання транс-ретинолу і 13-цис-ретинолу».

Методи визначення нуклеїнових кислот

ISO 16578:2013 Molecular biomarker analysis – General definitions and requirements for microarray detection of specific nucleic acid sequences (Молекулярний аналіз біомаркерів – Загальні визначення

і вимоги до виявлення мікрочіпів специфічних послідовностей нуклеїнових кислот)

ISO 13495:2013 Foodstuffs – Principles of selection and criteria of validation for varietal identification methods using specific nucleic acid (Продукти харчування – Принципи відбору та критерії перевірки для методів ідентифікації сортових використанням конкретної нуклеїнової кислоти)

ISO 22119:2011 Microbiology of food and animal feeding stuffs – Real-time polymerase chain reaction (PCR) for the detection of food-borne pathogens – General requirements and definitions (Мікробіологія харчових продуктів і кормів для тварин – У режимі реального часу полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР) для виявлення харчових патогенних мікроорганізмів – Загальні вимоги та визначення)

ISO 22118:2011 Microbiology of food and animal feeding stuffs – Polymerase chain reaction (PCR) for the detection and quantification of food-borne pathogens – Performance characteristics (Мікробіологія харчових продуктів і кормів для тварин – полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) для виявлення та кількісного визначення харчових патогенів – Технічні характеристики)

ДСТУ 2217-93 Дезоксирибонуклеїнова кислота з тимусу молодняка великої рогатої худоби. Технічні умови

ДСТУ ISO 21569:2008 Продукти харчові. Методи аналізу генетично модифікованих організмів і продуктів з їхнім вмістом. Якісні методи на основі аналізування нуклеїнової кислоти

ДСТУ ISO 21571:2008 Продукти харчові. Методи виявлення генетично модифікованих організмів і продуктів з їхнім вмістом. Екстрагування нуклеїнової кислоти

ДСТУ 4517:2006 Препарати ветеринарні імунобіологічні. Методи виявлення контамінації сторонніми вірусами

ISO 22174:2005 Microbiology of food and animal feeding stuffs – Polymerase chain reaction (PCR) for the detection of food-borne pathogens – General requirements and definitions (Мікробіологія харчових продуктів і кормів для тварин – Полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР) для виявлення харчових патогенних мікроорганізмів – Загальні вимоги та визначення)

ДСТУ ISO 24276:2008 Продукти харчові. Методи виявлення генетично модифікованих організмів і продуктів з їхнім вмістом. Основні вимоги, терміни та визначення понять

ISO 20838:2006 Microbiology of food and animal feeding stuffs – Polymerase chain reaction (PCR) for the detection of food-borne pathogens – Requirements for amplification and detection for qualitative methods (Мікробіологія харчових продуктів і кормів для тварин – полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) для виявлення харчових патогенних мікроорганізмів – Вимоги для ампліфікації і детекції якісними методами)

ДСТУ ISO 21570:2008 Продукти харчові. Методи виявлення генетично модифікованих організмів і продуктів з їхнім вмістом. Кількісні методи на основі аналізування нуклеїнової кислоти

ДСТУ ISO/TS 21098:2009 Продукти харчові. Методи виявлення генетично модифікованих організмів і продуктів з їхнім вмістом. Додаткові процедури та інформація щодо методів аналізування на основі нуклеїнової кислоти, описаних в ISO 21569, ISO 21570, ISO 21571

ДСТУ 2217-93 (ГОСТ 30130-94) Дезоксирибонуклеїнова кислота з тимусу молодняка великої рогатої худоби. Технічні умови

ISO 21569:2005 Foodstuffs – Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products – Qualitative nucleic acid based methods (Продукти харчування – Методи аналізу для виявлення генетично модифікованих організмів і похідних продуктів – Якісні методи, засновані на дослідженнях нуклеїнової кислоти)

ISO 21571:2005 Foodstuffs – Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products – Nucleic acid extraction (Продукти харчування – Методи аналізу для виявлення генетично модифікованих організмів і похідних продуктів – Екстракція нуклеїнових кислот)

Методи визначення якості води, рН і мінеральних речовин

ДСТУ ISO 3696-2003 Вода для застосовування в лабораторіях. Вимоги та методи перевіряння

ДСТУ 4869:2007 Метрологія. Державна повірочна схема для засобів вимірювання рН

ДСТУ 4077-2001 Якість води. Визначання рН (ISO 10523:1994, MOD)

ДСТУ ISO 2917-2001 М'ясо та м'ясні продукти. Визначання рН (контрольний метод)

ДСТУ EN 1262:2007 Речовини поверхнево-активні. Метод визначення рН розчинів чи дисперсій

ДСТУ ISO 5520:2007 Фрукти, овочі та продукти їх перероблення. Методи визначення лужності загальної та водорозчинної золи

ДСТУ ISO 9963-1:2007 Якість води. Визначення лужності. Частина 1. Визначення загальної та часткової лужності

ISO 23893-1:2007 Water quality – Biochemical and physiological measurements on fish – Part 1: Sampling of fish, handling and preservation of samples (Якість води – Біохімічні та фізіологічні вимірювання в риб – Частина 1: Відбір проб риби, обробки та збереження зразків)

ДСТУ ISO 9963-2:2007 Якість води. Визначення лужності. Частина 2. Визначення карбонатної лужності

ДСТУ ISO 1388-2:2003 Етанол для промислового використання. Методи випробовування. Частина 2. Визначення лужності та кислотності за допомогою фенолфталеїну

ДСТУ ISO 6091:2007 Молоко сухе. Визначення титрованої кислотності (контрольний метод)

ДСТУ ISO 6092:2007 Молоко сухе. Визначення титрованої кислотності (ругинний метод)

ДСТУ ISO 6632-2001 Фрукти, овочі та продукти перероблення. Визначення легкої кислотності

ДСТУ EN 1134:2005 Соки фруктові та овочеві. Визначення вмісту натрію, калію, кальцію та магнію спектрометричним методом атомної абсорбції

ДСТУ ISO 1738:2005 Масло вершкове. Визначення вмісту солі (контрольний метод)

ДСТУ ISO 6490-1:2004 Корми для тварин. Визначення вмісту кальцію. Частина 1. Титрометричний метод

ДСТУ ISO 6058-2003 Якість води. Визначення кальцію. Титриметричний метод із застосуванням етилендіамінтетраоцтової кислоти

ДСТУ ISO 2482-2001 Натрію хлорид технічний. Визначення вмісту кальцію та магнію. ЕДТА-комплексометричні методи

ДСТУ ISO 6059-2003 Якість води. Визначення сумарного вмісту кальцію та магнію. Титриметричний метод із застосуванням етилендіамінтетраоцтової кислоти

ДСТУ ISO 5517:2007 Фрукти, овочі та продукти їх перероблення. Визначення вмісту заліза фотометричним методом із застосуванням 1,10-фенантроліну

ДСТУ ISO 6332:2003 Якість води. Визначення заліза. Спектриметричний метод із використанням 1,10-фенантроліну

ДСТУ ISO 983-2001 Натрію гідроксид технічний. Фотометричний метод визначення вмісту заліза із застосуванням 1,10-фенантроліну

ДСТУ ISO 9526:2004 Фрукти, овочі та продукти перероблення. Визначення вмісту заліза. Спектриметричний метод полуменевої атомної абсорбції

ДСТУ ISO/R 1595-2003 Сечовина (карбамід) технічна. Визначення вмісту заліза. Фотометричний метод із застосуванням 2,2'-біпіридилу

ДСТУ ISO 8294:2004 Жири тваринні і рослинні та олії. Визначення вмісту міді, заліза і нікелю. Метод атомної абсорбції з використанням графітової печі

ДСТУ ISO 7952:2004 Фрукти, овочі та продукти їх перероблення. Визначення вмісту міді спектриметричним методом полуменевої атомної абсорбції

ДСТУ ISO 7110:2004 Амонію бікарбонат (амонію гідрокарбонат) технічний (зокрема для харчової промисловості). Визначення вмісту свинцю методом полуменевої атомної абсорбції

ДСТУ ISO 6633-2001 Фрукти, овочі та продукти перероблення. Визначення вмісту свинцю. Спектриметричний метод безполуменевої атомної абсорбції

ДСТУ ISO 11212-1:2004 Крохмаль та похідні продукти. Вміст важких металів. Частина 1. Визначення вмісту миш'яку методом атомної абсорбційної спектрометрії

ДСТУ ISO 11212-2:2004 Крохмаль та похідні продукти. Вміст важких металів. Частина 2. Визначення вмісту ртуті методом атомної абсорбційної спектрометрії

ДСТУ ISO 11212-3:2004 Крохмаль та похідні продукти. Вміст важких металів. Частина 3. Визначення вмісту свинцю методом атомної абсорбційної спектрометрії з електротермічною атомізацією

ДСТУ ISO 11212-4:2004 Крохмаль та похідні продукти. Вміст важких металів. Частина 4. Визначення вмісту кадмію методом атомної абсорбційної спектрометрії з електротермічною атомізацією

ДСТУ ISO 6561:2004 Фрукти, овочі та продукти перероблення. Визначення вмісту кадмію. Спектрометричний метод безполуменевої атомної абсорбції

ДСТУ ISO 6637-2001 Фрукти, овочі та продукти перероблення. Визначення вмісту ртуті. Спектрометричний метод безполуменевої атомної абсорбції

ДСТУ ISO 6634:2004 Фрукти, овочі та продукти їх перероблення. Визначення вмісту миш'яку спектрометричним методом із застосуванням діетилдитіокарбамату

ДСТУ ISO 2447:2004 Фрукти, овочі та продукти перероблення. Визначення вмісту олова

ДСТУ ISO 6636-1:2007 Фрукти, овочі та продукти їх перероблення. Визначення вмісту цинку. Частина 1. Полярографічний метод

ДСТУ ISO 6636-2:2004 Фрукти, овочі та продукти їх перероблення. Визначення вмісту цинку. Частина 2. Спектрометричний метод атомної абсорбції

ДСТУ ISO 6636-3-2001 Продукти перероблення фруктів і овочів. Визначення вмісту цинку. Частина 3. Спектрометричний метод із застосуванням дитизону

ДСТУ ISO 10304-1:2003 Якість води. Визначення розчинених фторид-, хлорид-, нітрит-, ортофосфат-, бромід-, нітрат- і сульфат-

іонів методом рідкої хроматографії. Частина 1. Метод для слабо-забруднених вод

ДСТУ ISO 10304-2:2003 Якість води. Визначення розчинених аніонів методом рідинного іонного хроматографування. Частина 2. Визначення броміду, хлориду, нітрату, нітриту, ортофосфату та сульфату в стічних водах

ДСТУ ISO 10304-3:2003 Якість води. Визначення розчинених аніонів методом рідинного іонного хроматографування. Частина 3. Визначення хромату, йодиду, сульфіту, тіоціанату і тіосульфату (ISO 10304-3:1997, IDT)

ДСТУ ISO 2481-2001 Натрію хлорид технічний. Визначення галогенів у перераховуванні на хлор. Меркуриметричний метод

ДСТУ ISO 10304-4:2003 Якість води. Визначення розчинених аніонів методом рідинного іонного хроматографування. Частина 4. Визначення хлорату, хлориду і хлориту у воді з низьким рівнем забрудненості

ДСТУ ISO 9297:2007 Якість води. Визначення хлоридів. Титрування нітратом срібла із застосуванням хромату як індикатора (метод Мора)

ДСТУ ISO 3695:2004 Амонію нітрат технічний. Визначення вмісту іонів хлориду потенціометричним методом

ДСТУ ISO 5943/IDF 88:2007 Сир та сири плавлені. Визначення вмісту хлориду. Метод потенціометричного титрування

ДСТУ ISO 1841-1:2004 М'ясо та м'ясні продукти. Визначення вмісту хлоридів. Частина 1. Метод Волхарда

ДСТУ ISO 1841-2:2004 М'ясо та м'ясні продукти. Визначення вмісту хлоридів. Частина 2. Потенціометричний метод

ДСТУ ISO 7393-1-2003 Якість води. Визначення незв'язаного та загального хлору. Частина 1. Титриметричний метод із застосуванням N,N-діетил-1, 4-фенілендіаміну

ДСТУ ISO 7393-2:2004 Якість води. Визначення незв'язаного та загального хлору. Частина 2. Колориметричний метод із застосуванням N,N-діетил-1,4-фенілендіаміну для поточного контролювання

ДСТУ ISO 7393-3:2004 Якість води. Визначення незв'язаного хлору та загального хлору. Частина 3. Метод йодометричного титрування для визначення загального хлору

ДСТУ ISO 6495:2005 Добавки кормові для тварин. Методи визначення вмісту водорозчинних хлоридів

ДСТУ ISO 981-2001 Натрію гідроксид технічний. Меркуриметричний метод визначення вмісту хлоридів

ДСТУ ISO 979-2001 Натрію гідроксид технічний. Метод визначення лужності

ДСТУ ISO 6468-2002 Якість води. Визначення вмісту окремих хлорорганічних інсектицидів, поліхлорованих біфенілів та хлорбензолів. Метод газової хроматографії після екстракції типу "рідина-рідина"

ДСТУ ISO 6635:2004 Фрукти, овочі та продукти їх перероблення. Визначення вмісту нітратів та нітритів спектрометричним методом молекулярної абсорбції

ДСТУ ISO 7890-1:2003 Якість води. Визначення нітрату. Частина 1 Спектрометричний метод із застосуванням 2,6-диметилфенолу

ДСТУ ISO 7890-2:2003 Якість води. Визначення нітрату. Частина 2 Спектрометричний метод із застосуванням перегнаного 4-фторофенолу

ДСТУ ISO 2918:2005 М'ясо та м'ясні продукти. Метод визначення загального вмісту нітриту (контрольний метод)

ДСТУ ISO 6777:2003 Якість води. Визначення нітритів. Спектрометричний метод молекулярної абсорбції

ДСТУ ISO 7150-1-2003 Якість води. Визначення амонію. Частина 1 Ручний спектрометричний метод

ДСТУ ISO 7150-2-2003 Якість води. Визначення амонію. Частина 2. Автоматичний спектрометричний метод

ДСТУ ISO 6778:2003 Якість води. Визначення амонію. Потенціометричний метод

ДСТУ ISO 6228:2003 Продукти хімічні технічні. Загальний метод визначення слідів сполук сірки, у формі сульфату, відновленням і титрометриванням

ДСТУ ISO 6878-2003 Якість води. Визначення фосфору. Спектрометричний метод із застосуванням молібдату амонію

ДСТУ ISO 2294:2005 М'ясо та м'ясні продукти. Метод визначення загального вмісту фосфору (контрольний метод)

ДСТУ ISO 2962:2005 Сири і плавлені сири. Визначення вмісту загального фосфору спектрометричним методом молекулярної абсорбції

ДСТУ ISO 9874:2005 Молоко. Визначення вмісту загального фосфору методом спектрометричної молекулярної абсорбції

ДСТУ ISO 6491:2004 Корми для тварин. Визначення вмісту фосфору. Спектрометричний метод

ДСТУ EN 1136:2005 Соки фруктові та овочеві. Визначення вмісту фосфору спектрометричним методом

ДСТУ ISO 5553:2005 М'ясо та м'ясні продукти. Виявлення поліфосфатів

ДСТУ ISO 906-2001 Кислота соляна технічна. Гравіметричний метод визначення сульфатів у перерахунку на сульфат барію

ДСТУ ISO 5522:2004 Фрукти, овочі та продукти перероблення. Визначення загального вмісту сірчистого ангідриду

ДСТУ ISO 911-2002 Кислота сірчана (сульфатна) технічна. Визначення концентрації сірчаної (сульфатної) кислоти за допомогою вимірювання густини

ДСТУ ISO 6638-1:2007 Фрукти, овочі та продукти їх перероблення. Визначення вмісту мурашиної кислоти. Частина 1. Гравіметричний метод

ДСТУ ISO 2753-2003 Сечовина (карбамід) технічна. Визначення вмісту води. Метод Карла Фішера

ДСТУ ISO 1442:2005 М'ясо та м'ясні продукти. Метод визначення вмісту вологи (контрольний метод)

ISO 12779:2011 Lactose – Determination of water content – Karl Fischer method (Лактоза – Визначення вмісту води – методом Карла Фішера)

IRIS спектрометр с индуктивно-связанной плазмой, руководство по эксплуатации спектрометра.

ДСТУ ISO 11885:2005 Якість води. Визначення 33 елементів методом атомно-емісійної спектрометрії з індуктивно-зв'язаною плазмою.

**Методи визначення мікотоксинів,
пестицидів та радіонуклідів**

ISO 14675:2003 (IDF 186: 2003) Milk and milk products – Guidelines for a standardized description of competitive enzyme immunoassays – Determination of aflatoxin M1 content (Молоко і молочні продукти – Вказівки щодо стандартизованого опису конкурентного ферментного імунологічного аналізу – Визначення вмісту афлатоксину M1)

ДСТУ EN 12955 – 2001 Визначення вмісту афлатоксину-B1 та суми афлатоксинів B1, B2, G1 та G2 в зернових культурах, фруктах з твердою шкіркою та похідних від них продуктах. Метод високоефективної рідинної хроматографії за допомогою постколонкової дериватизації та очищення на імуноафінній колонці.

AFLAPREP[®] Application of immunoaffinity columns for sample clean-up prior to HPLC analysis for aflatoxins (AFLAPREP[®] Застосування імуноафінних колонок для очистки зразків для визначення вмісту афлатоксинів методом високоефективної рідинної хроматографії).

ГОСТ 28038-97 «Продукты переработки плодов и овощей. Метод определения микотоксина патулина».

ISO 9001:2000 Науково-технічна та інжинірингова діяльність в сфері ядерної і радіаційної безпеки, радіоекології. Управління проектами в сфері науково-технічної діяльності.

ДОДАТКИ

МІЖНАРОДНА СИСТЕМА ОДИНИЦЬ ФІЗИЧНИХ ВЕЛИЧИН

Міжурядова генеральна конференція з мір та вагів прийняла таку систему, з 1960 р. уточнювала її і дала назву *System International unites* (Міжнародна система одиниць) з міжнародним скороченням SI (українською мовою – СІ).

Українські та міжнародні позначення для одиниць фізичних величин подані відповідно до таких державних стандартів України: ДСТУ 3651.0-97. Метрологія. Одиниці фізичних величин Міжнародної системи одиниць. Основні положення, назви та позначення. ДСТУ 3651.2-97. Метрологія. Одиниці фізичних величин. Фізичні сталі та характеристичні числа. Основні положення, назви та значення.

Фізико-хімічні сталі

Назва величини	Позначення	Рівняння	Значення величини
Швидкість світла у вакуумі	c	–	$2,99792458 \cdot 10^8$ м/с
Прискорення вільного падіння (стандартне значення)	g	–	$9,80665$ м/с ²
Стала Планка	h	–	$6,626176 \cdot 10^{-34}$ Дж·с
Елементарний електричний заряд	e	–	$1,6021892 \cdot 10^{-19}$ Кл
Маса спокою електрона	m_e	–	$9,109534 \cdot 10^{-31}$ кг = $5,4858026104$ а.о.м.
Енергія спокою електрона	–	$m_e c^2$	$0,5110034$ МеВ = $8,18724110^{-14}$ Дж
Маса спокою протона	m_p	–	$1,6726485 \cdot 10^{-27}$ кг =

			1,007276470 а.о.м.
Енергія спокою протона	–	$m_p c^2$	938,2796 МеВ = $1,503302 \cdot 10^{-10}$ Дж
Атомна одиниця маси	а.о.м.	$m(12C)/12$	$1,6605655 \cdot 10^{-27}$ кг
Маса спокою атома водню (1H)	m_H	–	$1,67355948 \cdot 10^{-27}$ кг = 1,007825036 а.о.м.
Число Авогадро	N_A	–	$6,022045 \cdot 10^{23}$ моль ⁻¹
Число Фарадея	F	NAe	$9,648456 \cdot 10^4$ Кл/моль
Стала Больцмана	k	–	$1,380662 \cdot 10^{-23}$ Дж/К
Універсальна газова стала	R	kNA	8,31441 Дж/(моль·К)
Молярний об'єм ідеального газу за нормальних умов ($T = 273,15$ К, $p = 101325$ Па)	V_H	RT/p	$22,41383 \cdot 10^3$ м ³ /моль
Абсолютний нуль температури	–	–	–273,15 °С
Атмосфера нормальна	–	–	101325 Па

**Префікси для позначення похідних одиниць метричних систем,
кратних і часткових головній одиниці**

Префікс	Множник	Скорочене позначення		Префікс	Множник	Скорочене позначення	
		укр.	міжнар.			укр.	міжнар.
дека	10	да	da	деци	10 ⁻¹	д	d
гекто	10 ²	г	h	санти	10 ⁻²	с	c
кіло	10 ³	до	до	мілі	10 ⁻³	м	m
мега	10 ⁶	М	M	мікро	10 ⁻⁶	мк	μ
гіга	10 ⁹	Г	G	нано	10 ⁻⁹	н	n
тера	10 ¹²	Т	T	піко	10 ⁻¹²	п	p
пета	10 ¹⁵	П	P	фемто	10 ⁻¹⁵	ф	f
екса	10 ¹⁸	Е	E	атто	10 ⁻¹⁸	а	a

Одиниці молекулярної фізики

Величина	Символ	Позначення одиниці		Розмірність у СІ
		укр.	міжнародне	
Ат. н.	Z	1	1	1
Відносна ат. м.	A_r	1	1	1
Відносна мол. м.	M_r	1	1	1
Молярна маса	M	кг/моль	kg/mol	кг/моль
Молярний об'єм	V_m	дм ³ /моль	dm ³ /mol	дм ³ /моль
Об'ємна концентрація молекул або частинок	n	м ⁻³	m ⁻³	м ⁻³
Масова концентрація речовини	ρ	кг/дм ³	kg/dm ³	кг/дм ³
Молярна концентрація речовини	c	моль/дм ³	mol/dm ³	моль/дм ³
Моляльність	b, m	моль/кг	mol/kg	моль/кг
Густина	ρ	кг/дм ³	kg/dm ³	кг/дм ³
Коефіцієнт дифузії	D	м ² /с	m ² /s	м ² /с

Одиниці вимірювання і розмірності деяких фізичних величин

Величина	Одиниця			
	Найменування	позначення		
		укр.	міжнар.	символ
Довжина	метр	м	m	L
Маса	кілограм	кг	kg	M
Час	секунда	с	s	T
Сила електричного струму	ампер	A	A	I
Кількість речовини	моль	моль	mol	N

Таблиця розчинності солей, основ та кислот у воді

Аніони	Катіони																		
	H ⁺	K ⁺	Na ⁺	NH ₄ ⁺	Ba ²⁺	Ca ²⁺	Mg ²⁺	Al ³⁺	Cr ³⁺	Fe ²⁺	Fe ³⁺	Ni ²⁺	Mn ²⁺	Zn ²⁺	Ag ⁺	Hg ²⁺	Cu ²⁺	Pb ²⁺	Sn ²⁺
OH ⁻		р	р	р	р	м	н	н	н	н	н	н	н	н	-	-	н	н	н
Cl ⁻	р	р	р	р	р	р	р	р	р	р	р	р	р	р	н	р	р	м	р
Br ⁻	р	р	р	р	р	р	р	р	р	р	р	р	р	р	н	м	р	м	р
I ⁻	р	р	р	р	р	р	р	р	р	р	-	р	р	р	н	н	-	н	м
S ²⁻	р	р	р	р	р	м	м	-	-	н	-	н	н	н	н	н	н	н	н
SO ₃ ²⁻	р	р	р	р	н	н	н	-	-	н	-	н	н	н	н	-	-	н	-
SO ₄ ²⁻	р	р	р	р	н	м	р	р	р	р	р	р	р	р	м	р	р	н	р
PO ₄ ³⁻	р	р	р	р	н	н	н	н	н	н	н	н	н	н	н	-	н	н	н
CO ₃ ²⁻	р	р	р	р	н	н	н	-	-	н	-	-	н	н	н	-	н	н	-
SiO ₃ ²⁻	н	р	р	-	н	н	н	н	-	н	н	-	н	н	-	-	н	н	-
NO ₃ ⁻	р	р	р	р	р	р	р	р	р	р	р	р	р	р	р	р	р	р	р
CH ₃ COO ⁻	р	р	р	р	р	р	р	-	р	р	-	р	р	р	м	р	р	р	р

Примітка. Р – розчиняється, М – мало розчиняється, Н – не розчиняється, риска – сполука розкладається водою або не існує.

Дія основних характерних реактивів на катіони I групи

Реактиви	Катіони			
	K ⁺	Na ⁺	Mg ⁺	NH ₄ ⁺
Натрію гексанітро кобальтат (III) Na ₃ [Co(NO ₂) ₆]	Жовтий кристалічний осад K ₂ Na·[Co(NO ₂) ₆]	Немає осаду	Немає осаду	Жовтий кристалічний осад (NH ₄) ₂ Na·[Co(NO ₂) ₆]
Натрію гідротартрат NaHC ₄ H ₄ O ₆	Білий кристалічний осад KHC ₄ H ₄ O ₆	Немає осаду	Немає осаду	Білий кристалічний осад NH ₄ HC ₄ H ₄ O ₆
Калію дигідроанти монат KH ₂ SbO ₄	Немає осаду	Білий кристалічний осад NaH ₂ SbO ₄	Білий кристалічний осад Mg·(H ₂ SbO ₄) ₂	Білий аморфний осад HSbO ₃
Ацетат уранілу UO ₂ (CH ₃ COO) ₂	Немає осаду	Жовтий кристалічний осад NaUO ₂ ·(CH ₃ COO) ₃	Немає осаду	Немає осаду
Натрію гідрофосфат Na ₂ HPO ₄ в присутності NH ₃ ·H ₂ O, NH ₄ Cl	Немає осаду	Немає осаду	Білий кристалічний осад MgNH ₄ PO ₄ · 6H ₂ O	Немає осаду
Калію гідроксид КОН або натрію гідроксид NaOH	-	-	Білий аморфний осад Mg(OH) ₂	Газ NH ₃
Реактив Несслера K ₂ [HgI ₄] і КОН	Немає осаду	Немає осаду	Немає осаду	Червоно-бурий осад [Hg ₂ I ₂ NH ₄]I
Забарвлення полум'я	Світло-фіолетове	Жовте	Не забарвлює	Не забарвлює

Дія основних реактивів на катіони II групи

Катіони	Реактиви			
	$(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$	K_2CrO_4	$(\text{NH}_4)_2\text{C}_2\text{O}_4$	H_2SO_4
Ba^{2+}	Осад білого кольору BaCO_3 розчиняється в HCl або HNO_3 і в CH_3COOH	Осад жовтого кольору BaCrO_4 ; розчиняється в HCl або HNO_3 і не розчиняється в CH_3COOH	Осад білого кольору BaC_2O_4 ; розчиняється в HCl або HNO_3 і в CH_3COOH при нагріванні	Дрібні кристали BaSO_4 (під мікроскопом)
Ca^{2+}	Осад білого кольору CaCO_3 ; розчиняється в HCl або HNO_3 і в CH_3COOH	Немає осаду	Осад білого кольору CaC_2O_4 розчиняється в HCl або HNO_3 і не розчиняється в CH_3COOH при нагріванні	Великі кристали в вигляді голки $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ під мікроскопом

Дія найважливіших реактивів на катіони III аналітичної групи (Al^{3+} , Cr^{3+} , Fe^{3+} , Fe^{2+})

Реактив	Катіони (умови проведення реакції і властивості продуктів реакції)			
	Al^{3+}	Cr^{3+}	Fe^{3+}	Fe^{2+}
$(\text{NH}_4)_2\text{S}$	З нейтрального або слабколужного розчину білий осад $\text{Al}(\text{OH})_3$. Розчиняється в розведених кислотах і лугах	З нейтрального або слабколужного розчину сіро – зелений осад $\text{Cr}(\text{OH})_3$. Розчиняється в розведених кислотах і лугах	З нейтрального або слабколужного розчину чорний осад Fe_2S_3 . Розчиняється в розведених кислотах.	З нейтрального або слабколужного розчину чорний осад FeS . Розчиняється в розведених кислотах.
H_2S	-	-	Fe^{3+} відновлюється до Fe^{2+}	-
NaOH KOH	Білий осад $\text{Al}(\text{OH})_3$. розчиняється в надлишку реактиву, при цьому утворюється NaAlO_2 . При нагріванні з NH_4Cl знову осаджується $\text{Al}(\text{OH})_3$	Сіро-зелений осад $\text{Cr}(\text{OH})_3$. Розчиняється в надлишку реактиву, при цьому утворюється NaCrO_2 . При розведенні розчину водою і кип'ятінні знову осаджується $\text{Cr}(\text{OH})_3$ Сіро-зелений осад	Буро-червоний осад $\text{Fe}(\text{OH})_3$. Розчиняється в розведених кислотах, не розчиняється в надлишку реактиву	Білий осад $\text{Fe}(\text{OH})_2$ на повітрі зеленіє, потім буріє. Розчиняється в кислотах.

Реактив	Катіони (умови проведення реакції і властивості продуктів реакції)			
	Al^{3+}	Cr^{3+}	Fe^{3+}	Fe^{2+}
		$Cr(OH)_3$		
NH_4OH	Білий осад $Al(OH)_3$	Сіро-зелений осад $Cr(OH)_3$	Буро-червоний осад $Fe(OH)_3$	Білий осад $Fe(OH)_2$
CH_3COO	При нагріванні білий осад основної солі. - Розчиняється в розведених кислотах і лугах.	Осаджується лише в присутності Al^{3+} Fe^{3+}	На холоді має червоне забарвлення, при нагріванні- буро-червоний осад основної солі	-
Na_2CO_3 K_2CO_3	Білий осад $Al(OH)_3$	Сіро-зелений(іноді фіолетовий) осад $Cr(OH)_3$	Буро-червоний осад основної солі	Білий осад на повітрі буріє
$(NH_4)CO_3$	Білий осад	Сіро-зелений (іноді фіолетовий) осад	Буро-червоний осад основної солі	Білий осад
Na_2HPO_4	Білий осад $AlPO_4$ Не розчиняється в оцтовій кислоті, розчиняється в мінеральних кислотах і лугах.	Сіро-зелений (іноді фіолетовий) осад $CrPO_4$. Не розчиняється в оцтовій кислоті, розчиняється в мінеральних кислотах і лугах	Жовтий-білий осад $FePO_4$. Не розчиняється в оцтовій кислоті, розчиняється в мінеральних кислотах і лугах.	Білий осад $Fe_3(PO_4)_2$. Розчиняється в кислотах (мінеральних і оцтовій)

Реактив	Катіони (умови проведення реакції і властивості продуктів реакції)			
	Al^{3+}	Cr^{3+}	Fe^{3+}	Fe^{2+}
$K_4[Fe(CN)_6]$	-	-	Синій осад (берлінська лазур) $K_4[Fe(CN)_6]_3$ не розчиняється в HCl	Білий осад $K_2[Fe(CN)_6]$ і $K_2Fe[Fe(CN)_6]$. На повітрі внаслідок окиснення осад синіє
$K_3[Fe(CN)_6]$	-	-	Розчин забарвлюється в бурій колір внаслідок утворення $K[Fe(CN)_6]$	Темно-синій осад (турбульова синь). $K_3[Fe(CN)_6]_2$ Не розчиняється в HCl
NH_4SCN або $KSCN$	-	-	В результаті утворення феруму роданіду $Fe(SCN)_3$ розчин забарвлюється в червоний колір	-
Реакції окиснення	-	Окислювачі переводять іон Cr^{3+} $CrO\frac{2-}{4}$ у лужному, а в $Cr_2\frac{2-}{7}$ у кислому середовищі. Окиснювачі в лужному	-	Окислювачі переводять іон Fe^{2+} Fe^{3+} . У лужному середовищі - H_2O_2 і Na_2O та інші. У кислому середовищі – NHO_3 та інші.

Реактив	Катіони (умови проведення реакції і властивості продуктів реакції)			
	Al^{3+}	Cr^{3+}	Fe^{3+}	Fe^{2+}
		середовищі: а) хлорна і бромна вода б) H_2O_2 і Na_2O . У кислому середовищі: а) $KMnO_4$ б) $(NH_4)_2S_2O_8$		
Кристали $Na_2B_4O_7$ або $NaNH_4HPO_4$	-	Смарагдово- зелений колір	-	-

Дія найважливіших реактивів на катіони III аналітичної групи (Mn^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+})

Реактив	Катіони (умови проведення реакції і властивості продуктів реакції)			
	Mn^{2+}	Zn^{2+}	Co^{2+}	Ni^{2+}
$(\text{NH}_4)_2\text{S}$	З нейтрального або слабколужного розчину світло-рожевий осад MnS . Розчиняється в розведених кислотах.	З нейтрального або слабколужного розчину білий осад ZnS . Не розчиняється в оцтовій кислоті, але розчиняється в розведених мінеральних кислотах.	З нейтрального розчину чорний осад CoS . Не розчиняється на холоді в розведених кислотах, розчиняється при нагріванні в HNO_3 і царській горілці.	З нейтрального розчину чорний осад NiS . Не розчиняється на холоді в розведених кислотах, розчиняється при нагріванні в царській горілці.
H_2S	-	В оцтовокислому середовищі білий осад ZnS . Розчиняється в мінеральних кислотах.	-	-
NaOH KOH	Білий осад $\text{Mn}(\text{OH})_2$. На повітрі буріє і утворює $\text{MnO}(\text{OH})_2$. Розчиняється в кислотах	Білий осад $\text{Zn}(\text{OH})_2$. Розчиняється в кислотах і при надлишку реактиву, утворюючи при цьому ZnO^{2-}_2	Синій осад (при нагріванні рожевий) $\text{Zn}(\text{OH})_2$. На повітрі буріє. Розчиняється в розведених кислотах.	Зелений осад $\text{Ni}(\text{OH})_2$. Розчиняється в розведених кислотах.

Реактив	Катіони (умови проведення реакції і властивості продуктів реакції)			
	Mn^{2+}	Zn^{2+}	Co^{2+}	Ni^{2+}
NH_4OH	Білий осад $Mn(OH)_2$	Білий осад $Zn(OH)_2$. Розчиняється при надлишку NH_4OH .	Синій осад основної солі. Розчиняється при надлишку NH_4OH . На повітрі розчин червоніє	Зелений осад основної солі. Розчиняється при надлишку NH_4OH . Аміачний розчин синього кольору.
CH_3COO	-	-	-	-
Na_2CO_3 K_2CO_3	Білий осад $MnCO_3$	Білий осад основного карбонату. Розчиняється в розведених кислотах і лугах і аміаку	Рожевий осад основної солі	Зелений осад
$(NH_4)CO_3$	Білий осад	Білий осад. Розчиняється в надлишку реактиву	Рожевий осад. Розчиняється в надлишку реактиву	Зелений осад Розчиняється в надлишку реактиву
Na_2HPO_4	Білий осад $Mn_3(PO_4)_2$. Розчиняється в кислотах (мінеральній і оцтовій)	Білий осад $Zn_3(PO_4)_2$. Розчиняється в кислотах (мінеральних і оцтовій), в лугах і в аміаку	Фіолетовий осад $Co_3(PO_4)_2$. розчиняється в кислотах (мінеральних і оцтовій і аміаку)	Зелений осад $Ni_3(PO_4)_2$. Розчиняється в кислотах (мінеральних і оцтовій і в аміаку)
$K_4[Fe(CN)_6]$	Білий осад	Білий осад	Зеленуватий осад	Жовто- бурий осад

Реактив	Катіони (умови проведення реакції і властивості продуктів реакції)			
	Mn ²⁺	Zn ²⁺	Co ²⁺	Ni ²⁺
	Mn ₂ [Fe(CN) ₆] Не розчиняється в HCl	Zn ₂ [Fe(CN) ₆] I Zn ₃ K ₂ [Fe(CN) ₆] ₂ Не розчиняється в кислотах. Розчиняється в лугах	Co ₂ [Fe(CN) ₆]	Ni ₂ [Fe(CN) ₆]. Не розчиняється в кислотах.
K₃[Fe(CN)₆]	Бурий осад Mn ₃ [Fe(CN) ₆] ₂	Коричнево-жовтий осад Zn ₃ [Fe(CN) ₆] ₂	Бурувато-червоний осад Co ₃ [Fe(CN) ₆] ₂	Жовто-бурий осад Ni ₃ [Fe(CN) ₆] ₂
NH₄SCN або KSCN	-	-	синє забарвлення спиртового шару, внаслідок екстракції комплексу (NH ₄) ₂ [Co(SCN) ₄]	-
Реакції окиснення	Окиснювачі переводять у лужному середовищі іон Mn ²⁺ у MnO(OH) ₂ , а в кислому середовищі іон Mn ²⁺ у MnO ₄ ⁻ . Окиснювачі в	-	Окиснюється у лужному середовищі киснем повітря, хлорною і бромною водою. У кислому середовищі окиснюється: а) дією KNO ₂ з утворенням K ₃ [Co(NO ₂) ₆]; б) дією	Окиснюється тільки в лужному середовищі хлорною або бромною водою. При окисненні у Ni(OH) ₃ чорного кольору

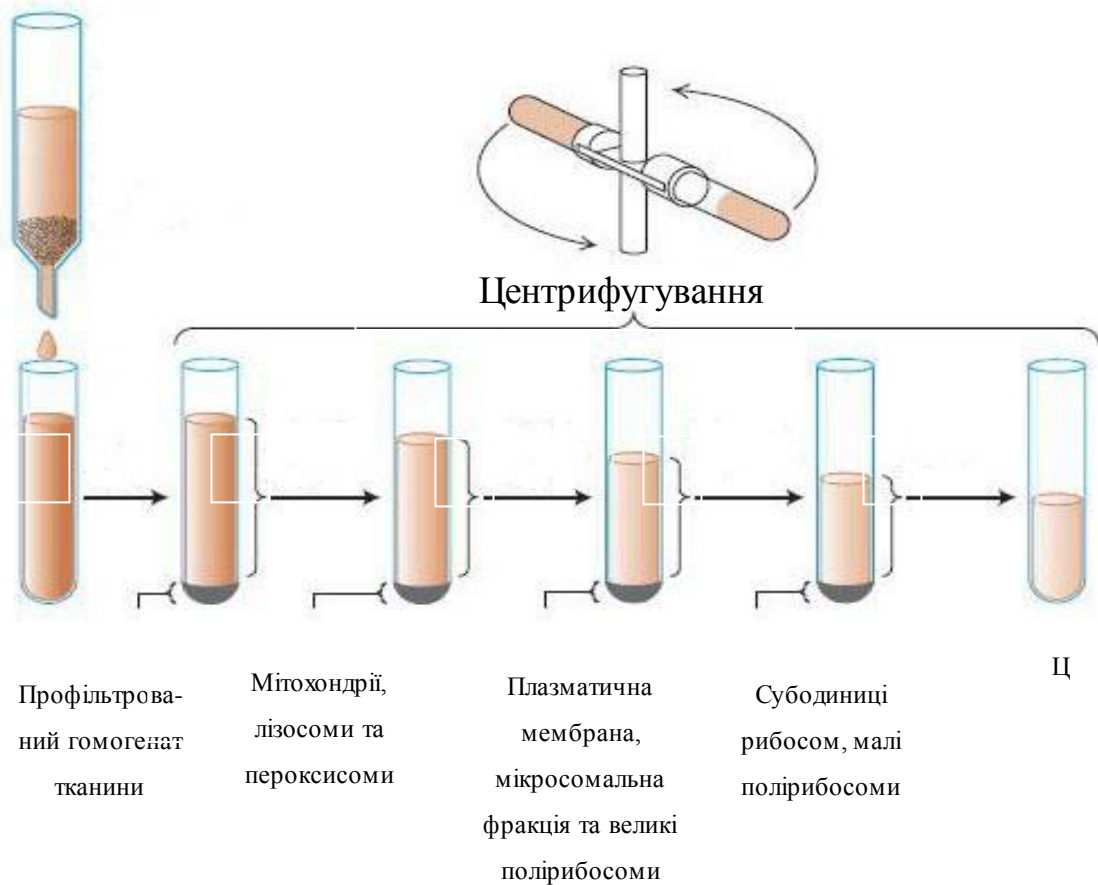
Реактив	Катіони (умови проведення реакції і властивості продуктів реакції)			
	Mn ²⁺	Zn ²⁺	Co ²⁺	Ni ²⁺
	лужному середовищі: а) хлорна і бромна вода; б) H ₂ O ₂ і Na ₂ O ₂ ; в) [Ag(NH ₃) ₂] ⁺ . У кислому середовищі: а) (NH ₄) ₂ S ₂ O ₈ в присутності іона Ag ⁺ ; б) PbO ₂ ; в) NaBiO ₃		α-нітрозо-βнафтолу з утворенням осаду [C ₁₀ H ₉ NOO] ₃ Co	
Кристали Na₂B₄O₇ або NaNH₄HPO₄	-	-	Синій колір	Червоно-коричневий колір

Дія найважливіших реактивів на іони V аналітичної групи

Реактив	Іони і властивості продуктів реакції					
	As (III)	As(V)	Sb(III)	Sb(V)	Sn(III)	Sn(IV)
H₂S у присутності HCl	Жовтий осад As ₂ S ₂ . Не розчиняється в HCl. Розчиняється в (NH ₄) ₂ S, при цьому утворюється ті солі (NH ₄) ₂ AsS ₃ а при розчиненні в (NH ₄) ₂ S ₂ утворюються (NH ₄) ₃ AsS ₄ . Розчиняється також в (NH ₄) ₂ CO ₃ з утворенням суміші тіооксосолей (NH ₄) ₃ AsS ₃ I	Жовтий осад суміші As ₂ S ₅ .(S). Швидко осаджується з розчинів, нагрітих до температури 70-80C. Осад розчиняються (NH ₄) ₂ S і (NH ₄) ₂ S, з утворенням у першому випадку суміші (NH ₄) ₃ AsS ₃ і (NH ₄) ₃ AsS ₄ , у другому - (NH ₄) ₃ AsS ₄ . Розчиняється також в	Оранжевий осад Sb ₂ S ₃ . розчиняється в (NH ₄) ₂ S і (NH ₄) ₂ S ₂ , утворюючи відповідні тіосоли: (NH ₄) ₃ SbS ₃ і (NH ₄) ₃ SbS ₄ . при підкисленні тіосолей до кислої реакції вони руйнуються, утворюючи відповідно осад Sb ₂ S ₃ і Sb ₂ S ₅ . Обидва осад	Оранжевий осад Sb ₂ S ₃ . розчиняється в (NH ₄) ₂ S і (NH ₄) ₂ S ₂ , утворюючи відповідні тіосоли: (NH ₄) ₃ SbS ₄ . При підкисленні до кислої реакції тіосіль руйнуються і утворюються осад Sb ₂ S ₅ . Осад розчиняються в концентрованій HCl і не розчиняються	Бурий осад SnS. Не розчиняється в (NH ₄) ₂ S, розчиняється в (NH ₄) ₂ S ₂ , утворюючи тіосіль (NH ₄) ₂ SnS ₃ . При підкисленні до кислої реакції тіосіль руйнуються і утворюються осад SnS ₂ . Осад розчиняються в концентрованій HCl і не розчиняються в (NH ₄) ₂ CO ₃	Жовтий осад SnS ₂ розчиняється в (NH ₄) ₂ S і (NH ₄) ₂ S ₂ , утворюючи відповідно (NH ₄) ₂ S та SnS ₃ . При підкисленні до кислої реакції тіосіль руйнується і утворюється осад SnS ₂ . Осад розчиняється в концентрованій HCl, не розчиняється в (NH ₄) ₂ CO ₃ .

Реактив	Іони і властивості продуктів реакції					
	As (III)	As(V)	Sb(III)	Sb(V)	Sn(III)	Sn(IV)
	$(\text{NH}_4)_3\text{AsO}_3$, $(\text{NH}_4)\text{AsS}_4\text{I}$ $(\text{NH}_4)_3\text{AsO}_3\text{S}$. При підкисленні тіо-солей до кислої реакції в першому випадку випадає осад As_2S_2 , у другому - As_2S_5 . обидва осад розчиняється в конц. HNO_3	$(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$; при цьому утворюються суміш тіо-і оксо-солей. При підкисленні тіо-солей до кислої реакції випадають осад As_2S_3 і As_2S_5 . Обидва сульфід розчиняються в конц. HNO_3	розчиняються в концентрованій HCl і не розчиняються в $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$	в $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$		
H_2O	-	-	Білий осад SbO_2Cl . Розчиняється у винній кислоті	Білий осад SbO_2Cl . Розчиняється у винній кислоті	Білий осад основних солей	Білий осад основних солей
$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (в кислому розчині)	Жовтий осад As_2S_3	Жовтий осад	Оранжевий осад Sb_2S_3	Оранжевий осад Sb_2S_5	Бурий осад SnS	Жовтий осад SnS_2
KOH , NaOH , K_2CO_3 ,	-	-	Білий осад HSbO_2 . Розчиняється в	Білий осад HSbO_3 . Розчиняється в	Білий осад Sn(OH)_2 . Розчиняється в	Білий осад Sn(OH)_4 . Розчиняється в

Реактив	Іони і властивості продуктів реакції					
	As (III)	As(V)	Sb(III)	Sb(V)	Sn(III)	Sn(IV)
Na ₂ CO ₃ , NH ₄ OH			HCl та KOH	HCl та KOH	HCl та KOH	HCl та KOH
Fe метал. в присутності HCl	-	-	Чорний осад Sb	Чорний осад Sb	-	Відновлюється до Sn(II)
Hg ₂ Cl ₂	-	-	-	-	Білий осад Hg ₂ Cl ₂	-
Солі вісмуту (III) в лужному середовищі	-	-	-	-	Чорний осад Ві	-
AgNO ₃	Жовтий осад Ag ₃ AsO ₃ . Розчиняється в кислотах	Коричневий осад Ag ₃ AsO ₄ . Розчиняється в кислотах	-	-	Чорний осад Ag (реакція в лужному середовищі)	-
MgCl ₂ в присутності NH ₄ OH, NH ₄ Cl	-	Білий осад MgNH ₄ AsO ₄ . Розчиняється в кислотах	-	-	-	-
(NH ₄) ₂ MoO ₄ в присутності HNO ₃	-	Жовтий осад (NH ₄) ₂ [As(Mo ₃ O ₁₀) ₄]. Розчиняється в аміаку	-	-	-	-



Послідовні етапи диференційного центрифугування з метою отримання субклітинних фракцій:

1 – центрифугування гомогенату досліджуваної тканини при 600g 10 хв;

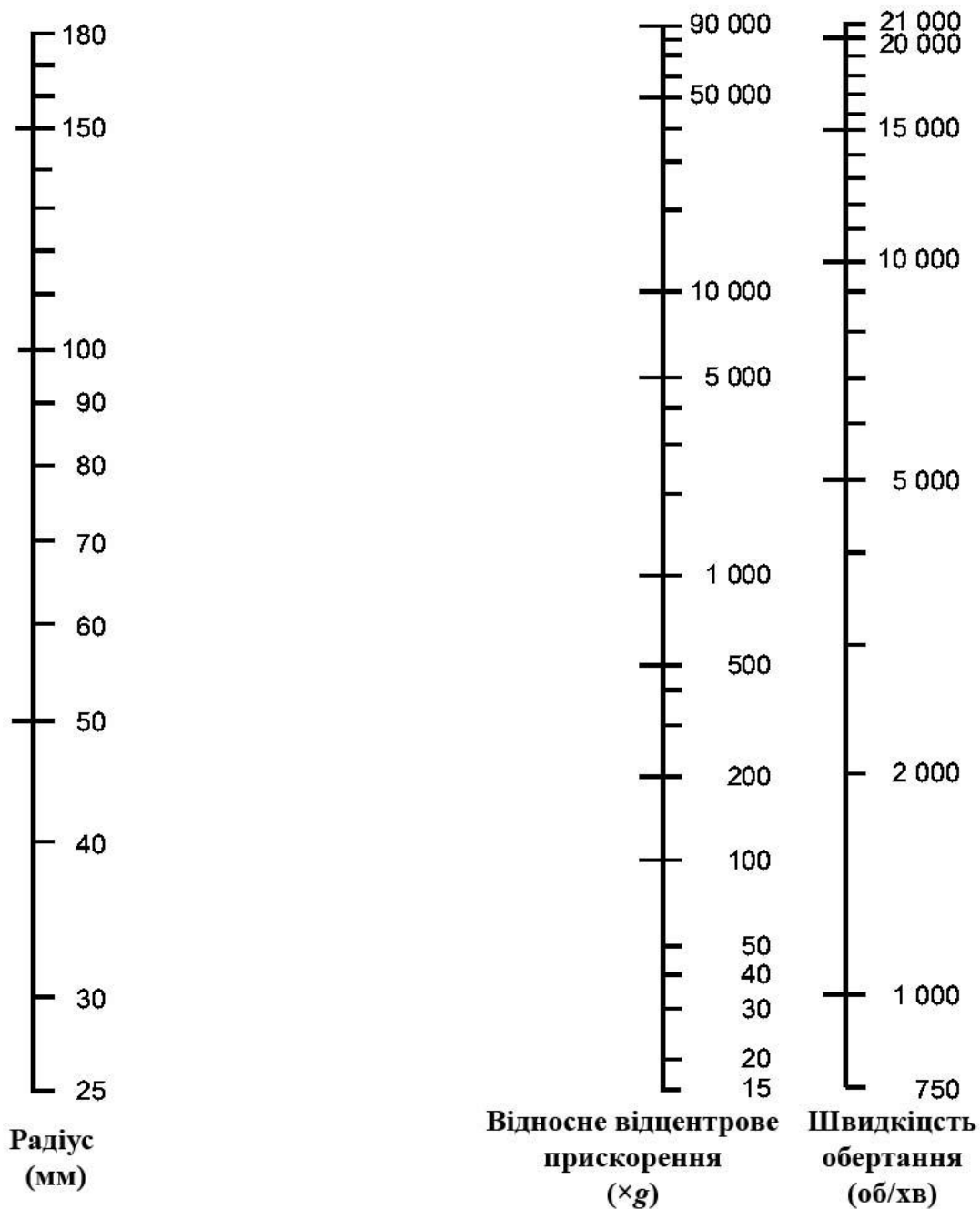
2 – центрифугування отриманого супернатанту при 15000g 5 хв;

3 – центрифугування одержаного за попереднього центрифугування супернатанту при 100000g 60 хв;

4 – центрифугування отриманої на попередньому етапі надосадової рідини при 300000g 2 год;

5 – одержана в ході попереднього центрифугування надосадова рідина (цитозоль).

Номограма для визначення відцентрового прискорення



У залежності від розмірів ротора та швидкості центрифугування (обертання) величину відцентрового прискорення (G) визначають шляхом сполучення прямою лінією значення радіуса та швидкості обертання ротора. Точка перетину цієї прямої з середньою шкалою дає невідому величину (G).

Ензими-маркери субклітинних фракцій

Фракції		Маркерний ензим
Плазматична мембрана	Базолатеральна	Аденілатциклаза Na ⁺ , K ⁺ -АТФаза
	Апікальна	5'-нуклеотидаза γ-Глутамилтранспептидаза
Ендоплазматичний ретикулум	-	Глюкозо-6-фосфатаза Епоксидгідролаза
Апарат Гольджи	Транс-область	Галактозилтрансфераза НАДН-фосфатаза
Мітохондрії	Внутрішня мембрана	Сукцинатдегідрогеназа Цитохромоксидаза
	Зовнішня мембрана	Моноамінооксидаза
Лізосоми	-	Кисла фосфатаза
Пероксисоми	-	Каталаза
Цитозоль	-	Лактатдегідрогеназа

Зміна активності ензимів сироватки крові у часі (зменшення на 10 %) порівняно з вихідним станом

Компоненти	Температура		
	20° С	4° С	-18° С
Амілаза	4 доби	5 міс	2 міс
Холінестераза	8 год	1 тиж	1 тиж
Глутаматдегідрогеназа	1 доба	7 діб	1 доба
Лактатдегідрогеназа	1 доба	1–2 доби	1–2 доби
Лужна фосфатаза	1 доба	2–3 доби	1 міс
Кисла фосфатаза	2–4 год	3 доби	3 доби

Креатинкіназа	12 год	3 доби	1 міс
γ-Глутамілтрансфераза	2 доби	1 тиж	1 міс
Аспартатаміноттрансфераза	8 год	3 доби	1 міс
Аланінаміноттрансфераза	8 год	1 тиж	Нестабільна

Примітка. Потрібно пам'ятати! Не залежно від виду досліджень розморожена сироватка крові не може бути повторно замороженою.

ДОДАТОК 11

Значення допустимих рівнів питомих активностей радіоізотопів ^{137}Cs і ^{90}Sr у продуктах харчування та питній воді

№ з/п	Найменування продукту	Допустимий рівень, Бк/кг	
		^{137}Cs	^{90}Sr
1	Зерно, борошно-круп'яні та хлібобулочні вироби		
	1.1. Зерно продовольче, у т. ч. пшениця, жито, овес, ячмінь, просо, гречка, рис, кукурудза, сорго та інших зернових культур	50	20
	1.2. Борошно, борошняні хлібопекарські суміші, крупа, крохмаль; макаронні вироби, круп'яні вироби, толокно; напівфабрикати зернові, готові продукти у т. ч. сухі сніданки, мюслі та ін.	30	10
	1.3. Хліб та хлібобулочні вироби, у т. ч. із добавками; продукти борошняні кондитерські вироби, напівфабрикати з тіста	20	5
2	Молоко та молочні продукти		
	2.1. Сире товарне молоко для промислової переробки (крім продуктів дитячого харчування), молоко рідке та вершки, сироватка; продукти кисломолочні, десерти кисломолочні та ін.; продукти, вироблені на основі молока та вершків (морозиво, торти, напої, десерти та ін.)	100	20
	2.2. Масло вершкове (у т. ч. масло коров'яче, спреди, молочний жир та ін.)	200	40
	2.3. Сири сичужні тверді, сири плавлені	200	100

	2.4. Молоко та вершки концентровані або згущені	300	60
	2.5. Продукти молочні сухі, у т. ч. молоко, вершки та ін.; концентрати харчові на основі молока	500	100
3	М'ясо та м'ясні продукти		
	3.1. М'ясо забійних тварин, птиці (свіже, охолоджене, заморожене) без кісток для промислової переробки, м'ясо, харчові субпродукти (у т. ч. кишки-сирець, кров харчова) забійних тварин і свійської птиці (свіжі, заморожені, різних способів обробки); продукти їх переробки, у т. ч. напівфабрикати, ковбаси, консерви м'ясні та м'ясо-рослинні	200	20
	3.2. М'ясо диких тварин та птиці	400	40
4	Риба, нерибні об'єкти промислу та продукти їх переробки		
	4.1. Риба свіжа та морожена, різних способів обробки; риб'ячий жир, ікра (у т. ч. штучна), рибні напівфабрикати, готові рибні продукти (масло, пасти та ін.), рибні пресерви та консерви	150	35
	4.2. Нерибні об'єкти промислу (ракоподібні, молюски та ін.), свіжі та морожені, різних способів обробки; продукти їх переробки, у т. ч. напівфабрикати, консерви	150	35
	4.3. Сушені або в'ялені риба та нерибні об'єкти промислу (ракоподібні, молюски та ін.)	300	70
	4.4. Морські трави та продукти їх переробки	200	70
	4.5. Водорості та морські трави сушені	600	200
5	Яйця птиці та продукти їх переробки		
	5.1. Яйця птиці та рідкі яєчні продукти; напівфабрикати та готові вироби з яєць птиці	100	30
	5.2. Сушені продукти переробки яєць птиці (яєчний порошок, сухі суміші)	400	100
6	Овочі та продукти їх переробки		
	6.1. Картопля свіжа та продукти переробки, у т. ч. кулінарні вироби, напівфабрикати	60	20
	6.2. Свіжі овочі (листові, баштанні, коренеплоди), бобові, кукурудза цукрова; продукти переробки, соки, консерви та ін.	40	20
	6.3. Овочеві концентрати (у т. ч. томатна паста, томатні соуси, кетчупи тощо)	120	50

	6.4. Сушені овочі, продукти їх переробки	240	80
7	Фрукти та ягоди		
	7.1. Фрукти та ягоди свіжі, заморожені, консервовані; соки фруктові та ягідні	70	10
	7.2. Продукти переробки фруктів та ягід (варення, пасти, джеми, повидло, желе та ін.)	140	20
	7.3. Сухі фрукти та ягоди	280	40
	7.4. Горіхи та продукти їх переробки	70	10
8	Цукор, кондитерські вироби шоколад та вироби з нього; гумка жувальна	50	30
9	Гриби та ягоди дикорослі свіжі, заморожені, консервовані	500	50
10	Гриби та ягоди дикорослі сушені	2500	250
11	Насіння олійних культур (соняшнику, кунжуту, маку та інших); продукти їх переробки, за винятком рослинних жирів та олій	70	10
12	Жири та олії рослинні, продукти, вироблені на їх основі (маргарини, креми та ін.)	100	30
13	Чай байховий, ароматизований, з рослинними домішками, кава зелена, смажена; какао-боби, какао-порошок; сухі розчинні напої на основі чаю, какао, кави та замінників	200	50
14	Вода питна	2	2
	Напої		
15	15.1. Мінеральна вода	10	5
	15.2. Безалкогольні та слабоалкогольні напої, у т. ч. на основі рослинної сировини; пиво, квас	20	20
	15.3. Алкогольні напої (за винятком пива)	50	30
16	Лікарські рослини сушені; фіточаї, мате, кармаке та ін.	200	100
17	Тютюн та тютюнові вироби	120	50
18	Прянощі; спеції та їх суміші; приправи, у т.ч. соуси салатні заправки, майонез.	120	50
19	Харчові добавки (барвники, стабілізатори, ароматизатори, наповнювачі та ін.); оцет, сода харчова; дріжджі; харчові концентрати; супи швидкого приготування.	150	50
20	Сіль кухонна харчова та сольові суміші.	120	30
21	Мед та продукти бджільництва.	200	50

12.1. Документування методики

Викладені нижче вимоги до змісту методики розроблені на підставі стандарту ISO 78-2. Також документ має включати нижченаведені розділи, кожна сторінка повинна бути пронумерована, слід вказати також загальну кількість сторінок і номер видання.

12.2. Список уточнень і переглядів методики

Призначення цього пункту подвійне. По-перше, він забезпечує можливість внесення невеликих змін до тексту методики без повного перегляду і передруку тексту методики. По-друге, лабораторії рекомендовано періодично переглядати методику на предмет її відповідності заданій меті; записи ж свідчать про те, що перегляд був проведений. Список змін зазвичай поміщають перед описом методики, безпосередньо під обкладинкою.

12.3. Уточнення

Рукописні зміни в тексті методики прийнятні за умови, що вони вже внесені в таблицю (форму таблиці представлено нижче, рукописні записи припустимі) і належним чином авторизовані. Авторизація включає той факт, що вплив змін на придатність методики вивчено, зміни не викликали проблем і внесені в усі примірники методики.

#	Розділ	Суть змін	Дата	Підпис
1 (напр.)	3.4	Зміна швидкості потоку до 1,2 см ³ /хв	8.02.2015	Петренко І.П.

12.4. Перегляд

Методику рекомендовано передивлятися кожні два роки.

Дата перегляду	Результат перегляду	Дата наступного перегляду	Підпис

12.5. Заголовок

Переважний формат: визначення А (аналіту або речовини, яку шукають) у присутності В (речовини, яка заважає) в С (матриці) за допомогою D (методу).

12.6. Міри безпеки

Детальний опис заходів безпеки, існуючих загроз та необхідності дотримання пересторог повинно бути винесено у даний розділ. Включити графу «відомості відсутні».

Включити відповідні запобіжні заходи, пов'язані з:

- підготовкою проб;
- проведенням аналізу або приготуванням розчинників, реактивів, стандартів або інших матеріалів;
- експлуатацією обладнання;
- вимогами до спеціального обладнання, наприклад, до витяжних шаф;
- наслідками збільшення масштабів експерименту (межа вибухоне-безпечності);
- правилами поводження з усіма матеріалами/обладнанням.

12.7. Межі застосування методу

Даний розділ дозволяє потенційному користувачеві швидко зрозуміти, чи є методика придатною для бажаного застосування. Необхідно описати такі деталі:

- аналіт (або аналіти), потенційно визначаються зазначеною методикою;
- форма, в якій визначають аналіт (аналіти) – похідні, загальні / доступні і т. д.;
- матриці проб, у складі яких "визначають аналіт (аналіти);
- діапазон концентрацій аналіту (аналітів), в яких застосовується зазначена методика;
- відомі впливи, що перешкоджають застосуванню методики або обмежують її застосування;
- обладнання, яке потрібно при реалізації методики;
- мінімальний розмір проби;
- питання, які необхідно погоджувати із замовником, наприклад, придатність методики для встановлення відповідності специфікаціям або нормативним вимогам.

12.8. Посилання на нормативні документи

Перерахуйте посилання на документи, відповідність яким є обов'язкове.

12.9. Визначення

Необхідно дати визначення всім нестандартним термінам; використовуйте визначення із стандартів ISO там, де це можливо. Цитуйте першоджерела. Приводьте приклади хімічних структур там, де це доречно.

12.10. Описання метод

Опишіть метод, який використаний у даній аналітичній методиці. Можливо, тут слід представити схему послідовності аналітичних операцій. У цьому розділі слід викласти коротку інформацію про те, як працює методика. Включіть пояснення принципу розрахунків. Там, де це необхідно для пояснення роботи методики або принципу розрахунків, включіть опис деталей відповідних хімічних реакцій (наприклад, там, де методика включає етап отримання похідних сполук або титрометричний аналіз).

Наприклад, «Концентрацію визначають за калібрувальним графіком, побудованим за 6 точками, шляхом знаходження концентрації, що відповідає величині абсорбції проби, скоригованої за значенням холостого сигналу, і помножене на значення коефіцієнту розведення».

12.11. Реактиви та матеріали

Перерахуйте всі реактиви, матеріали, речовини для холостих вимірювань, зразки для Контролю якості (КЯ), стандарти і CRM, необхідні для аналітичного процесу; пронумеруйте їх для подальших посилань. Включіть в список наступну інформацію:

- опис потенційних загроз та інструкції щодо поводження з матеріалом;
- ступінь чистоти реактивів;
- необхідність калібрування матеріалів КЯ (матеріалів, призначених для контролю якості) з різних товарних партій;
- подробиці приготування, включаючи необхідність попереднього приготування;
- вимоги до упаковки та зберігання.
- терміни зберігання сировини і готових реактивів.

- необхідну концентрацію (із зазначенням одиниць виміру).
- вимоги до маркування.

12.12. Прилади і обладнання

Опишіть в подробицях кожен прилад і елемент обладнання, порядок їх з'єднання для того, щоб схема вимірювання була чіткою і ясною. Перерахуйте мінімальні вимоги до робочих характеристик і вимоги до процедури верифікації, з перехресними посиланнями на розділ калібрування, і різні вказівки з експлуатації приладів. Пронумеруйте пункти для подальших посилань. Для скляного посуду вкажіть клас точності, де це необхідно (майте на увазі, що використання посуду певного класу точності може зажадати обґрунтувань і доказів відповідності). Включіть вимоги до безпеки навколишнього середовища (наявність витяжних шаф і т. д.). Для наочності можна прикласти схеми та діаграми.

12.13. Проби і пробовідбір

Даний розділ не ставить завдання описати процес складання плану відбору проб, який слід представити окремо в документації за планом відбору проб. Опишіть в подробицях, як отримують робочу частину проби з проби, доставленої в лабораторію. Включіть деталі, що відносяться до зберігання, підготовки та утилізації матеріалу проби.

12.14. Калібровка

Вкажіть критичні етапи аналітичного процесу, де необхідний ретельний контроль та калібрувальні операції. Дайте перехресні посилання на відповідні розділи, представлені вище. Включіть опис процесу калібрування обладнання: які прилади вимагають калібрування, як проводиться калібрування, які матеріали застосовують при калібруванні і як часто необхідно його проводити? Візьміть до уваги простежуваність калібрантів і вкажіть на обмеження, пов'язані з терміном зберігання калібрантів.

12.15. Контроль якості

Опишіть необхідні процедури контролю якості, частоту перевірок у рамках КЯ при аналізі товарної партії, критерії проходження контролю/вибраковування і дії в разі невідповідності резуль-

татів контролю. Дайте перехресні посилання на відповідні розділи, представлені вище.

12.16. Методика

Опишіть аналітичну методику, даючи перехресні посилання на відповідні розділи там, де це необхідно, включаючи пронумеровані реактиви, прилади та обладнання. Там, де вказані критично важливі для методики параметри процесів (час, температура і т. д.), слід дати перехресні посилання на відповідну частину розділу калібрування. Вкажіть, на якому етапі аналітичної методики застосовують КЯ і проводять калібрування.

Якщо процедури екстракції та очищення матеріалів є особливо складними, то на них може знадобитися окремий затверджений документ.

12.17. Розрахунки

Запишіть рівняння для розрахунку результатів, переконавшись в тому, що всі члени рівняння чітко визначені й описані. Вкажіть вимоги до контролю і дайте посилання на нормативи контролю якості.

12.18. Особливі випадки

Додайте всі модифікації методу, необхідність в яких виникає через наявність або відсутність в аналізованих пробах специфічних компонентів.

12.19. Складання звіту, разом з представленими результатами

Вкажіть, у якій формі варто представляти результати, включаючи способи округлення чисел, одиниці виміру, в яких виражений кінцевий результат, його невизначеність і довірчу ймовірність.

12.20. Додаток. Валідація методу

В залежності від кількості процедур, необхідних для валідації методу, можливо, доведеться перерахувати їх у даному розділі або дати посилання на окремий файл.

12.21. Додаток. Невизначеність вимірювання

Слід вказати основні джерела загальної невизначеності методики. Необхідно згадати внесок невизначеностей, що не враховуються при остаточному розрахунку через їх незначні величини. Вкажіть загальну невизначеність і поясніть, як вона була розрахована. Можна дати перехресне посилання на файл, який представляє більш детальне обговорення питання.

12.22. Бібліографія

Включіть всі посилання, що містять інформацію з розробки та валідації методики.

ДОДАТОК 13

Таблиця критичних значень двохсторонніх t-критеріїв Стюдента

v	Рівні вірогідності (%)						
	80	90	95	98	99	99,8	99,9
1	3,078	6,314	12,71	31,82	63,66	318,3	696,6
2	1,886	2,920	4,303	6,965	9,925	22,33	31,60
3	1,638	2,353	3,182	4,541	5,841	10,21	12,92
4	1,533	2,132	2,776	3,747	4,604	7,173	8,610
5	1,476	2,015	2,571	3,365	4,032	5,893	6,869
6	1,440	1,943	2,447	3,143	3,707	5,208	5,959
7	1,415	1,895	2,365	2,998	3,499	4,785	5,408
8	1,397	1,860	2,306	2,896	3,355	4,501	5,041
9	1,383	1,833	2,262	2,821	3,250	4,297	4,781
10	1,372	1,812	2,228	2,764	3,169	4,144	4,587
11	1,363	1,796	2,201	2,718	3,106	4,025	4,437
12	1,356	1,782	2,179	2,681	3,055	3,930	4,318
13	1,350	1,771	2,160	2,650	3,012	3,852	4,221
14	1,345	1,761	2,145	2,624	2,977	3,787	4,140
15	1,341	1,753	2,131	2,602	2,974	3,733	4,073
16	1,337	1,746	2,120	2,583	2,921	3,686	4,015
17	1,333	1,740	2,110	2,567	2,898	3,646	3,965
18	1,330	1,734	2,101	2,552	2,878	3,610	3,922
19	1,328	1,729	2,093	2,539	2,861	3,579	3,883
20	1,325	1,725	2,086	2,528	2,845	3,552	3,850
21	1,323	1,721	2,080	2,518	2,831	3,527	3,819
22	1,321	1,717	2,074	2,508	2,819	3,505	3,792
23	1,319	1,714	2,069	2,500	2,807	3,485	3,768
24	1,318	1,711	2,064	2,492	2,797	3,467	3,745

25	1,316	1,708	2,060	2,485	2,787	3,450	3,725
26	1,315	1,706	2,056	2,479	2,779	3,435	3,707
27	1,314	1,703	2,052	2,473	2,771	3,421	3,690
28	1,313	1,701	2,048	2,467	2,763	3,408	3,674
29	1,311	1,699	2,045	2,462	2,756	3,396	3,659
30	1,310	1,697	2,042	2,457	2,750	3,385	3,646
40	1,303	1,684	2,021	2,423	2,704	3,307	3,551
50	1,299	1,676	2,009	2,403	2,678	3,261	30496
60	1,296	1,671	2,000	2,390	2,660	3,232	3,460
70	1,294	1,667	1,994	2,381	2,648	3,211	3,435
80	1,292	1,664	1,990	2,374	2,639	3,195	3,416
90	1,291	1,662	1,987	2,368	2,632	3,183	3,402
100	1,290	1,660	1,984	2,364	2,626	3,174	3,391
∞	1,282	1,645	1,960	2,326	2,576	3,090	3,291

УМОВНІ СКОРОЧЕННЯ

АДГ	– алкогольдегідрогеназа (ЕС 1.1.1.1);
АлАТ	– аланінамінотрансфераза (ЕС 2.6.1.2);
АЛДГ	– ацетальдегіддегідрогеназа (ЕС 1.2.1.3);
АМ	– апікальна мембрана;
АНС	– 1-анілінонафталін-8-сульфонат;
АО	– антиокиснювальна система;
АОЗ	– антиоксидантний захист;
АсАТ	– аспартатамінотрансфераза (ЕС 2.6.1.1);
АТФ	– аденозинтрифосфорна кислота;
АДФ	– аденозиндифосфорна кислота;
АМФ	– аденозинмонофосфорна кислота;
АХП	– алкогольна хвороба пеїнки;
ВГЛ	– відновлений глутатіон
ВЖК	– вільні жирні кислоти;
ГГТП	– γ -глутамілтрансфераза (ЕС 2.3.2.2);
ГЛДГ	– глутаматдегідрогеназа (ЕС 1.4.1.2);
ГП	– глутатіонпероксидаза (ЕС 1.11.1.9);
ГР	– глутатіонредуктаза (ЕС 1.6.4.2);
Г-6-ФДГ	– глюкозо-6-фосфатдегідрогеназа (ЕС 1.1.1.49);
ГХДХК +ГДХК	– глікохено- і глікодезоксихолева кислоти;
ГХК	– глікохолева кислота;
2,4-Д	– 2,4-дихлорфеноксиоцтова кислота;
ДГК	– докозагексаєнова кислота;
ДК	– дієнові кон'югати;
ДПК	– докозапентаєнова кислота;
ЕЖК	– есенційні жирні кислоти;
ЕПР	– ендоплазматичний ретикулум;
ЕХС	– естерифікований холестерол;
ЖК	– жирні кислоти;
ЗЛ	– загальні ліпіди;
ЗПВ	– задня порожниста вена;
ЗФЛ	– загальні фосfolіпіди;
Кат	– каталаза (ЕС 1.11.1.6);
КЛ	– кардіоліпін;
ЛДГ	– лактатдегідрогеназа (ЕС 1.1.1.27);

ЛП	– ліпопротеїн;
ЛПВЩ	– ліпопротеїни високої щільності;
ЛПДНЩ	– ліпопротеїни дуже низької щільності;
ЛПЛ	– ліпопротеїнліпази (ЕС 3.1.1.34);
ЛПНЩ	– ліпопротеїни низької щільності;
ЛФ	– лужна фосфатаза (ЕС 3.1.3.1);
ЛФХ	– лізофосфатидилхолін;
ЛХК	– літохолева кислота;
МДА	– малоновий діальдегід;
МК	– мікросомальна мембрана;
МНЖК	– мононенасичені жирні кислоти;
МЕОС	– мікросомальна ензимна окиснювальна система;
НАДН	– нікотинамідаденіндинуклеотид відновлений;
НАДФН	– нікотинамідаденіндинуклеотидфосфат відновлений;
НЖК	– насичені жирні кислоти;
НПЗП	– нестероїдні протизапальні препарати;
ПНЖК	– поліненасичені жирні кислоти;
ПОЛ	– пероксидне окиснення ліпідів;
СМ	– сфінгомієлін;
СМЧЕ	– субмітохондріальні частини (ентероцити);
СМЧП	– субмітохондріальні частини (печінка);
СОД	– супероксиддисмутаза (ЕС 1.15.1.1);
ТАГ	– триацилгліцерол(и);
ТБК-активні продукти	– тіобарбітурової кислоти активні продукти;
ТХДХК + ТДХК	– таурохено- і тауродезоксихолева кислоти;
ТХК	– таурохолева кислота;
ТХОК	– трихлороцтова кислота;
ФЕ	– фосфатидилетаноламін;
6-ФГДГ	– 6-фосфоглюкуронатдегідрогеназа (ЕС 1.1.1.44);
ФІ	– фосфатидилінозитол;
ФЛ	– фосфоліпід(и);
ФС	– фосфатидилсерин;
ФХ	– фосфатидилхолін;
ХДХК + ДХК	– хено- і дезоксихолева кислоти;

- ХК – холева кислота;
- ХС – холестерол;
- ЦТК – цикл трикарбонових кислот (цикл Кребса).

АВТОРИ

Томчук Віктор Анатолійович, д-р вет. наук, професор, завідувач кафедри біохімії ім. акад. М. Ф. Гулого Національного університету біоресурсів і природокористування України.

Грищенко Вікторія Анатоліївна, д-р вет. наук, професор кафедри біохімії ім. акад. М. Ф. Гулого Національного університету біоресурсів і природокористування України.

Цвіліховський Валерій Іванович, канд. біол. наук, доцент кафедри біохімії ім. акад. М. Ф. Гулого Національного університету біоресурсів і природокористування України.