

**НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУРСІВ І
ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ**
Факультет ветеринарної медицини
Кафедра біохімії ім. акад. М.Ф. Гулого

МЕТОДИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ

для аудиторних занять з дисципліни

“ВЕТЕРИНАРНА КЛІНІЧНА БІОХІМІЯ”

для студентів факультету “Ветеринарна медицина”
спеціальності 6.110101 – ветеринарна медицина,
освітньо-кваліфікаційний рівень – “Бакалавр”



Київ – 2016

Наведено методичну інформацію щодо поглиблення теоретичних знань і лабораторних навичок з дисципліни “Ветеринарна клінічна біохімія” студентів факультету “Ветеринарна медицина” під час виконання смостійної роботи з клініко-біохімічних досліджень патологій органів серцево-судинної, дихальної, травної та сечовивідної систем згідно навчальної програми підготовки фахівців спеціальності 6.110101– “Ветеринарна медицина” освітньо-кваліфікаційного рівня – “Бакалавр”.

Рекомендовано вченою радою факультету ветеринарної медицини НУБіП України протокол № 13 від 30 червня 2016 р.

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

Рецензенти: М.І. Цвіліховський, О.В. Арнаута

НАВЧАЛЬНЕ ВИДАННЯ
МЕТОДИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ
для аудиторних занять з дисципліни
“ВЕТЕРИНАРНА КЛІНІЧНА БІОХІМІЯ”
для студентів факультету “Ветеринарна медицина”
спеціальності 6.110101 – ветеринарна медицина,
освітньо-кваліфікаційний рівень – “Бакалавр”

Укладачі: ТОМЧУК Віктор Анатолійович
ГРИЩЕНКО Вікторія Анатоліївна
ЦВІЛІХОВСЬКИЙ Валерій Іванович

Відповідальний за випуск В.А. Томчук

Зав. видавничим центром НУБіП України А.П. Колесніков
Редактор З.І. Маренець

Підписано до друку
Ум. друк. арк.6,9
Тираж 100 пр.

Формат 60x84 1/16
Обл.-вид.арк.
Зам.

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

ЗМІСТ

	Вступ.....	6
	Правила техніки безпеки при роботі в біохімічній лабораторії.....	6
ТЕМА 1.	ОБ'ЄКТИ КЛІНІКО-БІОХІМІЧНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ.....	7
	Деякі правила забору проб біорідин.....	10
	Загальні тактичні принципи клінічної біохімії.....	14
	Біохімічні констеляції.....	15
	Залікові питання до теми.....	17
ТЕМА 2.	БІОХІМІЧНІ ДОСЛІДЖЕННЯ ПРИ ЗАХВОРЮВАННЯХ СЕРЦЕВО-СУДИННОЇ СИСТЕМИ.....	18
	Лабораторна діагностика ІХС.....	20
	Залікові питання до теми.....	24
	Лабораторні роботи.....	24
ТЕМА 3.	КЛІНІКО-БІОХІМІЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА ПАТОЛОГІЧНИХ ПРОЦЕСІВ У ЛЕГЕНЯХ.....	26
	Енергетичні процеси в легеневій тканині.....	26
	Особливості метаболізму білків у легенях.....	27
	Роль протеогліканів і глікопротеїнів у легенях.....	27
	Ліпіди при легеневій патології.....	29
	Обмін біологічно активних речовин.....	30
	Система імунного захисту бронхолегеневого апарату.....	32
	Біологічна роль бронхолегеневого апарату.....	33
	Патохімія та клінічна біохімія при запальному процесі в легенях.....	36
	Залікові питання до теми.....	38
	Лабораторні роботи.....	38
ТЕМА 4.	БІОХІМІЧНІ ДОСЛІДЖЕННЯ ПРИ ЗАХВОРЮВАННЯХ ШЛУНКОВО-КИШКОВОГО ТРАКТУ І ПЕЧІНКИ.....	39
	Порушення метаболічних процесів при хворобах шлунково-кишкового тракту і їх діагностика.....	39
	Порушення метаболічних процесів при хворобах печінки.....	43
	Обмін речовин у печінці та клініко-біохімічні показники, що характеризують його порушення.....	46
	Метаболізм вуглеводів.....	46
	Метаболізм ліпідів.....	47
	Метаболізм амінокислот та білків.....	48
	Метаболізм пігментів.....	50
	Порушення процесу жовчоутворення. Жовчнокам'яна хвороба	52
	Ферменти печінки та їх роль у діагностиці захворювань.....	54
	Синдромна класифікація функціональних проб.....	55
	Алгоритм досліджень функцій печінки.....	56
	Залікові питання до теми.....	59
	Лабораторні роботи.....	60

ТЕМА 5. БІОХІМІЧНІ ПОКАЗНИКИ ПРИ ЗАХВОРЮВАННЯХ НИРОК І СЕЧОВИДІЛЬНОЇ СИСТЕМИ.....	61
Структурно-функціональна характеристика нирок.....	61
Патологічні стани нирок.....	65
Найбільш поширені захворювання нирок та їх біохімічні констеляції.....	67
Патологічні компоненти сечі.....	69
Клініко-діагностична характеристика сечокам'яної хвороби..	71
Залікові питання до теми.....	74
Лабораторні роботи.....	74
ЛАБОРАТОРНІ РОБОТИ	75
Лабораторна робота № 1. Визначення активності креатинкінази в сироватці крові уніфікованим методом з використанням креатину як субстрату.....	75
Лабораторна робота № 2. Визначення активності лактатдегідрогенази в сироватці крові.....	77
А. Уніфікований метод визначення за реакцією з 2,4-динітрофенілгідразином (метод Севела-Товарека).....	77
Б. Електрофоретичне розділення ізоферментів ЛДГ на плівках з ацетату целюлози.....	78
Лабораторна робота № 3. Визначення рівня β- і пре-β-ліпопротеїдів у сироватці крові експрес-методом.....	79
Лабораторна робота № 4. Визначення вмісту холестеролу	80
А. Визначення кількості холестеролу в ЛПВГ (α-ЛП).....	80
Б. Визначення загального холестеролу в сироватці крові прямим методом, що ґрунтується на реакції Лібермана-Бурхарда (метод Ілька).....	81
Лабораторна робота № 5. Методи визначення міоглобіну...	82
А. Метод висолювання (проба Блонгейма).....	82
Б. Ідентифікація Mb методом електрофорезу.....	82
Лабораторна робота № 6. Визначення вмісту загального білка в сироватці (плазмі) крові біуретовим (уніфікованим) методом.....	85
Лабораторна робота № 7. Визначення вмісту сіалових кислот в плазмі крові.....	86
Лабораторна робота № 8. Проби на колоїдну стійкість сироватки крові.....	87
А. Тимолова проба.....	87
Б. Стрічка Вельтмана.....	88
Лабораторна робота № 9. Уніфікований метод визначення сечовини в сироватці крові за кольоровою реакцією з діацетилмонооксимом.....	88

Лабораторна робота № 10. Визначення активності α -амілази в сироватці крові та в сечі уніфікованим амілокластичним методом зі стійким крохмальним субстратом(методом Каравея).....	90
Лабораторна робота № 11. Визначення активності ліпази в сироватці крові уніфікованим методом з використанням мастинової олії як субстрату.....	92
Лабораторна робота № 12. Визначення вмісту білірубину в сироватці крові за діазореакцією при наявності акселератора (метод Ієндрашика, Клеггорна та Грофа).....	94
Лабораторна робота № 13. Визначення білка в сечі.....	97
Якісні реакції на білок у сечі	97
Проба кип'ятінням.....	97
Проба з азотною кислотою.....	97
Проба з сульфосаліциловою кислотою.....	98
Проба з калієм зілізосинеродистим калієм.....	98
Кількісне визначення білка в сечі	98
Визначення білка в сечі з 3 % сульфосаліциловою кислотою	98
Метод з азотною кислотою (Роберта-Стольникова).....	99
Експрес-метод визначення білка в сечі діагностичними смужками.....	100
Лабораторна робота № 14. Визначення креатиніну.....	101
А. Визначення вмісту креатиніну в сироватці за кольоровою реакцією Яффе (метод Поппера).....	101
Б. Визначення кількості креатиніну в сечі.....	102
Лабораторна робота № 15. Визначення активності трансамінази в сироватці крові уніфікованим методом	104
СПИСОК РЕКОМЕНДОВАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ	106

ВСТУП

Клінічна біохімія – це прикладний розділ біохімії, який вивчає біохімічні процеси в організмі тварин в нормі та патології для оцінки стану здоров'я, постановки діагнозу і з'ясування механізму розвитку хвороби, її прогнозу та ефективності призначеної фармакорекції.

Клінічна біохімія виникла і сформувалася на межі біологічної хімії та клінічної лабораторної діагностики. За допомогою біохімічних методів дослідження виконується до 75 % лабораторних аналізів. Переважне застосування методів клінічної хімії пояснюється насамперед тим, що в основі патогенезу більшості захворювань лежить первинне та вторинне порушення обміну речовин.

ПРАВИЛА ТЕХНІКИ БЕЗПЕКИ ПРИ РОБОТІ В БІОХІМІЧНІЙ ЛАБОРАТОРІЇ

Виконання більшості лабораторних робіт може нести певну небезпеку для самого виконавця та оточуючих. Щоб уникнути цього, потрібно виконувати нижченаведені правила:

- приступати до виконання лабораторного завдання дозволяється тільки після детального вивчення та усвідомлення теоретичної частини методики;
- не дозволяється виконувати процедури, які не описані в роботі;
- роботи виконувати у спеціальному одязі (халат, шапочка), на своєму робочому місці або під витяжною шафою, у випадку використання токсичних, ароматичних або вогненебезпечних речовин;
- з усіх незрозумілих питань звертатися за порадою до викладача;
- у лабораторії заборонено приймати їжу, пити воду, палити та бешкетувати;
- забороняється куштувати хімічні речовини;
- при роботі із скляними піпетками необхідно користуватись спеціальними гумовими “грушами”;
- при роботі на центрифугах слід пам'ятати про необхідність зрівноваження пробірок;
- дотримуватись правил роботи та безпеки при роботі з електроприладами;
- при роботі з кислотами, лугами, металевою ртуттю слід пам'ятати, що відпрацьовані речовини слід знешкоджувати і не зливати у каналізаційні труби;
- у разі нещасного випадку негайно повідомити викладача та скористатися аптечкою першої допомоги;
- після завершення дослідів необхідно привести робоче місце, прилади та посуд у належний стан;
- прослідкувати щоб були вимкнені прилади, світло, вода.

ТЕМА 1. ОБ'ЄКТИ КЛІНІКО-БІОХІМІЧНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ

Основними об'єктами клініко-біохімічних досліджень здебільшого є **біологічні рідини**: кров, плазма, сироватка, лімфа, рідше – інші рідини внутрішніх середовищ організму (спинномозкова рідина, внутрішньосуглобова рідина та ін.); використовуються також **екскрети**, такі як сеча, жовч, слина, шлунковий та кишковий сік, кал, піт, жіноче молоко, сім'яна рідина; **шматочки тканини** (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. Деякі екскрети й тканини аналізують рідше.

Кров рекомендовано брати вранці (між 7-ю і 8-ю годинами), до фізичного навантаження й діагностичних процедур. Якщо для виконання більшості тестів взяття крові проводять після 8 – 12 год. голодування, то для визначення триацилгліцеролів необхідно витримати 10 – 12-годинний інтервал після вживання корму.

Положення тіла впливає на концентрацію загального білка, альбуміну, креатину, холестеролу, триацилгліцеролів, на активність лужної фосфатази, аспартатамінотрансферази та інших компонентів плазми. Вміст цих речовин та активність ферментів істотно підвищуються при зміні положення тіла з горизонтального положення на вертикальне і, навпаки, зменшуються – у горизонтальному. Максимальна зміна характерна для рівня загального білка, активності ферментів (11 %) та вмісту кальцію (3 – 4 %).

При заборі крові шляхом венепункції 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.

Для запобігання гемолізу, кров необхідно брати сухим шприцем, сухою голкою (одноразового використання), у суху пробірку й у стерильних умовах. Якщо набрана шприцем кров переноситься в пробірку, то цю процедуру здійснюють повільно (для запобігання спінювання крові).

Гемолізовані сироватку і плазму не рекомендується використовувати для аналізу, за винятком деяких випадків. Так, гемолізати цілісної крові можна використати для визначення активності фруктозомонофосфатальдолази, вмісту глюкози та для деяких інших тестів.

Звичайно сироватку крові тримають у холодильнику при 0 – 4 °С. Припускається її зберігання впродовж місяця (й навіть більше) за умови замороження відразу після отримання та при одноразовому розмороженні безпосередньо перед визначенням. Проте відомо, що активність лужної фосфатази стабільніша при кімнатній температурі (не змінюється декілька діб).

У разі зберігання сироватки при зниженні температури (0 – 4 °С) активність цього ферменту поступово підвищується, досягаючи найбільшої виразності через 12 – 24 год. Якщо ж дані про стабільність речовин, які визначаються, відсутні, рекомендується проводити біохімічний аналіз відразу ж після забору крові.

Досліджуваний матеріал, як правило, зберігають до завершення всіх аналізів, що дозволяє в разі необхідності повторити визначення.

Для правильного тлумачення результатів біохімічних досліджень слід враховувати такі принципи.

1. При дослідженні біохімічних показників у біологічних рідинах необхідно пам'ятати, 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 коливаються дуже помітно, що необхідно враховувати при трактуванні результатів і порівнянні даних, отриманих у різні періоди відповідного ритму. Ці фактори набувають великого значення останнім часом завдяки розвиткові нового напрямку в лікуванні захворювань – хронотерапії.

3. Біохімічний склад біорідин та його зміни під впливом елементів зовнішнього середовища 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 тварин, а на *референтні (довідкові) показники*, отримані з

урахуванням вищезгаданих факторів, адже на ці показники орієнтуються в усіх країнах світу. При проведенні наукових досліджень, вивченні впливу лікувальних заходів, фармакологічних препаратів та ін. доцільно створювати спеціальну, контрольну групу (не менше 30 – 40 умовно здорових тварин) і спиратись 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, який би правильно відображав 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, аби уникнути так званих позалабораторних помилок.

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 (уведення 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 (п. 1), 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 людину, 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 ліпідного обміну, подагри, гіперпаратиреоїдизму і особливо спадкової патології.

Слід пам'ятати: не можна ставити діагноз лише на підставі даних лабораторних досліджень. Необхідно мати відомості про стан хворої тварини, спілкуватися з лікарем, що його лікує, тобто дотримуватися клініко-біохімічних паралелей.

Важливе значення в одержанні правильних результатів має здійснення діагностичною лабораторією контролю якості. Він має три етапи:

- 1) доаналітичний;
- 2) аналітичний;
- 3) постаналітичний.

Доаналітичний етап включає правильний забір матеріалу, його транспортування, реєстрування, зберігання і т. ін.

Різноманітність біохімічних досліджень вимагає раціональної тактики їх проведення і виконання другого, **аналітичного** етапу контролю якості, 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 додержання правил реєстрування даних досліджень у спеціальному журналі, оформлення аналізів, наведення в ньому показників референтної норми тощо.

Деякі 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. При заборі в одного пацієнта кількох проб біоматеріалу необхідно нумерувати їх або вказувати час забору, при збиранні сечі за добу – точно вказувати пацієнтові час початку і кінця процедури, необхідну дієту тощо.

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. 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 пови-

нен мати речовини, 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).

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 пацієнтові проводиться внутрішньовенна терапія, то кров для аналізу слід брати далі від місця вливання (наприклад, з іншої руки), 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.). Сироватку треба якомога швидше відділяти від згустка, щоб його компоненти не впливали на вміст метаболітів у сироватці. Уразі лізису еритроцитів, зосереджених у згустку, до сироватки крові потрапляють ферменти, які в них локалізовані. Цим пояснюється, наприклад, більш висока активність ензимів (лактатдегідрогенази, аланін-, аспартатамінотрансферази, фруктозодифосфатальдолази, кислої фосфатази, аргінази, фосфогексоізомерази та інших ферментів, 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 сироватки, що також впливатиме на біохімічні показники. Плазму отримують після додавання до крові відповідних антикоагулянтів, але необхідно враховувати їхній вплив на окремі показники (табл. 1).

Для отримання сироватки антикоагулянт не додають. Пробірки з кров'ю закривають пробкою і ставлять на 10 – 15 хв. у термостат для прогрівання при температурі 37 °С. Потім обережно проводять дротинкою або скляною паличкою по внутрішній стінці пробірки, щоб прискорити одержання сироватки. Притримуючи згусток скляною паличкою, сироватку зливають до центрифужної пробірки й центрифугують.

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.

Якщо сироватку необхідно отримати терміново, то кров центрифугують зразу ж після її взяття протягом 15 хв. при 1500 об/хв. на клінічній центрифугі. Отриману сироватку переносять до центрифужної пробірки і знов центрифугують протягом 10 хв.; потім розливають у декілька пробірок для виконання окремих досліджень.

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. Якщо ж дослідження відкладаються до наступного дня, пробірку із сироваткою закривають пробкою і ставлять у холодильник, де зберігають при температурі 4 °С (якщо це дозволяє відповідний метод).

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.

Таблиця 1. Приготування розчинів антикоагулянтів, які найчастіше використовують, і протипоказання до їх застосування в лабораторній практиці

Антикоагулянт	Приготування розчинів та їх використання	Лабораторні тести, визначенню яких заважають відповідні антикоагулянти
Натрію оксалат $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$	300 мг щавлевокислого натрію розчиняють у 20 мл (Бія) здистильованої води. Використовують 0,1 мл розчину на 2 мл крові. Для стабілізації крові при приготуванні плазми без фактора згортання I і для приготування барієвосульфатної плазми використовують 0,1 моль/л розчину (13,4 г/л) натрію оксалату. Додають з розрахунку 0,1 мл на 1 мл крові.	Електроліти (К, Na, Са), 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/л) готують на дистильованій воді, кип'ятять, фільтрують, зберігають при 4 °С.	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/л (з урахуванням наважки кристалізаційної води). Зберігають у скляній пляшці з притертою пробкою, краще в холодильнику при 4 °С. Поновлюють кожні 10-14 діб. 1 об'єм розчину лимоннокислого натрію додають до 9 об'ємів крові.	α -амілаза крові
Етилендіамін тетраацетат або його динатрієва сіль: ЕДТА-натрій (селектон Б, хелатон, версен, трилон Б)	300 мг натрію етилендіамінтетраацетату (динатрієва сіль, дигідрат) розчиняють у 20 мл (бі-) здистильованої води. Якщо ЕДТА розчиняється повільно, важко, можна до порції дистильованої води додати луги (до рН = 8,4...8,6), а потім шляхом внесення кислоти відновити попередню нейтральну реакцію розчину. На 2 мл крові беруть 0,1 мл розчину, що містить 1,5 мг антикоагулянту. Припускається всипати ЕДТА в пробірку з розрахунку 1 мг порошку на 1 мл крові. ЕДТА-натрій на відміну від інших антикоагулянтів не порушує морфологічну структуру еритроцитів (не «зморщує» їх). Зв'язуючи поряд з іонами кальцію та магнію іони металів змінної валентності, ЕДТА тим самим запобігає інтенсифікації <i>in vitro</i> пероксидного окиснення ліпідів.	Електроліти (К, Na, Са), залишковий азот
Гепарин (з активністю 1000 од. в 1 мл)	0,01 мл беруть на 5 мл крові або краплю гепарину – на весь об'єм пробірки	
Натрію гепаринат або калію гепаринат	60 мг гепаринату розчиняють у 20 мл (бі-) здистильованої води. Беруть 0,1 мл розчину на 2 мл крові	Електроліти (К, Na)
Літію гепаринат	Так само	Лужна фосфатаза
Амонію гепаринат	– // –	Аміак
Цитратно-глюкозна суміш (використовується для дослідження метаболічних, ферментативних процесів в еритроцитах, а також для визначення активності кислої фосфатази)	4,7 г лимонної кислоти, 16 г тризаміщеного натрію цитрату, 25 г глюкози розчиняють у 1000 мл (бі-) здистильованої води. Беруть 1 частину розчину на 4 частини крові. (Наведені кількісні співвідношення можуть бути зменшені відповідно в 10 або іншу кількість разів)	Електроліти, глюкоза

Примітка. Натрію оксалат або калію оксалат іноді вносять у пробірку на кінчику скальпеля (приблизно 0,01 г).

Тривале зберігання крові без відділення від еритроцитів може спричинити підвищення вмісту калію, креатинфосфату (КФ), активності амінотрансфераз, лактатдегідрогенази (ЛДГ), сорбітолдегідрогенази (СДГ) та інших ферментів.

Вплив різних лікувальних маніпуляцій із 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 викликають спазм сфінктера Оді, змінюють концентрацію білірубину в крові. Відзначається також взаємодія метаболітів з реактивами в процесі лабораторного дослідження. Так, хлоралгідрат збільшує показник азоту 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). Мета обстеження має набір, комбінацію і частоту 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 у контингентах, що пов'язані з факторами ризику. 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 отримати якомога точнішу 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 із цих синдромів відповідає специфічна біохімічна констеляція, тобто добір біохімічних тестів.

Біохімічні констеляції

Біохімічні констеляції (спектри біохімічних тестів) – це їх сукупність, за результатами якої можна поставити діагноз. Такі констеляції існують для діагностики понад 100 видів патології. Деякі з них наведені у табл. 2.

Отже, головне завдання лабораторії клінічної біохімії полягає в тому, щоб забезпечити лікаря біохімічною інформацією, необхідною для лікування хворої тварини.

Таблиця 2. Найбільш ефективні комбінації біохімічних тестів у діагностиці деяких захворювань

Вид патології	Біохімічний тест	Напрямок змін
Нецукровий діабет первинний	Добовий об'єм сечі	П
	Відносна густина сечі	П
	Осмолярність сечі	З
	Глюкоза в сечі	(-)
	Вазопресинів тест	(+)
Цукровий діабет	Глюкоза в крові	П
	Глюкоза в сечі	(+)
	Інсулін у крові	З або П
	Антагоністи інсуліну: соматотропні, адренокортикотропний гормон (АКТГ), гідрокортизон, адреналін, глюкагон	П
Холецистит	Печінкові проби в крові	Н
	Білірубін в крові	П
	Білірубін в сечі	П
	Уробіліноген в сечі	П
Рак жовчних шляхів	Білірубін у крові та в сечі	П
	Жовчні пігменти в калі	(-)
	Холестерол у крові	П
	Лужна фосфатаза в крові	П
	Протромбіновий час в крові	З
Вірусний гепатит	Лактатдегідрогеназа в крові	П
	Аланінамінотрансфераза в крові (АЛАТ)	П
	Аспартатамінотрансфераза в крові (АсАТ)	П
	Коефіцієнт АЛАТ/АсАТ	П
	Сорбітолдегідрогеназа в крові	П
	Білірубін (прямий та непрямий)	П
	Уробіліноген та білірубін у сечі	(+)
	Тимолова проба	(+)!
	Електрофореграма: альбумін	З
	α_2 - та β -Глобуліни	П
γ -глобуліни (пізніше)	П	
Ниркова недостатність	Сечовина, креатинін у крові	П
	pH, pCO ₂ в крові	З
	Неорганічний фосфат у крові	П
	Осмолярність сечі	З
	Кальцій у сечі	П
	Білок у сечі	(+)
	Кліренс інсуліну	З

	Загальний білок, натрій, кальцій, калій у крові	П
Пневмонія	Ізофермент ЛДГ ₃ в крові	П
	С-реактивний білок у крові	(+)
	Сіалові кислоти в крові	П

Така інформація має цінність лише в тому випадку, якщо вона точна, відповідає клінічній ситуації та допомагає лікареві прийняти правильне рішення,

У 5 % здорових тварин значення деяких показників біохімічного аналізу лежать за межами «нормального діапазону». «Ненормальний» результат аналізу не завжди вказує на наявність патології, так само як «нормальний» результат – на її відсутність. Однак чим більше відхилення від «норми», тим більша ймовірність того, що це пов'язано з патологічним процесом. Правильний діагноз хворому можна визначити лише на підставі комплексу біохімічних аналізів.

Залікові питання до теми

1. Визначення клінічної біохімії.
2. Основні об'єкти клініко-біохімічних досліджень.
3. Рекомендації щодо забору крові.
4. Умови зберігання крові.
5. Основні принципи біохімічних досліджень.
6. Використання цілісної крові для біохімічних досліджень.
7. Одержання плазми й сироватки крові.
8. Антикоагулянти, які використовують у лабораторній практиці.
9. Вплив різних маніпуляцій та лікарських препаратів на результати біохімічних досліджень.
10. Загальні тактичні принципи клінічної біохімії.
11. Біохімічні констеляції.

ТЕМА 2. БІОХІМІЧНІ ДОСЛІДЖЕННЯ ПРИ ЗАХВОРЮВАННЯХ СЕРЦЕВО-СУДИННОЇ СИСТЕМИ

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 ферментів анаеробних шляхів вуглеводного катаболізму. Проте навіть максимально посиленій анаеробний метаболізм не спроможний адекватно й тривалий час забезпечувати ушкоджений гіпоксичний міокард енергією. До того ж накопичення 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^+ . Зміна проникності мембранних систем Са-насосу сарколеми й саркоплазматичного ретикулуму призводить до зниження їхньої Са-акумулюючої здатності й накопичення Ca^{2+} у саркоплазмі кардіоміоцитів. Стан клітинних мембран за таких умов залежить від активації мембранних фосфоліпаз, утворення агресивно-реакційних лізофосфатидів, а також активації механізмів ліпопероксидації (ПОЛ).

Ушкодження лізосомальних мембран спричиняє вивільнення гідролаз, які, активізуючись у кислому середовищі, каталізують гідролітичне руйнування білків – ліпопротеїнів (вторинна альтерація) (рис. 1).

Означені некротичні зміни в клітині супроводжуються виходом у кровоток внутрішньоклітинних ферментів – трансаміназ, фосфатаз, лактатдегідрогене-

наз, креатинфосфокіназ тощо. У цей же період виявляються зміни фракційного складу білків міокарда – різке зниження міофібрилярних білків та накопичення білків строми. порушення обміну вуглеводів, білків 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, спільну ланку патогенезу різноманітних форм ушкодження серцевого м'яза – від спадкових кардіопатій до недостатності гіпертрофованого серця.

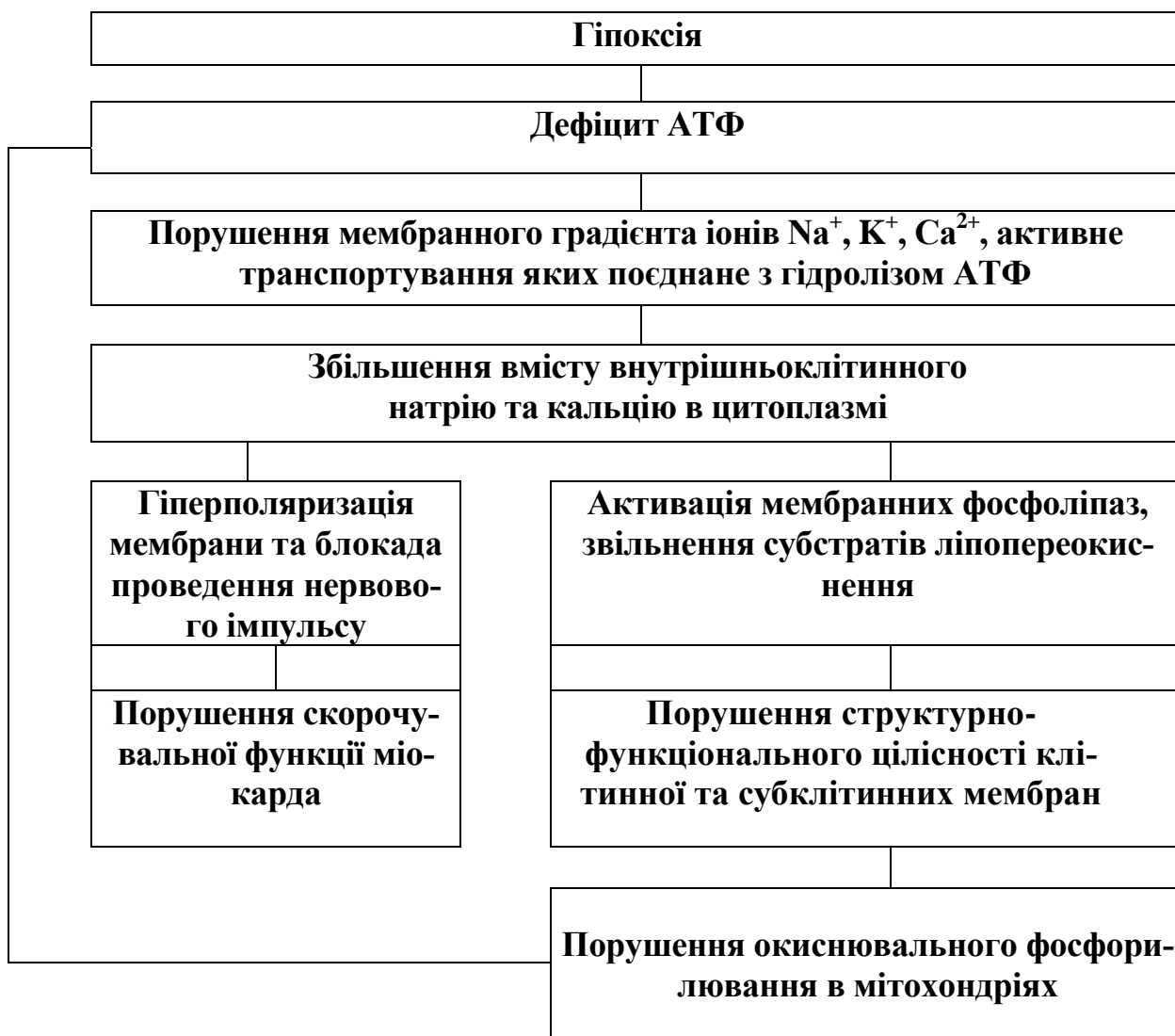


Рис. 1. Патохімічні зрушення в серцевому м'язі при гіпоксії

Лабораторна діагностика ІХС

У переважної 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 ферментів аспартатамінотрансферази (АсАТ), лактатдегідрогенази (ЛДГ), креатинфосфокінази (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 ізоферментів. Так, МВ-фракція креатинфосфокінази визначається лише в серці й не міститься в інших органах. Гіперферментемія 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 ферменту відповідає такому ж вмістові 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 лактатдегідрогенази. Гіперферментемія 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 реактанти гострої фази (С-реактивний протеїн, α_1 -глікопротеїд, α_1 -антитрипсин) та міоглобін. За допомогою доступних рутинних методів 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 вуглеводного, білкового, ліпідного обмінів, кислотно-лужного стану, електролітного балансу, гормонального профілю. Так, у гострій фазі ІМ імовірна гіперглікемія, іноді навіть глюкозурія. У крові зменшується кількість альбумінів, підвищується (удвічі й більше) вміст α_2 -глобулінів, а також γ -глобулінів, фібриногену. На 2-у – 3-ю добу виявляється позитивна реакція на С-реактивний протеїн (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 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 ферментів крові, зважати на зміни їх співвідношення МВ – КК (загальна КК зростає від 3 до 40 %, КК/АсАТ – від 2 до 9,6 %, КК/ЛДГ – від 0,27 до 1,6 %. Відношення показників активності КК/АсАТ має високе діагностичне значення при диференційній діагностиці інфаркту міокарда та ураженні скелетних м'язів: відношення КК/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 КК 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 густини – ЛПНГ й ліпопротеїни дуже низької густини – ЛПДНГ), багаті на хо-

лестерол, є тими первинними субстратами, які, надходячи до стінок судин у підвищеній кількості, дають поштовх атеросклеротичним змінам.

Крім холестерол-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 ЛПНГ, які відзначаються ще й малим розміром частинок. Важливою особливістю катаболізму атерогенних ЛП, який має місце при атеросклерозі, є їх попередня хімічна модифікація (глікозилювання, пероксидне окиснення, утворення комплексів ЛПНГ-антитіло, ЛПНГ-ГАГ тощо). Напружуються всі механізми поглинання ЛПНГ, 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 ЛПНГ 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 азоту оксиду (NO) – ендотеліального фактору релаксації. NO утворюється в ендотелії судин з амінокислоти *L*-аргініну під впливом ферменту NO-синтази, кофактором якої виступає тетрагідробіоптерин. Азоту 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 гу-

анілатциклазу, що, у свою чергу, посилює утворення цГМФ. Накопичення згаданого мононуклеотиду забезпечує релаксацію ГМК судинної стінки. Азоту оксид справляє також антиадгезивний та антиагрегаційний вплив на тромбоцити. При атеросклеротичному ушкодженні клітин судинної стінки продукування NO зменшується, що спричиняє явища вазоконстрикції, 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 покритишки, 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 біохімічному обстеженні хворих з підозрою на атеросклероз характерними є зміни окремих показників: у плазмі крові підвищення загального рівня ліпідів (> 7 г/л), концентрації вільного ($> 2,3$ ммоль/л), естерифікованого ($> 3,38$ ммоль/л) і загального холестеролу ($> 6,5$ ммоль/л), вмісту триацилгліцеролів (> 2 ммоль/л), співвідношення фосфоліпідів / холестерол ($< 1,5$). Повторне виявлення зазначених відхилень є свідченням високої вірогідності доклінічного (прихованого) періоду атеросклерозу.

Найбільш інформативними показниками лабораторної оцінки вираженості атеросклеротичного процесу вважають ЛПНГ, загальний холестерол (ЗХС), триацилгліцеролів (ТАГ) та ЛПВГ. У клінічних лабораторіях кількість ЛПНГ найчастіше визначають розрахунковим шляхом за прийнятими формулами.

Незалежним фактором ризику появи атеросклерозу та ІХС є зниження концентрації ЛПВГ, 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 ЛПВГ нижчий, ніж при відсутності ознак ІХС. Підвищення вмісту ЛПВГ, 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 ЛПВГ:

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 ферментів – каталази, пероксидази, підвищення в крові вмісту сечової кислоти та її співвідношення з холестеролемією, зміна окисно-відновного потенціалу слини.

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. Результати проведених біохімічних досліджень допомагають лікареві правильно визначитись, насамперед, у *диференційній діагностиці* захворювань міокарда різноманітної етіології та патогенезі з ІХС та первинним ревмокардитом.

Залікові питання до теми:

1. Зрушення окисного метаболізму в серцевому м'язі при ішемії.
2. Значення ензимодіагностики в клінічній кардіології.
3. Біохімічні констеляції в діагностиці ІХС.
4. Значення зрушень ліпідного обміну в атерогенезі.
5. Біохімічні констеляції в діагностиці атеросклерозу.
6. Біохімічні констеляції, які найчастіше використовують у діагностиці захворювань серцево-судинної системи.

Лабораторні роботи

- № 1. Визначення активності креатинкінази в сироватці крові уніфікованим методом з використанням креатину як субстрату.
- № 2. Визначення активності лактатдегідрогенази в сироватці крові.

№ 3. Визначення рівня β - і пре- β -ліпопротеїдів у сироватці крові експрес-методом.

№ 4. Визначення вмісту холестеролу.

№ 5. Метод визначення міоглобіну (Mb).

Таблиця 3. Біохімічні констеляції, які використовують у лабораторній діагностиці захворювань серцево-судинної системи

Захворювання	Біохімічний тест
Гіпертонічна хвороба	Загальний білок та білкові фракції Катехоламіни в сечі (у початковий період, під час кризів) Дофамін b-гідролаза в крові Ренін у крові Концентрація натрію в плазмі
Міокардит	Активність ферментів АсАТ, ЛДГ (ЛДГ ₁ і ЛДГ ₂), КФК (МВ-КФК) С-РП Глікопротеїди та їх компоненти (серомукоїд, сіалові кислоти) Загальний білок та білкові фракції Імунологічні дослідження (IgA та IgG, циркулюючі імунні комплекси, серологічні реакції)
Міокардіо-дистрофія	Загальний білок та білкові фракції Глікопротеїди (сіалові кислоти, серомукоїд, фібрин) Активність ферментів АсАТ, альдолази, КФК, ЛДГ _{1,2} Відповідний комплекс досліджень залежно від етіотропного фактора
Недостатність кровообігу	Загальний білок та білкові фракції Показники ліпідного обміну (холестерол, триацилгліцериди, ЛПНГ та ЛПДНГ) Глікопротеїди (сіалові кислоти, серомукоїд, фібрин) Активність АсАТ, альдолази Концентрація натрію, калію, хлоридів у крові та сечі
Перикардит	Загальний білок та білкові фракції Глікопротеїди (сіалові кислоти, серомукоїд, фібрин), С-РП Активність АсАТ, альдолази, КФК, ЛДГ, лужної фосфатази Білірубін

Ревмокардит	Загальний білок та білкові фракції, С-РП Глікопротеїди (сіалові кислоти, гаптоглобін, серомукоїд, фібрин, церулоплазмін, гексозаміни) Активність АсАТ Імунологічні дослідження (вміст IgA, IgG, IgM, титр стрептококових і тканинних антитіл, оцінка стану Т-системи імунітету) Серологічні реакції (антистрептолізиновий титр, антистрептокіназний титр тощо) Коагулограма
--------------------	--

ТЕМА 3. КЛІНІКО-БЮХІМІЧНА 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 (КФ 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 супероксиддисмутази.

Мірою метаболічної активності може слугувати ступінь використання кисню, концентрація АТФ у легеневій тканині така сама, як і в інших тканинах. Легені синтезують від 57 до 174 ммоль 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 кисню є результатом не тільки розщеплення глюкози, а й катаболізму амінокислот.

У разі гіпоксичної гіпоксії в ізоферментному спектрі ЛДГ збільшується фракція ЛДГ₅. В ізоферментному спектрі МДГ 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 Г-6-ФДГ, водночас збільшується активність карбонатгідратази (КФ 4.2.1.1), що призводить до порушення транспорту O₂ еритроцитами. Подальша перебудова обмінних процесів у еритроцитах спричинює виникнення компенсаторних механізмів транспорту O₂.

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 та білків – компонентів бронхіального секрету легень.

Особливості метаболізму білків у легенях

Легені перебувають в умовах постійного унікального 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 білків – колагену та еластину. Порівняно з іншими паренхіматозними органами кількість колагену в легенях найбільша. Ці білки забезпечують сталість форми легень і полегшують виконання ними газообмінної функції. При деяких хворобах – емфіземі й фіброзі легень – спостерігають зміну структури та властивостей цих білків. Важливу роль у фізіологічних процесах легень відіграють білки, що входять до складу сурфактанту та бронхіального секрету.

Колаген – фібрилярний білок, локалізований на рибосомах, який утворює триспиральну молекулу – мономер з М.м.270 000 Да, завдовжки 290 нм. Сполучення 5 – 8 мономерів утворює фібрилярну нитку. Протеоглікани сприяють утворенню пучків колагенових фібрил і колагенових ниток. Виділено 5 типів

легеневих колагенів, які відрізняються між собою за складом кінцевих залишків α -ланцюгів.

Еластин – фібрилярний білок 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 людей – 30 – 35 % ; у молодняка в середньому 7,3 %. Підвищений розпад еластину спостерігають у разі порушення балансу в системі ферментів 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 білком – 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 тонуусу та реакцій запалення.

Зниження концентрації α_2 -макроглобуліну спостерігають при захворюваннях легень.

Кількість α_2 -макроглобуліну в мокротинні хворих на хронічний обструктивний бронхіт у фазі загострення становить від 2,7 до 1009 мг/л, тоді як концентрація цього інгібітора в сироватці крові – 1535 мг/л (за норми 2214 мг/л). Очевидно, 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 білком та іонами кальцію.

Гепарин – глікозаміноглікан, який синтезується базофілами сполучної тканини, виявляє антикоагулювальну дію, пригнічує згортання крові завдяки своїй властивості утворювати комплекси з багатьма білками 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 фосфатидилхоліну становить 10 мкмоль Р/л, а концентрація поверхнево-активних ліпідів 20 мкмоль Р/л.

Легені містять набір ферментів 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 А₂ перебуває в основному в розчинній і неактивній формі.

Легені є першим органом на шляху хіломікронів, де завдяки наявності ліпопротеїназ, триацилгліцероліпаз вони розщеплюються, 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-, триацилгліцеролів (4 %), фосфатидилхоліну (66 %), фосфатидилетаноламіну (5 %), фосфатидилгліцеролу, фосфатидилсерину (4 %), сфінгомієліну (1 %), вуглеводів (1 %), білка (9 %). Особливістю синтезу ліпідів у легеневій тканині є утворення ліпідів

сурфактанту, особливо фосфоліпідів. Метаболізм 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 кисню зумовлює гіпоксію в легеневій тканині, що призводить до зниження процесів трансметилування й ацетилювання та порушення синтезу фосфоліпідів.

Підвищення концентрації жирних кислот зумовлене зменшенням окисних продуктів 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 знижуються 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 зв'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 ферментів. Його спостерігають у разі тривалого (понад 20 років) 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 ферменту, 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 бронхолегеневий процес, за якого активність цього ферменту різко знижується.

Вазоактивні пептиди. До них належать найбільш вивчені кініни: брадикінін, калідин, метіоніллізилбрадикінін. Усі вони утворюються з попередників кініногенів, які представлені глікопротеїдами α_2 -глобулінової фракції. За походженням кініногеніни 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 мікроциркуляцію, 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 дипептидилдипептидаза, яка може інгібуватись синтетичним препаратом каптоприлом, що є похідною N-ацилпроліну й містить SH-групи. Цей фермент досить часто називають кініназою II, або ангіотензинконвертувальним ферментом.

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 ферменти, які можуть окиснювати й метилювати 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 руйнується. Він підвищує тонус легневих вен і, меншою мірою легневих 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 ферменту 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. Простагландини 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/л. 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 легеньми повністю, інші частково, а ПГА, ПГВ і простациклін ПГI₂ не усуваються з циркуляції зовсім. Слід зазначити, що легені інактивують не тільки ПГ, що циркулюють у крові, а й ті, які синтезують самі. 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 зв'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 вузлики 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 безвіячастого 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 ферментів та інші складові бронхіального секрету**. У нижніх 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 лімфоєпітелію 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 лімфоєпітеліальних 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**).

Біологічна роль бронхолегеневого секрету

Сурфактантна система представлена клітинними та неклітинними компонентами. Клітинний компонент складається з альвеолярних 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, гінофази 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 ліпопротеїнових комплексів.

Гінофаза 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, 85 % із них становлять фосфоліпіди, 10 % – триацилгліцероли, близько 8 % – холестерол, близько 8 % – 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 (табл. 4).

Порушення в системі сурфактанту спостерігають при хронічній дисплазії, гострій та хронічній пневмонії, набряку легень, емфіземі. У разі запальних про-

цесів 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.

Таблиця 4. Характеристика мокротиння при патології легень

№ п/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.	Бронхоектактична хвороба	значна	гнійно-слизисте, тришарове	–	велика кількість лейкоцитів, кристали жирних кислот, гематоїдин, холестерол, різноманітна флора
4.	Крупозна пневмонія	спочатку незначна, пізніше	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.	Бронхолегеневий 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

Трахеобронхіальний секрет є гетерогенною речовиною, що складається з легкорозчинної 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 слизі. 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 кислотої фосфатаз.

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 фермент 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 лаважній 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 білка, альбумінів, глобулінів (α_1 , α_2), сіалових кислот, С-реактивного білка, гаптоглобіну, серомукоїдів, фібриногену. Ступінь інтенсивності місцевої запальної реакції в бронхах можна оцінити біохімічним дослідженням мокротиння (див. табл. 4) та рідини, отриманої бронхоальвеолярним лавашем. Концентрація

загального білка змінюється переважно при гнійних процесах у легенях. Гострі абсцеси легенів супроводжуються тенденцією до збільшення загального білка (впродовж перших двох місяців), при хронічних нагноєннях (бронхоектазії, хронічний абсцес, емпієма плеври) зафіксовано його зниження (75—60 %) відносно норми.

У багатьох хворих на неспецифічні захворювання легенів встановлено зниження концентрації альбуміну: помірковане – при гострій пневмонії й значне при загостренні хронічної пневмонії та деструктивних процесах у легенях. Підвищення концентрації α -глобулінів відмічають, як правило, при всіх видах легеневої патології. Збільшення у 2 – 3 рази порівняно з нормою спостерігають при ексудативно-некротичних процесах у легенях. 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 білка 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 рази порівняно з нормою. Одночасно з сіаловими кислотами зростає концентрація гаптоглобіну, яка в гостру фазу збільшується у 1,5 – 2 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 перерегородок, 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 ферментів, поглинання твердих часточок і рідких речовин. У тканині легенів знаходяться основні антиоксидантні ферменти, церулоплазмін, вітамін Е, які 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.

У рідині бронхолегеневого лаважу після центрифугування визначають білок, сіалові кислоти, гаптоглобін, Натрій, Калій, неорганічний Фосфор, а також продукти пероксидного окиснення ліпідів, активність супероксиддисмутази та глутатіонпероксидази.

Бронхіальний секрет має складні реологічні властивості, з метою визначення яких використовують тромбоеластографи. 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 білка 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 ферменти.

Залікові питання до теми:

1. Енергетичні процеси в легеневій тканині.
2. Особливості метаболізму білків у легенях.
3. Ліпіди при легеневій патології.
4. Обмін біологічно активних речовин.
5. Система імунного захисту бронхолегеневого апарату.
6. Біологічна роль бронхолегеневого секрету.
7. Патохімія та клінічна біохімія при запальному процесі в легенях.

Лабораторні роботи

- № 6. Визначення вмісту загального білка в сироватці (плазмі) крові біуретовим (уніфікованим) методом.
- № 7. Визначення вмісту сіалових кислот у плазмі крові.

ТЕМА 4. БІОХІМІЧНІ ДОСЛІДЖЕННЯ ПРИ ЗАХВОРЮВАННЯХ ШЛУНКОВО-КИШКОВОГО ТРАКТУ І ПЕЧІНКИ

Порушення метаболічних процесів при хворобах шлунково-кишкового тракту і 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 ферментів, кофакторів та субстратів і підтримання оптимального рівня рН. Захворювання шлунка, підшлункової залози, печінки та кишечника 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:

- а) у зв'язку з гальмуванням або відсутністю дії ферментів;
- б) через запальні процеси шлунка й кишечника;
- в) 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 ферментів 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 вмістом 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 виника-

ють 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 білків спостерігається також на етапі їх гідролізу і всмоктування амінокислот. Відомо, що дія ферментів, які гідролізують білки, є кооперативною. Це означає, що кожний фермент руйнує пептидні зв'язки між певними амінокислотами поліпептидного ланцюга білка. Так, у шлунку пепсин гідролізує пептидні зв'язки, утворені аміногрупами ароматичних амінокислот (фенілаланін, тирозин), а також лейцину й глютамінової 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 переважно гідролізує пептидні зв'язки, які утворені карбоксильними групами ароматичних амінокислот (тирозин, фенілаланін, триптофан) та аміногрупами інших амінокислот. У перетравлюванні білків у тонкому кишечнику важлива роль належить екзопептидазам (аміно- та карбоксипептидазам) і дипептидазам, які завершують гідролітичне розщеплення білків до амінокислот. Таким чином, білки розпадаються до амінокислот, які всмоктуються в кров.

Якщо дія пепсину гальмується (наприклад, при анацидному гастриті, коли зменшується рН), білки в шлунку не розщеплюються, а потрапляють у тонкий кишечник і там зазнають неповного гідролізу. Нерозщеплені фрагменти білкових молекул посилюють перистальтику кишечника й спричиняють пронос.

Порушення процесів ферментативного гідролізу білків і всмоктування амінокислот у травному каналі призводять до посиленого їх перетворення гнильними мікроорганізмами в товстому кишечнику. У процесі гниття білків 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 білком, 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 розладів шлунка неістотне. Біохімічні тести застосовують у тих випадках, коли секреція соляної 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 гіпергастроксинемії, 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 бікарбонатом сік з набором різних ферментів, які необхідні для нормального травлення: проферментів 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. Німецькі дослідники, зокрема професор Ганс Ульріх Клер, вважають, що головною причиною панкреатиту є жовчокам'яна хвороба. Холе-

стерол у жовчі накопичується, що призводить до преципітації його кристалів, захоплюванні їх глікопротеїнами слизової оболонки жовчного міхура. Сформовані глікокристали розміром 2 – 3 мм прямують у жовчний протік, але в разі його звуження та частого формування стенозу так само можливий розвиток екзогенної недостатності підшлункової залози. 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 білірубіну, глюкози в крові та активності α -амілази в сечі.

Додаткові дослідження: загальний білок та його фракції, подвійне навантаження глюкозою, С-реактивний білок, лужна фосфатаза, креатин сечі, електроліти К, Na, Ca, інсулін, глюкагон, секретин, активність ДНК-ази. Визначається також присутність білка та глюкози в сечі.

α -Амілаза секретується підшлунковою та слинними залозами, тому фермент складається з двох фракцій – панкреатичної та слинної. У сироватці крові вищою є активність слинного ізоферменту, 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 ізоферментів α -амілази (слинного та панкреатичного) є більш інформативним тестом, ніж визначення загальної активності α -амілази. Співвідношення активності слинного та панкреатичного ізоферментів 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 ферменту в декілька разів.

Панкреатична ліпаза секретується підшлунковою залозою і у великій кількості виявляється в дуоденальному вмісті. У сироватці крові активність ферменту низька. При гострому панкреатиті активність ліпази зростає в сотні разів і утримується на цьому рівні довше, ніж амілаза. У сечі активність ліпази відсутня.

Дуже важливим тестом для неінвазивної оцінки стану підшлункової залози є фекальний тест – визначення панкреатичної еластази. При панкреатитах її рівень зростає, а чутливість цього методу перевищує 90 %.

Порушення метаболічних процесів при хворобах 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 білків, амінокислот, ліпідів, вуглеводів, біологічно активних речовин (гормонів, біогенних амінів, вітамінів) та мікроелементів, регуляція водного обміну. Тут відбувається синтез ліпідів, фосфоліпідів, холестеро-

лу, вуглеводів (синтез глюкози, наприклад, – переважно в цьому органі) та білків. У печінці відбувається також катаболізм багатьох органічних речовин, енергія цього процесу запасується 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 % усього Ферума, який є в організмі), мікроелементи, вітаміни А, D, К, В₁₂ та фолієва кислота.

Екскреторна функція. Зовнішньосекреторна функція печінки зв'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. Вміст основних біоорганічних сполук наведено в табл. 5. Разом із жовчю з організму виводиться багато сполук, які утворюються в печінці або циркулюють в крові. Передусім це жовчні кислоти, а також холестерол, сечовина, сечова кислота, білки, ферменти, пігменти, муцин, мінеральні речовини, іони Na⁺, K⁺, Ca²⁺, Cl⁻, HCO₃⁻.

Таблиця 5. Вміст основних біоорганічних сполук у печінковій та міхуровій жовчі, г/л

Компоненти жовчі	Печінкова жовч	Міхурова жовч
Білки	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

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 поділяють на первинні та вторинні. *Первинні* – холева та хенодезоксихолева – утворюються в печінці, *вторинні* – дезоксихолева та літохолева – синтезуються в кишках за участю ферментів бактеріальної мікрофлори і є похідними від первинних жовчних кислот.

Утворення й виділення жовчі має життєво важливе значення для організму.

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 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**, -**COOH**, -**SH**, -**NH₂** та ін.;
2. Приєднання до цих груп глюкоуронової або сульфатної кислоти, гліцину, глутаміну або ацетильного залишку (кон'югація).

Реакції першої групи забезпечуються гідроксилазами (монооксигеназами) мікросом. З реакцій кон'югації переважає приєднання глюкоуронової кислоти. Процес каталізує *глюкуронілтрансфераза* – інтегральний білок ендоплазматичного ретикулуму; постачальником глюкуронату є УДФ-глюкуронат.

У реакціях кон'югації із 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 ферментів 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 ферментативних систем клітини: розпад за гліколітичним шляхом дає енергію, за пентозофосфатним шунтом – субстрати для анаболічних реакцій. За участю ферменту 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.

Визначення вмісту глюкози в крові не має великого значення для діагностики патології печінки, тому що цей орган має великі 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. Ці проби також недостатньо специфічні, але 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 зтяжнього вірусного гепатиту і цирозу. Визначення кількості лактату й пірувату має значення для оцінки гіпоксичного стану, який супроводжує захворювання печінки. Ці показники зростають при гіпоксії.

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, фосфоліпідів, які потрапляють у кров у формі ліпопротеїнів дуже низької густини (ЛПДНГ). У печінці може зберігатися тільки обмежена кількість жирів (менше 1 % маси органа), а їх надлишок виводиться в кров у складі ЛПДНГ. Швидкість секреції печінкою ЛПДНГ 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 кетонові тіла, які потім знов повертаються в кров. Кетонові 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 ЛПДНГ 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 густини (ЛПВГ) спостерігається при гострих гепатитах, цирозах печінки та застійних жовтяницях. В останньому випадку воно настільки рі-

зке, що може спричинити повне зникнення фракції ЛПВГ. Підвищення рівня ЛПВГ трапляється при хронічному гепатиті.

Збільшення рівнів ЛПДНГ та ЛПНГ характерне при інтрагепатальному застої жовчі, механічній жовтяниці, гострих гепатитах. Визначення ЛПДНГ та ЛПНГ (проба Бурштейна) має значення не лише при гіперліпідемічних станах, але і як функціональна печінкова проба. При зіставленні з тимоловою прободою цей показник особливо важливий, незважаючи на його неспецифічність. **Тимолова проба** (див. нижче про метаболізм білків) 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 прободою 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 білків

У клітинах печінки на відміну від інших органів є повний спектр ферментів — учасників амінокислотного обміну. Рівень амінокислот у плазмі крові регулюється печінкою. Надлишок амінокислот розщеплюється, аміак зв'язується в циклі сечовини, сечовина переноситься до нирок. Фермент 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 ферментів. Тільки γ -глобуліни продукуються не гепатоцитами, а системою макрофагів (клітини Купфера). Проте більшість γ -глобулінів утворюється в клітинах імунної системи. У печінці утворюються комплекси білків з ліпідами та вуглеводами. У ній також синтезується холін – структурний компонент фосфоліпідів, один з ланцюгів, який зв'язує обмін білків та ліпідів; завершується синтез креатину – амінокислоти, яка забезпечує енергією процес скорочення м'язів. Білки печінки ві-

дновлюються упродовж 7 діб, а у всьому організмі – 17 діб, що демонструє активність метаболізму в гепатоцитах.

При захворюваннях печінки констатують багато порушень у вмісті та складі білків сироватки крові. Визначення загального білка не дуже інформативне. Але цей показник потрібен для визначення кількісного складу білкових фракцій.

Розрізняють кілька видів протеїнограм, що характерні для різних печінкових захворювань.

1. **Протеїнограма притаманна гепатитам і наслідкам 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 притаманна цирозам печінки.** Відрізняється значним зниженням вмісту альбумінів, α_2 -глобулінів (через глибокі дистрофічні зміни гепатоцитів, які призводять до порушення біосинтезу білків цієї фракції) при значному підвищенні (компенсаторному) рівня γ -глобулінової фракції (за рахунок IgF та 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 використання 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-сульфатної 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 білірубину з глюкуроною кислотою є специфічними функціями печінки. Утворення білірубину 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 білірубину 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 білірубину здійснюється в клітинах печінки шляхом кон'югації з глюкуроною кислотою та утворенням **білірубінглюкуроніду**. У нормі вільний білірубін із печінкових капілярів легко проникає в гепатоцити, де за участі ферменту глюкуронілтрансферази при взаємодії з активованою глюкуроною кислотою (УДФГК) перетворюється на білірубінглюкуроніди. **Глюкуронід білірубину (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 білірубину). Загальний вміст білірубину коливається від 8,55 до 20 мкмоль/л; вміст «непрямого» білірубину сягає 17 мкмоль/л, «прямого» (білірубінглюкуроніду) – 2,5 мкмоль/л.

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» білірубіну на «прямий», що потрапляє в жовч. Як результат – «прямий» білірубін практично не визначається в межах чутливості методу, а вміст «непрямого» білірубіну 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» білірубіну з кровоносних капілярів до гепатоцитів;
- 2) порушенням утворення білірубінглюкуроніду з «вільного» білірубіну (порушення кон'югації внаслідок зниження активності глюкуронілтрансферази);
- 3) порушення екскреції «прямого» білірубіну (глюкуронідів білірубіну) 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 білірубіну в крові сягає **35 – 50 мкмоль/л і вище** (за різними джерелами). Якщо вміст білірубіну **перевищує 340 мкмоль/л**, надходження його до головного мозку може спричинити значне ураження (**білірубінову енцефалопатію**), що проявляється неадекватною поведінкою, поступовою втратою свідомості, явищами гострої інтоксикації. Це так звана **печінкова кома**.

Визначення концентрації жовчних пігментів у крові й сечі має важливе значення для диференційної діагностики жовтяниць різного походження (табл. 6). Розрізняють такі форми жовтяниць:

1. Гемолітична жовтяниця, або посилений розпад еритроцитів (гемоліз). При гемолізі утворюється й потрапляє до печінкових клітин багато «непрямого», вільного білірубіну, який не встигає повністю перетворитися на

«прямий» (глюкуроніди білірубін). Надлишок білірубін залишається в крові, гіпербілірубінемія розвивається за рахунок «непрямого» (вільного) білірубін. У сечі білірубін відсутній, але різко зростає уробілін. У калі зростає вміст стеркобіліну.

Таблиця 6. Клініко-біохімічна характеристика жовтяниць

Ознаки	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

2. Паренхіматозна (печінково-клітинна) жовтяниця розвивається при ушкодженні гепатоцитів (вірусна та інші форми гепатитів, цирози). При ушкодженні клітин печінки активність глюкуронілтрансферази знижена і «непрямий» білірубін не встигає повністю перетворитися на «прямий», тому що порушується кон'югація білірубін з глюкуроновою кислотою. Унаслідок підвищеної проникності плазматичних мембран у кров потрапляють «прямий» та «непрямий» білірубін, тому розвивається *змішана гіпербілірубінемія*. У сечі відзначається у великій кількості білірубін, уробілін у тяжких випадках відсутній. 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 білірубін. У тяжких випадках унаслідок переповнення гепатоцитів білірубіном, кон'югація його з глюкуроновою 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 білірубінату кальцію. 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-глутамілтрансферази (ГГТ).

У клінічній біохімії печінковий ізофермент ЛФ є показовим для діагностики холестазу. Це зв'язано з підвищеним синтезом ЛФ клітинами жовчних протоків і порушенням виділення ензиму в жовч. Особливо високою стає гіперферментемія 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. ГГТ має найвищу активність у клітинах, які формують жовчні протоки. Гіперферментемія є раннім надійним тестом інтрагепатитного стазу жовчі, ушкодження канікулярних мембран гепатоцитів навколо біліарного полюса та епітеліальних клітин, які покривають просвіти жовчних протоків.

Отже, ГГТ 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 ферментів може давати більшу інформацію про патологічний процес, ніж кон'югований білірубін, оскільки перший вказує на локалізацію ураження.

Ферменти печінки та їх роль у діагностиці захворювань

У цитоплазмі та органелах печінкових клітин знаходиться понад тисяча різних ферментів. 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)*, ізофермент *аспартатамінотрансферази (АсАТ)*, у рибосомах – *холінестераза (ХЕ)*. Визначення активності ферментів у сироватці (плазмі) крові набуває дедалі більшого значення при патології печінки ще й тому, що зміна їх активності, частіше у вигляді гіперферментемії, 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) ферментів із печінки в кров є ознакою цитолізу – руйнування клітин або порушення проникності їхніх мембран.

При гострих запальних процесах у печінці активність ферментів швидко зростає, а при переході в хронічну стадію підвищення дещо уповільнюється, однак до фізіологічних меж не повертається.

З гепатоспецифічних (органоспецифічних) ферментів для діагностики хвороб печінки в сироватці крові визначають активність *СДГ*, *аргінази*, *орнітинкарбамоїлтрансферази (ОКТ)*, *печінкового ізоферменту ЛДГ (ЛДГ₅)*.

До *відносно специфічних* для печінки ферментів відносять *глутаматдегідрогеназу (ГЛДГ)*, *малатдегідрогеназу (МДГ)*, *ізоцитратдегідрогеназу (ЩДГ)*, *лейцинамінопептидазу (ЛАП)*, *урокініназу* та ін. Окрім клітин печінки вони можуть локалізуватися в іншому органі.

У печінці знаходиться велика кількість *неспецифічних ферментів (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 ферментами чи іншими показниками,

при цьому треба 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 відносно специфічні, називають індикаторними.

Амінотрансферази взагалі 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 Рітиса, що показує співвідношення активності АсАТ до АлАТ (у нормі коефіцієнт Де Рітиса дорівнює 1,33). Зростання коефіцієнта свідчить про тяжкі ураження гепатоцитів, оскільки це є ознакою підвищення активності мітохондріальної фракції АсАТ.

Глутаматдегідрогеназа (ГЛДГ) локалізується звичайно в мітохондріях клітин печінки. Активність ферменту в сироватці крові незначна. Зростання активності ГЛДГ 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 ферментів діагностичне значення має не підвищення, а зниження активності цього ферменту. 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 гіперферментемії 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 спостері-

гатися при обширному некрозі печінки, оскільки відмерлі клітини не продукують ферментів.

Синдромна класифікація функціональних проб

1. **Індикатори цитолізу:** підвищення активності аланінамінотрансферази, аспартатамінотрансферази, γ -глутамілтранспептидази, глутаматдегідрогенази, сорбітолдегідрогенази, ізоферментів лактатдегідрогенази (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 (білок 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. 7.

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 відслідковувачих 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 білок 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.

Таблиця 7. Біохімічні констеляції в діагностиці захворювань шлунково-кишкового тракту й печінки

Вид патології	Біохімічний тест
Гострий панкреатит	Ліпаза та амілаза в крові та сечі (початок підвищення активності ферментів 3 – 6 год.; максимум активності 20 – 30 год., активність ліпази підвищується раніше від амілази) Глюкоза в крові (20 % випадків) Глюкоза в сечі Толерантність до глюкози Сечовина, креатинін у крові Кальцій, калій, натрій у крові Білок у сечі Білірубін у крові
Хронічний рецидивуючий панкреатит	Ліпаза та амілаза в крові й сечі Глюкоза в крові Білірубін у крові Нейтральний жир, м'язові волокна в калі Толерантність до глюкози (у 50 % випадків) Дуоденальний вміст: секреція бікарбонатів, ферментів

Вірусний гепатит	<p>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</p>
Цироз печінки	<p>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</p>
Механічна жовтяниця	<p>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</p>
Холецистит	<p>Печінкові проби в крові Білірубін у крові Білірубін у сечі Уробіліноген у сечі</p>
Хронічний персистуючий гепатит	<p>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</p>

Печінкова кома	Альбумін в крові γ-Глобуліни в крові Білірубін у крові Активність «печінкових» ферментів у крові Аміак у крові та сечі Білок у сечі Кристали тирозину та лейцину в сечі Аміноацидурия Холестерол у крові Калій, хлориди, кальцій у крові
-----------------------	---

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 **п р о г р а м у - м а к с и м у м**, що дозволяє як найповніше встановити функціональні порушення та резерви печінки. Біохімічні дослідження, виконані своєчасно (по можливості в початковий період жовтяниці), найбільш ефективні.

Залікові питання до теми

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. Основні метаболічні процеси обміну ліпідів, що відбуваються в гепатоцитах.
7. Біохімічні показники, які характеризують порушення обміну ліпідів при захворюваннях печінки.

8. Основні процеси обміну білків у печінці, синтез білків плазми крові.
9. Біохімічні показники, які відображають білковий обмін у печінці, протеїнограми, осадові проби. Значення цих показників у діагностиці захворювань печінки.
10. Ферменти, що є індикаторними для характеристики функціонального стану печінки. Роль визначення цих ферментів у діагностиці захворювань печінки.
11. Ферменти, що є специфічними для обміну клітин печінки.
12. Основні біохімічні показники, які необхідно досліджувати при запальних захворюваннях печінки.
13. Основні біохімічні показники, які треба досліджувати при порушеннях відтоку жовчі.
14. Види жовтяниць та їх диференційна діагностика.
15. Порушення процесу жовчоутворення і причини жовчокам'яної хвороби.
16. Синдромна класифікація функціональних проб та алгоритми досліджень захворювань печінки.

Лабораторні роботи

- № 8. Проби на колоїдну стійкість сироватки крові.
- № 9. Уніфікований метод визначення вмісту сечовини в сироватці крові за кольоровою реакцією з діацетилмонооксимом.
- № 10. Визначення активності α -амілази в сироватці крові та в сечі уніфікованим амілокласичним методом зі стійким крохмальним субстратом (методом Каравея).
- № 11. Визначення активності ліпази в сироватці крові уніфікованим методом з використанням маслинової олії як субстрату.
- № 12. Визначення вмісту білірубіну в сироватці крові за діазореакцією при наявності акселератора (метод Ієндрашика, Клеггорна та Грофа).

ТЕМА 5. БІОХІМІЧНІ ПОКАЗНИКИ ПРИ ЗАХВОРЮВАННЯХ НИРОК І СЕЧОВИДІЛЬНОЇ СИСТЕМИ

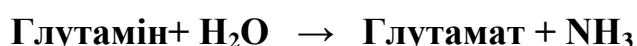
Структурно-функціональна характеристика нирок

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 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 кисень (до 10% усього кисню, 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 фосфорилування, 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 білків. Активні також процеси трансамінування й дезамінування, що супроводжуються утворенням амоніаку. Головним джерелом для його утворення є розщеплення глютаміну, який надходить у нирки з різних тканин.

глютаміназа



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 (NH_4Cl).

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 аланінамінопептидази (ААП). Для тканини нирок характерна ААП₃ ізоформа. ААП₃ розщеплює ди- і трипептиди, відщеплюючи N-кінцевий залишок. Поява в крові та сечі ізоферменту ААП₃ вказує на ушкодження тканини нирок. При гострих запальних процесах у нирках насамперед підвищується проникність мембран клубочків, що спричиняє появу в сечі білка, зокрема з'являються деякі ферменти або зростає вміст інших ферментів.

Нирки виконують такі функції:

- екскреторну;
- регулюють водно-сольовий баланс;
- регулюють кислотно-основну рівновагу;
- регулюють осмотичний тиск рідин організму;
- регулюють артеріальний тиск організму;
- стимулюють еритропоз.

В основі утворення сечі лежать три процеси: фільтрація, реабсорбція та секреція.

Клубочкова фільтрація води та низькомолекулярних компонентів плазми обумовлена різницею між гідростатичним тиском крові в капілярах клубочків, онкотичним тиском білків плазми 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 білків. 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. Білки 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 180л /добу. Однак при цьому за добу утворюється лише 1 – 2 л сечі (залежно від кількості вжитої рідини); основна кількість фільтрату реабсорбується в нефроні. За добу епітелій каналців зворотно всмоктує (**реабсорбує**) значну кількість речовин: 179 л 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 всмоктування 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, ферменти, вітаміни, гормони, пігменти (урохром, урохромоген, уроеритран, уробілін); амінокислоти (глутамінова, аспарагінова кислоти, глутамін, гістидин); кон'югати (гіпурова, фенацетурова, індоксилсульфатна кислоти, індикан); солі амонію, натрію, кальцію, магнію; неорганічні (хлороводнева, фосфатна, сульфатна) та органічні (щавлева, глюкуронова, янтарна) кислоти; солі органічних кислот (оксалати, урати); мікроелементи (Йод, Кобальт, Цинк, Ферум, Купрум), феноли та їх етери; нейтральна сірка та ін.

Таким чином, завдяки переміщенню крові через нирки відбувається очищення її від різних непотрібних і шкідливих речовин.

Для оцінки стану очищення організму від цих речовин існує показник клубочкової фільтрації, так званий *кліренс* (очищення).

Кліренс будь-якої речовини виражають кількістю мілілітрів 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:

$$C = K_c / K_{пл} \times V,$$

де C – кліренс; K_c – концентрація речовини в сечі, мг %; $K_{пл}$ – концентрація речовини в плазмі, мг%; V – кількість сечі, мл 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. Ряд різновидів гіпертонії пов'я-

заний з різними нирковими порушеннями. До виникнення цієї гіпертонії має відношення ренін, що синтезується ниркою. Під дією реніну утворюється ангіотензин. Ангіотензин діє безпосередньо на надниркові залози, стимулюючи виділення альдостерону, який викликає затримання в організмі іонів натрію.

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 еритропоєтин, який стимулює кістковомозковий еритропоез. Синтез еритропоєтину зумовлюється крововтратами, шоком, гіпоксією тощо.

Значення компонентів системи залишкового азоту для оцінки стану та функціонування нирок

Залишковий азот – небілковий азот, який залишається в центрифугаті сироватки крові (або в іншій біологічній рідині) після осадження білків дією трихлороцтової кислоти або інших осадників.

До складу залишкового азоту, вміст якого в нормі становить 0,20–0,40 г/л (14–28 ммоль/л), входять азот сечовини, амінокислот, креатину, креатиніну, сечової кислоти та інших продуктів білкового обміну.

До низькомолекулярних азотовмісних компонентів плазми відносять і азоту оксид (NO), який розглядається як **«ендомеліальний фактор релаксації»**.

Визначення компонентів залишкового азоту широко застосовується для діагностики патології сечовидільної системи, для оцінки характеру і ступеня вираженості азотемії.

У порівнянні з іншими фракціями залишкового азоту кількість сечовини при патологіях нирок зростає швидше і в більшій мірі, ніж зростання концентрації креатиніну.

Ниркова недостатність діагностується лише тоді, коли вміст сечовини в сироватці крові тривалий час стабільно перевищує верхні межі норми (8,3 ммоль/л).

При ураженні м'язів (міозити, міопатії, сколіоз) можливі низькі показники концентрації сечовини на фоні значно підвищеної концентрації креатиніну. Якщо показники вмісту сечовини й креатиніну нерівнозначні, необхідно визначати вміст 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 білків будь-яких тканин. При цьому вміст сечовини в сироватці крові не перевищує 8 – 10 ммоль/л, а збільшення її концентрації уповільнюється порівняно з іншими азотовмісними метаболітами (азотом амінокислот, аміаком, сечовою кислотою, креатином, креатиніном, пептидами).

Азотемії бувають *ниркові* та *позаниркові*. При ниркових азотеміях концентрація сечовини в сироватці крові більш підвищена (> 13–14 ммоль/л), її вміст прямо пропорційний ступеню патології.

Ниркова азотемія спостерігається при «шоковій», «токсичній», «гострій інфекційній» нирці, тромбоемболії судин нирок, ураженні їх капілярів (гострий гломерулонефрит, гострий пієлонефрит), обтурації сечових шляхів.

Хронічний пієлонефрит, хронічний гломерулонефрит, амілоїдоз нирок, нефроангіосклероз характеризуються повільним розвитком азотемій. Важливе значення в таких випадках має прогресуюча азотемія (підвищення вмісту сечовини в 5 – 10 разів).

Позаниркові азотемії розвиваються при декомпенсації серцево-судинної системи, зневодненні, блюванні, непрохідності, кровотечах, інфекційному гепатиті, діабеті, шоку, опіках. Але азотемія при цьому не перевищує 13 ммоль/л.

Характерною рисою ретенційної азотемії є різке підвищення рівня сечовини в складі залишкового азоту. У здорової людини 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. 8).

Таблиця 8. Біохімічні тести функцій нирок

№ п/п	Показники	Зміни концентрації (активності) показників при патології	
		у плазмі крові	у сечі
1.	Креатинін*	↑ патологія нирок, гостра та хронічна ниркова недостатність, обтурація сечових шляхів нижче рівня нирок, діабетичне ураження нирок; ↓ зменшення м'язової маси, вагітність (I і II триместри).	↑ ретенційна азотемія, недостатність функції нирок; ↓ дегенерація нирок, амілоїдоз нирок, міопатії, міозити, міоглобінурія, гіпертермія, кахексія, м'язові навантаження
2.	Сечовина**	↑ патологія нирок, гостра та хронічна ниркова недостатність, ниркова гіпертонія, обтурація сечових шляхів; ↓ вагітність (іноді), безбілкова дієта, парентеральне харчування, порушення всмоктування	↓ гостра та хронічна ниркова недостатність, уремія, нефрит у період новонародженості віці, вагітність
3.	Сечова кислота	↑ подагра, ниркова недостатність, полікістоз нирок, хронічна свинцева нефропатія; ↓ гепатоцеребральна дистрофія (хвороба Вільсона-Коновалова), деякі злоякісні новоутворення	↑ лейкоз, подагра, цистиноз, істинна поліцистемія; ↓ ксантинурія, дефіцит Фотієвої кислоти, свинцева інтоксикація
4.	Трансамінідаза	«+» ураження нирок (хронічний пієлонефрит, хронічний нефрит з гіпертензивним синдромом, нефротичний синдром)	-
5.	Аланінамінопептидаза (ААП₃)	«+» ураження ниркової тканини (гломерулонефрит, інфаркт нирки)	-
6.	Лактатдегідрогеназа (ЛДГ_{1,2})	↑ гостра ниркова недостатність	-
7.	Лужна фосфатаза	↑ хронічний гломерулонефрит і хронічний пієлонефрит	-
8.	γ-глутамілтрансфераза	↑ 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 рівень креатиніну в плазмі крові не впливає характер корму;
 - 3) підвищення рівня креатиніну спостерігається пізніше і стабільніше в порівнянні з рівнем сечовини;
 - 4) підвищення рівня піруват/креатинін спостерігається при порушенні функції нирок
- ** 1) рівень сечовини підвищується з віком та залежить від вмісту білка в кормі;
- 2) ниркова недостатність діагностується тоді, коли вміст сечовини перебуває тривалий час на стабільному рівні, який перевищує 8 ммоль/л;
- 3) при ураженнях м'язів (міозити, міопатії) може спостерігатися низька концентрація сечовини на фоні значного підвищення концентрації креатиніну.

Найбільш поширені захворювання нирок та 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 білок;

у сечі – ↑ білок.

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 білок.

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 азот, сечова кислота, глюкоза, ↓ Натрій, Хлор;

у сечі – ↓ сечова кислота.

Гостра ниркова недостатність – гостре порушення основних ниркових функцій (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 індикан (незначно);
у сечі – ↑ білок.

Хронічна ниркова недостатність – прогресуюче захворювання, яке обумовлене погіршенням функції клубочків та канальців 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 – ↑ білок.

Нефроз – захворювання нирок з дегенеративними змінами епітелію ниркових канальців та базальної мембрани капілярних петель клубочків і порушенням обмінних процесів – водно-сольового, білкового, холестеринового та ін.

Біохімічні зміни:

у сироватці – ↓ білок, альбуміни, α -глобуліни, ↑ γ -глобуліни, ліпіди; ↑ гіалуронідаза;
у сечі – ↑ білок.

Нефросклероз – патологічний процес у нирках, обумовлений склеротичними ураженнями ниркових артеріол, розростанням сполучної тканини, атрофією паренхіми.

Біохімічні зміни:

у сироватці – ↑ ренін, ангіотензин II, ↑ залишковий азот, хлориди;
у сечі – ↑ білок (незначно).

Амілоїдоз нирок – захворювання, при якому в усіх структурах нирок відбувається відкладення амілоїду (патологічного білка), що викликає порушення їх функцій та розвиток хронічної ниркової недостатності.

Біохімічні зміни:

у сироватці – ↓ білок, альбуміни; ↑ холестерол, β -ліпопротеїни, триацилгліцероли;

у сечі – ↑ білок, 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.

Патологічні компоненти сечі

До основних патологічних складових сечі належать білки, вуглеводи, кетонів тіла, жовчні та кров'яні пігменти.

Білки. Здорова тварина за добу виділяє із сечею до 30 мг білка, який звичайними лабораторними методами не виявляється. Як правило, із сечею виділяються низькомолекулярні білки плазми крові або інших тканин і органів. Підвищення вмісту білків у сечі дозволяє визначати їх звичайними лабораторними методами і свідчить про патологічний стан. При цьому вміст білка в сечі зростає переважно за рахунок білків 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 білків (білок Бенс-Джонса (парапротеїн «легких ланцюгів» – мієлома або макроглобулінемія), міоглобін, гемоглобін) у каналцях, що зумовлює вихід білків 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 білка в сечі).

Концентрація білка 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 ммоль/л (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 канальцях.

Розрізняють кілька видів глюкозурії:

- **фізіологічну** (при надходженні з їжею 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 -оксимасляна кислоти). 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 (рН < 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 (рН > 7,0) спостерігається:

- у травоядних тварин; метаболічному й респіраторному алкалозі (підвищенні кислотності шлункового соку, після сильного блювання, під час розсмоктування набряків);
- активних запальних процесів 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 з'являтися під впливом лікарських препаратів.

Кислотність сечі визначають за допомогою тест-смужок, наприклад, «рН-тест».

Показники глюкозурії, кетонурії, рН сечі легко визначають день у день, використовуючи тест-смужки «Глюкотест», «Ацетон-тест», «рН-тест».

Клініко-діагностична характеристика сечокам'яної хвороби

Сечокам'яна хвороба – захворювання нирок та сечовивідних шляхів, пов'язане з утворенням у нирковій паренхімі, місці, 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 паращитоподібних 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 реабсорбції 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 канальців, гліко- та мукопротеїни, які мають лужну реакцію, тому спричиняють розвиток уроциститу. Останні з'єднуються з кальцієм, утворюючи матрикс, на який потім осідають солі. Утворенню органічної основи ниркових 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. З добовою сечею людей виділяється близько 1,0 г захисних колоїдів. При патологічних процесах концентрація в сечі речовин, які виконують роль захисних колоїдів, зменшується, що є однією з причин кристалізації солей на органічній матриці. Останнім часом високосульфатовані ГАГ використовують як лікувальні засоби, що запобігають утворенню каменів у сечовивідних шляхах.

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 із 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/л, а при рН = 7,0 – 1600 мг/л. Уратні камені часто утворюються при лейкопенії та поліцитемії, коли різко зростає ендогенне утворення сечової кислоти в результаті розпаду нуклеопротеїнів.

Утворенню каменів з фосфатів кальцію, магнію і амонію (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). Таким чином, інфекція, як і при жовч нокам'яній хворобі, є одним із провідних місцевих факторів утворення сечових каменів.

Дуже важливо знати рН сечі: при уратах реакція – кисла, оксалатах – слабокисла, фосфатурії – лужна). Постійне визначення тих або інших кристалів у сечі говорить про можливий хімічний склад каменів.

Камені нирок викликають біль у попереку, періодичні болі мають характер нападів (ниркова коліка). Приєднання ускладнень (гострий та хронічний пієлонефрит, артеріальна гіпертензія, гостра та хронічна недостатність) викликають відповідні зміни клінічної картини захворювання. У більшості випадків спостерігається підвищене виведення із сечею амінокислот, незруйнованих еритроцитів.

Камені сечового міхура частіше виникають у самців, у молодому та старому віці. Болі в ділянці сечового міхура виражені в стані спокою, а в русі посилюються; приєднання інфекції викликає ускладнене сечовиведення.

При захворюваннях нирок і сечовивідних шляхів застосовують багато препаратів, які впливають на функцію цієї системи. Особливу увагу слід приділяти дії так званих нефротоксичних речовин, які позначаються на структурі й функції нирок (табл. 9).

Таблиця 9. Вплив ксенобіотиків на функцію нирок

Ксенобіотик	Дія (ефект)
Лікарські препарати	
Адіурекрин	Антидіуретична
Дезоксикортикостерону ацетат	Затримує рідину, Na^+ , Cl^- , 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 фільтрації
Кофеїн	Розширює судини нирок, посилює клубочкову фільтрацію, що призводить до помірного діуретичного ефекту
Карбамід (сечовина)	Знижує реабсорбцію води
Інтерферон	Призводить до протеїнурії, зрідка підвищує рівень сечовини та сечової кислоти в плазмі крові
Анальгетики (амідопірин, бутадіон, індометацин, саліцилати, фенацетин)	Нефротоксична
Антибактеріальні препарати (тетрацикліни, стрептоміцин, гентаміцин, бісептол, оксацилін, поліміксини, цефалоспорины, еритроміцин та ін.)	Нефротоксична
Амінокапронова кислота Декстрин Манніт Хінін Рентгеноконтрастні засоби	Нефротоксична

Токсичні речовини	
Важкі метали (Ферум, Аурум, Кадмій, Купрум, Арсен, Олово, Аргентум, Талій, Уран, Меркурій)	Викликають некроз ниркової тканини внаслідок денатурації білків базальної мембрани (наприклад «сулемова нирка»)
Алкоголь	У незначних дозах посилює клубочкову фільтрацію, стимулюючи сечовиділення, при хронічному отруєнні – переродження нирок
Побутова хімія (галогенопохідні інгібітори сполуки – дихлофос, хлорофос, інсектициди, ДДТ (дуст); органічні розчинники – бензол, вуглецю тетрахлорид, тетрафторетилен, етиленгліколь)	Які неконкурентні інгібітори інактивують ферментні системи нирок; нефротоксичність
Грибні отрути	Інактивують ферментну систему нирок, викликають гостру ниркову недостатність

Залікові питання до теми

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. Патологічні складові сечі.
11. Протеїнурія: визначення, форми, механізм виникнення.
12. Глюкозурія: визначення й форми.
13. Значення рН сечі.
14. Клініко-діагностична характеристика сечокам'яної хвороби.
15. Ксенобіотики, що впливають на ниркову функцію.

Лабораторні роботи

- № 13. Дослідження білка в сечі.
- № 9. Уніфікований метод визначення вмісту сечовини в сироватці крові

за кольоровою реакцією з діацетилмонооксимом.

№ 14. Визначення вмісту креатиніну.

№ 15. Визначення активності трансамідази в сироватці крові уніфікованим методом.

ЛАБОРАТОРНІ РОБОТИ

Лабораторна робота № 1

Визначення активності креатинкінази в сироватці крові уніфікованим методом з використанням креатину як субстрату

Принцип методу. Активність ферменту пропорційна кількості неорганічного фосфору, який утворюється в результаті кислотного гідролізу синтезованого ферментом креатинфосфату. Неорганічний фосфор визначають за кольоровою реакцією з амонію молібдатом.

Реактиви.

1. Динатрієва сіль аденозин-5-трифосфорної кислоти.
2. L-Цистеїн, 0,024 М розчин.
3. Креатин.
4. Магнію сульфат 7-водний, ч.д.а.
5. Амонію молібдат 4-водний, х. ч., розчин 0,02 моль/л.
6. Натрію сульфат безводний, ч.д.а.
7. Натрію метабісульфіт, ч.д.а.
8. 1-Аміно-2-нафтол-4-сульфо кислота (ейконоген), ч.д.а.
9. Сульфатна кислота, 2,5 моль/л розчин,
10. Хлороводнева кислота, розчин 0,1 моль/л.
11. Трис-(оксиметил)-амінометан (трис), ч.д.а.
12. Трис-буфер, розчин 0,133 моль/л (рН = 9,0).
13. Розчин ейконогену.
14. Основна суміш реактивів, що містить 0,02 моль/л магнію сульфату, 0,033 моль/л креатину і 0,0067 моль/л АТФ.
15. Трихлороцтова кислота, ч.д.а., розчин 49 моль/л.
16. Суміш розчинів для кислотного гідролізу креатин фосфату: 0,25 мл розчину амонію молібдату, 0,25 мл розчину сульфатної кислоти і 1,5 мл води (співвідношення 1 : 1 : 6).
17. Калію дигідрофосфат безводний, х.ч.

Матеріал для дослідження. Свіжа сироватка або плазма крові. При зберіганні в холодильнику або при кімнатній температурі активність ферменту знижується.

Хід визначення. Попередньо всі розчини реактивів прогривають протягом 5 хв. при 37 °С.

Дослідна проба: у пробірку вносять 1,5 мл основної суміші реактивів, 0,1 мл розчину цистеїну й 0,4 мл сироватки крові. Вміст пробірки обережно перемішують і ставлять у термостат при 37 °С на 30 хв. Потім додають 0,2 мл розчину ТХО к-ти, перемішують скляною паличкою і центрифугують при 3000 об/хв. протягом 10 хв.

Контрольну пробу виконують так само, як дослідну, але сироватку додають після доливання розчину ТХО к-ти. З дослідної та контрольної проб відбирають по 1 мл надосадової рідини й переносять у хімічні пробірки (відповідно марковані), в яких міститься по 2 мл 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 мл розчину ейконогену і точно через 15 хв. вимірюють екстинкцію дослідної проби, порівнюючи з контрольною, при $\lambda = 600 - 700$ нм (червоний світлофільтр) у кюветі з товщиною шару 0,5 см.

Розрахунок здійснюють за калібрувальним графіком.

Примітка. Якщо активність КК перевищує 500 нмоль/(с·л), то тривалість інкубації скорочують до 15 або 10 хв.; отримані значення активності помножують відповідно на 2 або 3. Розбавляти сироватку не рекомендується, оскільки активність ферменту при розведенні сироватки змінюється непропорційно.

Клініко-діагностична інтерпретація. **Гіперферментемію** відмічають при інфаркті міокарда, помірно – при м'язовій дистрофії, міозитах, гіпотиреозі. **Підвищують** активність КК амфотерицин В, карбеноксолон, карбомал, етанол, сумісне введення галотану й сукцинілхоліну під час наркозу, барбітурати, аденілатциклаза. **Гіпоферментемію** характерна для тиреотоксикозу, вираженій атрофії м'язів. Знижують активність ензиму забруднення окиснювачами, ультрафіолетове опромінення.

Інформативним є визначення ізоферментного спектра: МВ, ММ, ВВ. МВ-фракція з'являється при інфаркті міокарда, збільшення ММ-фракції спостерігають при захворюваннях м'язів, а ВВ – при захворюваннях ЦНС.

Нормальні значення. До 1000 нмоль/(с·л), або до 6 МО.

Лабораторна робота № 2

Визначення активності лактатдегідрогенази в сироватці крові

А. Уніфікований метод визначення за реакцією з 2,4-динітрофенілгідразином (метод Севела-Товарека)

Принцип методу. L-Лактат під дією ферменту сироватки при наявності НАД⁺ окиснюється на піруват, який визначають за кольоровою реакцією з 2,4-динітрофенілгідразином.

Реактиви.

1. Молочна кислота, ч.д.а. або х.ч., 80 % розчин.
2. Натрію гідроксид, ч.д.а. або х.ч., розчин 4 моль/л.
3. Натрію лактат, розчин 0,45 моль/л.
4. Натрію пірофосфат $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$, ч.д.а.
5. Хлороводнева кислота, розчин 1 моль/л.
6. Натрію пірофосфат, розчин 0,03 моль/л (рН = 8,8).
7. НАД, окиснена форма.
8. Розчин 2,4-динітрофенілгідразину.
9. Натрію піруват (для побудови калібрувальної кривої).

Хід визначення.

Дослідна проба: 0,1 мл сироватки, розведеної в співвідношенні 1 : 2, змішують з 0,3 мл розчину НАД, прогрівають протягом 5 хв. при 37 °С. Потім додають 0,8 мл розчину натрію пірофосфату 0,03 моль/л та 0,2 мл розчину натрію лактату 0,45 моль/л, попередньо прогрітих при 37 °С, і інкубують суміш при 37 °С протягом 15 хв. Відразу після інкубації додають 0,5 мл розчину 2,4-динітрофенілгідразину, витримують 20 хв. при кімнатній температурі. Потім добавляють 5 мл розчину натрію гідроксиду 0,4 моль/л, перемішують і через 10 хв. вимірюють екстинкцію на ФЕК в кюветі з товщиною шару 1 см при $\lambda = 500 - 560$ нм (зелений світлофільтр), порівнюючи з контрольною пробєю.

Контрольну пробу виконують так само, як дослідну, але сироватку додають після інкубації.

Розрахунок активності здійснюють за калібрувальним графіком.

Нормальні значення. 220–1100 нмоль/(с·л), або 0,8– 4,0 мкмоль/(год·мл) при 37 °С.

Б. Електрофоретичне розділення ізоферментів ЛДГ на плівках з ацетату целюлози

Принцип методу. Ізоферменти ЛДГ розділяють електрофорезом на плівці з ацетату целюлози при рН = 8,6. Потім плівку інкубують на шарі гелю, що містить субстратну суміш; місця розміщення смуг ізоферментів забарвлюються в синій колір формазаном.

Оптимум рН інкубаційного середовища знаходиться в межах 8,0 – 8,3. Реакція прискорюється за наявності феназину метасульфату.

Реактиви.

1. Буфер для електрофорезу.
2. Буфер для приготування агару.
3. Буфер для розчинення субстратної суміші (рН = 8,3).
4. Агар Дифко.
5. Літію лактат, ч.д.а. або х.ч.
6. Тетразолевий п-нітросиній (нітросиній тетразолій – НСТ), ч.д.а.
7. Метилфеназоній метасульфат (феназину метасульфат – ФМС), ч.д.а.
8. Нікотинамідаденіндинуклеотид окиснений (НАД).
9. Оцтова кислота, 5 % розчин.

Матеріал для дослідження. Сироватка крові, вільна від гемолізу.

Хід визначення. Приготування агару: 1 г агару Дифко розчиняють при нагріванні в 50 мл буфера № 2, потім охолоджують до 65 – 70 °С. Субстратну суміш 264 мг літію лактату, 4 мг НСТ, 20 мг НАД і 0,4 мг ФМС (4 мг ФМС розчиняють в 1 мл субстратного буфера та беруть 0,4 мл) розчиняють при помішуванні в 10 мл субстратного буфера (*захистити від світла!*); 10 мл охолодженого до 65 °С розчину агару обережно змішують з приготовленою субстратною сумішшю, уникаючи утворення бульбашок. Отриманий гель наливають рівним шаром завтовшки близько 2 мм на скло чи в будь-який підходящий посуд. Гель поміщають у темне місце при кімнатній температурі і накривають кришкою; стежать за тим, щоб краплі вологи не осіли на його поверхні.

Проведення електрофорезу. У камеру приладу для електрофорезу заливають близько 90 мл охолодженого до 4 °С буфера. З попередньо замоченої в цьому буфері ацетатцелюлозної плівки фільтрувальним папером видаляють надлишок вологи й закріплюють плівку в призначеній для цього рамі (див. інструкцію до апарата ЕПАУ-20-50). На поверхню плівки за допомогою аплікатора (дві аплікації) наносять зразки сироватки в кількості близько 15 мкл. Раму з плівкою поміщають у камеру, закривають камеру кришкою і вмикають струм.

Електрофорез триває 25 хв. при напрузі 150 В (сила струму 3 – 5 мА). Вимикають струм, знімають плівку з рами і поміщають (попередньо обрізавши вологі кінці плівки) на шар гелю. До гелю має прилягати поверхня плівки, на яку нанесені зразки. Слід уникати утворення повітряних бульбашок. Гель з плівкою поміщають у термостат на 30 хв. при температурі 37 °С Після забарвлення плівку відмивають у 5 % розчині оцтової кислоти приблизно 3 хв. і висушують між аркушами фільтрувального паперу в термостаті або при кімнатній температурі. Плівка має бути розправлена. Денситометрують при $\lambda = 575\text{-}600$ нм.

Клініко-біохімічна інтерпретація. 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.

Гіпоферментемію викликають оксалати і сечовина (сечовинолабільні ізоферменти).

Нормальні значення. Співвідношення фракцій ЛДГ за даними різних авторів становлять: ЛДГ₁ – 19...29 %; ЛДГ₂ – 23...37 %; ЛДГ₃ – 17...25 %; ЛДГ₄ – 8...17 %; ЛДГ₅ – 8...18 %.

Лабораторна робота № 3

Визначення рівня β - і пре- β -ліпопротеїдів у сироватці крові експрес-методом

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

Реактиви.

1. Розчин кальцію хлориду 25 ммоль/л.
2. Розчин гепарину (1 мл має містити 1000 МО).

Матеріал для дослідження. Свіжа сироватка або плазма крові.

Хід визначення. У пробірку, в якій міститься 2,0 мл розчину кальцію хлориду 25 ммоль/л, додають 0,2 мл 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 мл 1 % розчину гепарину, ретельно перемішують і точно через 4 хв. (за секундоміром) вимірюють екстинкцію. Різниця між значеннями екстинкцій ($E_2 - E_1$) відповідає екстинкції, зумовленій вмістом β - і пре- β -ліпопротеїдів.

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

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

Примітки.

1. Кров у пацієнта досліджують після 12-годинного голодування.
2. Сироватку потрібно досліджувати негайно після взяття.
3. На результати аналізу впливає якість гепарину.

Нормальні значення. 35 – 55 од.

Лабораторна робота № 4

Визначення вмісту холестеролу

А. Визначення кількості холестеролу в ЛПВГ (α -ЛП)

Принцип методу. ЛПВГ залишаються розчиненими в плазмі крові (сироватці) після того, як β -ЛП і пре- β -ЛП преципітовані гепарином за наявності іонів мангану. У супернатанті визначають вміст холестеролу.

Реактиви.

1. Мангану хлорид, розчин 2 моль/л.
2. Розчин гепарину, що містить 5000 од в 1 мл.
3. Ізопропіловий спирт.
3. Стандартний розчин холестеролу: 50 мг на 100 мл ізопропілового спирту, або 1,3 ммоль/л.

Хід визначення. До 1 мл сироватки або плазми крові у центрифужній пробірці, що знаходиться в штативі із льодом, приливають 40 мкл розчину гепарину, перемішують на змішувачі, додають 50 мкл 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 обчислюють за формулою:

$$C = E_d/E_{ct} \cdot C_{ct},$$

де E_d , E_{ct} – екстинкції відповідно дослідної та стандартної проб; C_{ct} – концентрація стандартного розчину, ммоль/л.

Зважаючи на розведення сироватки, отриманий результат множать на 1,09.

Примітки:

1. Верхній шар сироватки, що містить ЛПВГ, слід відсмоктати одразу після центрифугування, оскільки при нагріванні ЛПВГ теж починають преципітуватися.

2. Якщо сироватка каламутна, зверху може утворитися шар хіломікронів, з-під якого важко взяти 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.

Нормальні значення. 0,9 – 1,9 ммоль/л, або 35 – 75 мг на 100 мл.

Б. Визначення загального холестеролу в сироватці крові прямим методом, що ґрунтується на реакції Лібермана-Бурхарда (метод Ілька)

Принцип методу. Холестерол при наявності оцтової і сульфатної кислот та оцтового ангідриду утворює забарвлені в зелений колір продукти.

Реактиви.

1. Реактив № 1: зміщують 1 частину льодяної оцтової кислоти, 5 частин оцтового ангідриду, 1 частину концентрованої сульфатної кислоти. Суміш повинна бути безбарвною або ледь жовтуватою.

2. Стандартний розчин холестеролу концентрацією 180 мг %.

Матеріал для дослідження. Свіжа сироватка або плазма крові.

Хід визначення. До 2,1 мл реактиву додають 0,1 мл сироватки. Пробірку струшують і поміщають на 20 хв. у термостат при температурі 37 °С. Вимірюють екстинкцію на ФЕК при $\lambda = 630 - 690$ нм (червоний світлофільтр) у кюветі з товщиною шару 0,5 см, порівнюючи зі стандартним розчином.

Робочі стандартні розчини холестеролу обробляють так само, як і дослідні проби.

Розрахунок здійснюють за калібрувальним графіком.

Норма, ммоль/л: велика рогата худоба – 2,07-3,11; вівці – 1,35-1,97; кози – 2,07-3,37; свині – 0,93-1,40; коні – 1,94-3,89; собаки – 3,50-6,99.

Клініко-діагностична інтерпретація. Дослідження холестеролу використовується в комплексі з іншими тестами для визначення характеру гіперліпопротеїдемій. **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, хлор тетрациклін, колхіцин, галоперидол, канаміцин, інгібітори MAO, неоміцин.

Лабораторна робота № 5

Методи визначення міоглобіну

А. Метод висолювання (проба Блонгейма)

Принцип методу ґрунтується на різній розчинності Mb і Hb у концентрованих розчинах амонію сульфату. Hb висолюється при нижчих концентраціях, ніж Mb.

Реактиви: амонію сульфат $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

Хід визначення. Для одержання 80 % розчину $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ до 5 мл добре відфільтрованої або відцентрифугованої сечі додають 2,8 г амонію сульфату. Сечу ретельно перемішують, після чого центрифугують. Надосадова рідина або фільтрат при наявності Mb в сечі будуть забарвлені у світло-коричневий або буро-червоний колір (залежно від концентрації Mb). Реакція вважається позитивною, якщо надосадова рідина або фільтрат безбарвні, це означає, що Mb у розчині немає. При наявності Hb осад набуває коричневого кольору, а надосадова рідина безбарвна. Метод є орієнтовним.

Нормальні значення. Мінімальні концентрації Mb, виявлені цим методом, становлять 30 – 40 мг%.

Б. Ідентифікація Mb методом електрофорезу

1. Ідентифікація Mb у сечі

Принцип методу ґрунтується на різній рухливості Mb і Hb в електрофоретичному полі. Mb переміщується від старту на половину або 2/3 тієї відстані, на яку переміщується Hb.

Реактиви.

1. Мединал-вероналовий буфер (рН = 8,6); іонна сила – 0,1 або 0,05.
2. Амідочорний 10-В (барвник).
3. Бензидиновий барвник.
4. Відмиваючий розчин.
5. Папір для електрофорезу – ватман 3 або ацетатцелюлозна плівка.

Режим роботи: мединал-вероналовий буфер (рН = 8,6) з іонною силою 0,05; напруга 150 – 250 В, сила струму 0,15 – 0,5 мА на 1 см поперечного перерізу паперу, тривалість 8 год.

Хід визначення. На аркуш ватману розміром 17 x 40 см зі стартовою лінією на відстані 16 см від поперечного краю паперу наносять проби сечі й стандартних розчинів Мв та Нв. Усі дослідження дублюються. Залежно від мети дослідження на стартовій лінії попередньо роблять 6 або 8 поділок, які відповідають місцям нанесення проб: завширшки 1 см (8 поділок) або 1,5 см (6 поділок). Сечу перед дослідженням бажано відцентрифугувати. Якщо концентрація невисока, сеча має звичайне забарвлення, але з бензидиновим реактивом дає різко позитивну реакцію, її необхідно концентрувати після попереднього діалізу.

На кінець шліфувального скла послідовно наносять 0,02 мл сечі; контрольні розчини Мв і Нв обережно переносять на папір (його попередньо змочують буферним розчином, надлишок буфера видаляють фільтрувальним папером). Контрольні розчини Мв, Нв і сечу наносять на папір, також у певній послідовності: Нв, Мв, сеча. Дослідження дублюють на цьому ж аркуші (залежно від мети роботи два або три рази). Після електрофорезу фореграми знімають і переносять у сушильну шафу на 10 хв. при 120 °С або на 30 хв. при 90 °С. Вишуну фореграму розрізають на три частини, одну з яких забарвлюють амідочорним, другу – бензидином, а третю зберігають для архіву, оскільки забарвлення бензидином нестійке і зникає через 10 – 15 хв.

Фореграму опускають у лоток з розчином бензидину і через кілька секунд при наявності в досліджуваному матеріалі Мв або Нв на фореграмі з'являється яскраво-блакитна смуга, що відповідає рухливості контрольних розчинів Мв або Нв.

За характером рухливості невідомого пігменту відносно контрольних розчинів Мв чи Нв дають відповідь.

Якщо немає необхідності виявляти інші фракції білка в сечі, забарвлення можна проводити одним лише бензидиновим розчином. При забарвленні фореграм амідочорним розчин барвника виливають у широкий лоток з кришкою.

Фореграми опускають швидким рухом. Забарвлення продовжують 30 хв. і відмивають протягом 2 год., послідовно переносячи фореграми з одного розчину в інший 6 – 8 разів. Висушують на повітрі.

Нормальні значення. Мінімальні концентрації, що визначаються цим методом, 6 – 10 мг %.

2. Ідентифікація Мв у сироватці крові

Принцип методу. Мв на відміну від Нв не сполучається з гаптоглобіном (білком, що входить до α_2 -фракції глобулінів сироватки) і переміщується від стартової лінії на значно меншу відстань, ніж фракції вільного і зв'язаного Нв. Мв розміщується між β і γ -фракціями глобулінів.

Режим роботи: веронал-мединаловий буфер (рН = 8,6) з іонною силою 0,1; напруга 120 В, сила струму 8 – 10 мА, тривалість 18 – 20 год.

Хід визначення. На аркушу ватману розміром 17 x 40 см наносять у певній послідовності контрольні розчини Мв, Нв та сироватку в кількості 0,01 мл. Дослідження дублюють. Одночасно можна досліджувати сечу. Фореграму висушують і забарвлюють амідочорним 10-В і бензидиновим реактивом, як описано вище. При дослідженні білків сироватки методом електрофорезу на фореграмі є 5 фракцій (альбуміни, α_1 -, α_2 - β - та γ -глобуліни).

Якщо концентрація Мв у плазмі крові перевищує 30 – 40 мг%, то на електрофорезі, забарвленій амідочорним, з'являється додаткова фракція (Мв) між β - й γ -глобулінами; якщо нижча за 30 мг %, то цю фракцію можна виявити тільки при забарвленні бензидином.

За наявності в сироватці парапротеїнів між β - і γ -глобулінами можуть з'явитися інші фракції білків, тому забарвлення бензидином є обов'язковим для виявлення Мв. На фореграмі, забарвленій бензидином, майже завжди з'являються фракції гемальбумінів (на рівні альбумінів), фракції зв'язаного Нв (на рівні α_2 -глобулінів) та вільного Нв (на рівні β -глобулінів).

У рідкісних випадках за наявності значної кількості Мв у сироватці при забарвленні бензидином фракції Мв та вільного Нв можуть зливатися, але забарвлюються вони окремо.

Методом електрофорезу можна виявити концентрації Мв у сироватці в межах 3 – 6 мг %, але тільки при забарвленні фореграм бензидином.

Діагностична цінність визначення Мв зросла з появою радіо-імуного методу.

Нормальні значення. Вміст Мв в сироватці крові: 49 ± 17 мкг/л у самців і 35 ± 1) мкг/л у самок.

Лабораторна робота № 6

Визначення вмісту загального білка в сироватці (плазмі) крові біуретовим (уніфікованим) методом

Принцип методу. Білки сироватки (плазми) крові, реагуючи в лужному середовищі з купруму сульфатом, утворюють сполуки, забарвлені у фіолетовий колір.

Реактиви.

1. Натрію хлорид, ч.д.а. або х.ч., ізотонічний розчин 154 ммоль/л.
2. Натрію гідроксид, ч.д.а. або х.ч., 0,2 ммоль/л.
3. Калію йодид, ч.д. а. або х.ч., розчин калію йодиду 30 ммоль/л в розчині натрію гідроксиду.
4. Калію-натрію тартрат 4-водний (сегнетова сіль), ч.д.а.
5. Купруму сульфат 5-водний, ч.д.а. або х.ч.
6. Біуретовий реактив: 4,5 г сегнетової солі розчиняють у 40 мл розчину натрію гідроксиду 0,2 моль/л, додають 1,5 г купруму сульфату та 0,5 г калію йодиду і розчиняють. Доливають до 100 мл розчин натрію гідроксиду 0,2 моль/л. Реактив стабільний при зберіганні його в посуді з темного скла.
7. Робочий розчин біуретового реактиву: 20 мл біуретового реактиву змішують з 80 мл 0,5 % розчину калію йодиду. Розчин стабільний.
7. Калібрувальний розчин альбуміну (із сироватки крові людини): 100 г/л розчин альбуміну в розчині натрію хлориду 154 ммоль/л.

Матеріал для дослідження. Сироватка крові.

Хід визначення. Дослідна проба: до 0,1 мл сироватки додають 5 мл 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 пробюю.

Контрольна проба. До 5 мл робочого біуретового реактиву доливають 0,1 мл розчину натрію хлориду 154 ммоль/л, далі обробляють як дослідну пробу.

Через 30 – 60 хв вимірюють екстинкцію на фотометрі, як у досліді, порівняно з контрольною пробюю. За одержаними даними визначають вміст білка за калібрувальним графіком.

Примітка. Вміст загального білка підвищений при венозному стазі, знижений у самок у період лактації і в останні місяці вагітності, під час внутрішньовенних вливань.

Клініко-діагностична інтерпретація: Серед патологічних змін вмісту загального білка сироватки крові можуть зустрічатись: **гіпопротеїнемія** – зниження концентрації загального білка і **гіперпротеїнемія** – підвищення концентрації загального білка. **Гіпопротеїнемія** спостерігається при нефротичному синдромі, ентериті, хронічному панкреатиті, екземах, масивних крововтратах, при затримці води в результаті серцевої декомпенсації, значних втратах білка з сечею при нефритах, тривалому перебігу запальних захворювань та кахексії. 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, бутамід, імізін, інсулін, кортикотропін, кортикостероїди, прогестерон, рентгеноконтрастні препарати, левоміцетин, стрептоміцину сульфат, сульфаніламід, тетрациклін, фенотіазини, місклерон, бромсульфалеїн.

В патології білків плазми крові прийнято розрізняти такі стани: **диспротеїнемію, дефектопротеїнемію та парапротеїнемію.**

Нормальні значення, г/л: велика рогата худоба – 72-86; вівці – 65-75; свині – 70-85; коні – 60-80; кури – 43-60. Плазма крові містить на 2 – 4 г/л білка більше за рахунок фібриногену, якого немає в сироватці. Кількість білка у новонароджених нижча, ніж у дорослих: новонароджені 46 – 70 г/л.

Лабораторна робота № 7

Визначення вмісту сіалових кислот в 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 міді дає з нейроаміновою кислотою синє забарвлення.

Хід визначення. До 0,1 мл плазми (сироватки) крові приливають 1,0 мл 5 %-го розчину три хлороцтової кислоти, поміщають на 7 хв. на киплячу водяну баню для гідролізу, потім охолоджують і фільтрують через паперовий фільтр. До 0,5 мл прозорого фільтрату додають 0,5 мл води і 1 мл резорцинового реактиву, закривають пробками і розміщують на водяну баню ще на 15 хв. Після цього охолоджують, додають 3 мл екстрагуючого реактиву (2,5 мл бутилацетату і 0,5 мл бутанолу), струшують та залишають на 15 хв. для розшару-

вання 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.

Нормальні величини. В нормі вміст сіалових кислот складає 2,0 – 2,33 ммоль/л, або 130 – 200 умовних одиниць.

Клініко-діагностичне значення. Вміст сіалових кислот зростає при різноманітних запальних процесах, а також при пухлинах, інфаркті міокарда, при ураженні легень.

Лабораторна робота № 8

Проби на колоїдну стійкість сироватки крові

А. Тимолова проба

Принцип методу. Під час взаємодії сироватки з тимолово-вероналовим буфером з'являється каламуть унаслідок утворення глобулін-тимол-ліпідного комплексу.

Реактиви.

1. Тимоловий реагент: $(7,89 \pm 0,5)$ % тимол; $(55,05 \pm 2,5)$ % етиловий спирт; $(1,43 \pm 0,1)$ % малеїнова кислота; $(4,05 \pm 0,2)$ % трис (основа).
2. Розчин барію хлориду (48 ± 2) ммоль/л.
3. Розчин сульфатної кислоти $(2,5 \pm 0,1)$ моль/л.

Хід визначення. У пробірку вносять піпеткою 1,2 мл (4,8 мл для макрометоду) тимолового реактиву, додають 0.02 мл (0,08 мл для макрометоду) сироватки крові, перемішують, витримують 30 хв. Фотометрують при λ 630 – 690 нм, проти тимолового реактиву. Ступінь помутніння знаходять за калібрувальною кривою.

Примітка. Хімічну суть тимолової проби до кінця не з'ясовано. На думку багатьох авторів, проба стає позитивною при збільшенні кількості β - і γ -глобулінів, а також зв'язаних з β -глобулінами ліпопротеїдів у сироватці крові.

Клініко-діагностична інтерпретація. Тимолова проба в нормі становить 0 – 4 од. ШН. Вона *позитивна* при паренхіматозному гепатиті, тоді як у хворих на механічну жовтяницю – *негативна* (однак стає позитивною, якщо процес ускладнюється паренхіматозним гепатитом). Збільшується тимолова проба при цирозі печінки.

Підвищують результати досліджень: анаболічні стероїди, андрогени, бутадіон, гепарин, дифенін, індометацин, інсулін, інгібітори MAO, клофібрат, ко-

ртикотропін, кортикостероїди, лінкоміцину гідрохлорид, левоміцетин, меркаптопурин, метилурацил, метилдофа, новокаїнамід, олеандоміцину фосфат, прогестерон, сульфаніламід, тетрациклін, фенотіазини, хлорпропамід, еритроміцин, естрогени.

Б. Стрічка Вельмана

Принцип методу. Реакція базується на флокуляції білків у сироватці, яку нагрівають до однократного закипання після додавання її до розчину певної (що залежить від колоїдної стабільності системи) кількості кальцію хлориду.

Реактив. Розчин кальцію хлориду 5 г/л.

Хід визначення. До 4,9 мл дистильованої води додають 0,1 мл сироватки, вміст пробірки перемішують шляхом її перевертання (при цьому пробірку можна закрити великим пальцем) і потім приливають 0,1 мл розчину кальцію хлориду (з піпетки на 0,1 мл або крапельниці, якщо об'єм кожної краплі дорівнює 0,05 мл).

Вміст пробірки струшують і нагрівають над полум'ям спиртівки до однократного закипання суміші. Потім пробірку охолоджують і дивляться крізь неї на світло.

Якщо пластівці в пробірці не з'являються, то в неї додають ще 0,1 мл розчину кальцію хлориду і розчин знов нагрівають до кипіння. Процедуру повторюють до випадання пластівчастого осаду.

При використанні сироватки крові практично здорових тварин на таке додавання витрачається **0,4 – 0,5 мл розчину кальцію хлориду** (це показник норми).

Примітка. Сироватка крові для дослідження має бути свіжою (зберігатися не більше однієї доби від моменту взяття), без слідів гемолізу.

Нормальні значення. 0,4 – 0,5 мл.

Лабораторна робота № 9

Уніфікований метод визначення 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 сполучку. Інтенсивність забарвлення пропорційна концентрації сечовини.

Реактиви.

1. Трихлороцтова кислота (ТХО к-та) концентрацією 100 г/л.
2. Діацетилмонооксим, 25 г/л, водний розчин.
3. Тіосемікарбазид, 2,5 г/л, водний розчин.
4. Сульфатна кислота концентрована.
5. Ортофосфатна кислота, 85 % розчин.
6. Феруму (III) хлорид.
7. Бензойна кислота концентрацією 2 г/л.
8. Стандартний (калібрувальний, еталонний) розчин сечовини концентрацією 7 ммоль/л.
9. Кольоровий реактив: до 30 мл робочого розчину феруму (III) хлориду додають 20 мл води, 1 мл розчину (25 г/л) діацетилмонооксиму і 0,25 мл розчину (2,5 г/л) 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 визначення (за таблицею).

Пробірки кип'ятять на водяній бані протягом 20 хв., потім охолоджують 2 – 3 хв. під проточною водою. Вимірюють екстинкцію при довжині хвилі 530 – 560 нм (зелений світлофільтр) порівняно з контрольною пробою в кюветі з товщиною шару 1 см. Розрахунок концентрації сечовини:

$$C_k = D_d / D_{пл} \cdot 7, \text{ (ммоль/л);}$$

$$C_c = D_d / D_{пл} \cdot 7 \cdot a \cdot p,$$

де C_k – концентрація сечовини в крові, ммоль/л; C_c – концентрація сечовини в сечі, ммоль/добу; D_d – інтенсивність поглинання дослідних проб; $D_{ст}$ – інтенсивність поглинання стандартної проби; 7 ммоль/л – концентрація сечовини в стандартному розчині; a – діурез (добова кількість сечі), л; p – розведення сечі (50 або 100).

Примітки:

1. Враховуючи нестабільність забарвлення розчину, вимірювання виконують не пізніше як через 15 хв. після охолодження, тому кип'ятять одночасно не більше 20 проб.
2. З кожною серією дослідних проб паралельно обробляють стандартну пробу, оскільки забарвлення залежить від умов нагрівання.

3. При концентрації сечовини в крові понад 17 ммоль/л сироватку або кров розбавляють ізотонічним розчином натрію хлориду, а результат множать на коефіцієнт розведення.

4. Для перерахунку показників сечовини на вміст азоту в сечовині результати слід помножити на фактор (коефіцієнт) 0,466 або розділити на 2,14.

Клініко-діагностична інтерпретація. Підвищується концентрація сечовини в сироватці крові при гломерулонефриті, гломерулосклерозі, хронічному порушенні функції нирок, хронічній непрохідності сечових шляхів, при посиленому розпаді білків (злаякісні 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 білка 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 меркурію і стибію, тетрацикліни, триамтерен, фурадонін, нітрофурантоїн, фурсемід, лазикс, цепорин. Хімічну інтерференцію дають хлоралгідрат, хлорамфенікол, солі амонію, хлоробутанол, гуанетидин.

Знижують вміст СТГ, глюкоза, похідні тіазиду.

Нормальні значення, ммоль/л: велика рогата худоба – 7,14-10,7; вівці – 2,86-7,14; кози – 3,57-7,14; свині – 3,57-10,7; коні – 3,57-8,57; собаки – 1,67-3,33.

Лабораторна робота № 10

Визначення активності α -амілази в сироватці крові та в сечі уніфікованим амілокластичним методом зі стійким крохмальним субстратом (методом 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.

1. Бензойна кислота, ч.д.а. або х.ч,
2. Натрію гідрофосфат безводний Na_2HPO_4 , ч.д.а.
3. Крохмаль розчинний для нефелометрії, або крохмаль за Лінтнером.

4. Натрію хлорид, розчин 154 ммоль/л.
5. Субстратно-буферний розчин (рН = 7,0).
6. Калію йодид, ч.д.а. або х.ч.
7. Калію йодат, ч.д.а. або х.ч.
8. Калію фторид, ч.д.а.
9. Хлороводнева кислота концентрована, х. ч.
10. 0,01 н розчин йоду.

Матеріал для дослідження. Свіжа сироватка або плазма крові, сеча або дуоденальний вміст, попередньо розбавлений розчином натрію хлориду 154 ммоль/л в 100 разів.

Хід визначення. Мікроваріант

Дослідна проба: 0,5 мл субстратно-буферного розчину наливають у пробірку, нагрівають протягом 5 хв. при 37 °С, додають 0,01 мл 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 мл 0,1 н розчину йоду і доводять об'єм водою до 5 мл. Вимірюють екстинкцію на ФЕК в кюветі з товщиною шару 1 см при $\lambda = 630 - 690$ нм (червоний світлофільтр), порівнюючи з водою.

Контрольну пробу роблять 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 мікроваріанті, 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 л біологічної рідини за 1 с інкубації при 37 °С, і розраховують за формулою:

$$a = \frac{E_1 - E_2}{E_1 C} \cdot t \cdot K$$

де a – активність α -амілази, мг/(с · л); E_1, E_2 – екстинкції відповідно контрольної та дослідної проб; C – кількість крохмалю, введеного в дослідну і контрольну проби (0,2 мг у мікроваріанті); t – коефіцієнт перерахунку на 1 с інкубації; K – коефіцієнт перерахунку на 1 л біологічної рідини з урахуванням розведення.

Клініко-діагностична інтерпретація. α -Амілаза секретується підшлунковою та слинними залозами, невисока її активність спостерігається в печінці

та скелетних м'язях. Низька молекулярна маса амілази (≈ 48000 Да) сприяє фільтрації ферменту через ниркові клубочки і виділенню із сечею. Ензим складається з двох фракцій – панкреатичної та слинної. У сироватці крові вищою є активність слинного ізоферменту, 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, хімоїстазі, дистрофії печінки, гепатиті, жовчнокам'яній хворобі. При патології нирок активність ферменту може зростати у крові, а в сечі – знижується. Підвищення активності спричиняють кортикостероїдні препарати, наркотичні анальгетики, саліцилати, тетрациклін, фуросемід, гістамін, секретин, пероральні контрацептиви, сульфаніламід.

Гіпоферментемію виявляють при захворюваннях печінки (гепатит, цироз), злоякісних пухлинах, цукровому діабеті, Гіпотиреозі, кахексії, а також її спричиняють оксалати, цитрати, піруват.

Нормальні значення.

Сироватка крові: 3,3 – 8,9 мг/(с·л), або 12 – 32 мг/(год·мл).

Сеча: до 44 мг/(с·л), або до 120 мг/(год·мл).

Дуоденальний вміст: 1,7 – 4,4 г/(с·л), або 6 – 16 г/(год·мл).

Коефіцієнт перерахунку на одиниці СІ – мг/(с·л) – дорівнює 0,278.

Лабораторна робота № 11

Визначення активності ліпази в сироватці крові уніфікованим методом з використанням маслинової олії як субстрату

Принцип методу. Спектрофотометричне вимірювання зміни каламутності суспензії маслинової олії під дією ліпази. Активність ферменту пропорційна кількості гідролізованої маслинової олії або кількості жирних кислот, що утворюються під час гідролізу.

Реактиви.

1. Маслинова олія, $M_{\text{сер}} = 880,2$.
2. Алюмінію оксид, х.ч. (для очищення маслинової олії).
3. Купруму сульфат $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ для здобування абсолютного спирту.
4. Етиловий спирт абсолютний.
5. Основний розчин маслинової олії, 0,011 моль/л.

6. Робоча емульсія маслинової олії, 0,17 ммоль/л.
7. Трис-(оксиметил)-амінометан.
8. Натрієва сіль дезоксихолевої кислоти.
9. Хлороводнева кислота концентрована.
10. Буфер, що містить трис 0,025 моль/л і натрієву сіль дезоксихолевої кислоти 0,014 моль/л (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 визначення. Перед визначенням сироватку і реактиви прогрівають до температури вимірювання. У кювету наливають 3 мл робочої емульсії маслинової олії, додають 0,1 мл сироватки, змішують (без струшування) і ставлять у термостат при 37 °С, через 2 хв. вимірюють екстинкцію (E_1), порівнюючи з водою або повітрям, при $\lambda = 340$ 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 досліджуваній. Розрахунок виконують за формулою:

$$C = E_d \cdot C_k / E_k,$$

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 у мікромольях «зруйнованої» маслинової олії здійснюють за формулою:

$$C = E_d \cdot 170 \cdot 3 \cdot 1000 / E_k \cdot 1000 \cdot 0,1,$$

де C – активність ліпази, мкмоль/(хв·л); E_d – зміна екстинкції дослідної проби за 1 хв.; 170 – концентрація маслинової олії в робочій емульсії, мкмоль/л, при якій екстинкція дорівнює ≈ 1 ; E_k – екстинкція робочої емульсії маслинової олії (170 мкмоль/л); $3/1000$ – об'єм робочої емульсії маслинової олії, л; $1000/0,1$ – коефіцієнт перерахунку на 1 л сироватки.

Лінійна залежність зберігається до концентрації маслинової олії 204 мкмоль/л. Коефіцієнт перерахунку в нмоль/(с·л) становить 16,67.

Примітка. Нормальні значення слід перевіряти в кожній лабораторії.

Клініко-діагностична інтерпретація. *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.

Нормальні значення. 0 – 470 нмоль/(с·л), або 0 – 28 мкмоль/(хв·л).

Лабораторна робота № 12

Визначення вмісту білірубіну в сироватці крові за діазореакцією при наявності акселератора (метод Ієндрашика, 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 розчинний 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.

1. Кофеїновий реактив.
2. 0,9 % розчин натрію хлориду.
3. Діазосуміш: а) діазореактив I; б) діазореактив II. Перед роботою змішують 10 мл діазореактиву I і 0,3 мл діазореактиву II.

Матеріал для дослідження. Свіжа сироватка або плазма крові.

Хід визначення (за таблицею).

Компоненти	Загальний білірубін, мл	Кон'югований білірубін, мл	Контрольна проба, мл
Сироватка крові	0,50	0,50	0,50
Кофеїновий реактив	1,75	–	1,75
0,9 % Розчин натрію хлориду	–	1,75	0,25
Діазосуміш	0,25	0,25	–

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 $\lambda = 500 - 560$ 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.

Примітки.

1. Сироватка не має бути гемолізованою.
2. Перед визначенням білірубіну обстежуваній особі не можна приймати ліки або вживати продукти, які викликають штучне забарвлення сироватки (морква, апельсини тощо), не слід також уводити вітамін С.
3. Для перерахунку міліграм-відсотків (мг/100 мл) у мікромолі на літр користуються коефіцієнтом 17,10.

Норма, мкмоль/л: 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-діагностична інтерпретація. 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 ретикулоендотеліальній системі непрямого білірубіну із зруйнованих еритроцитів. В той же час печінка не здатна до утворення такої значної кількості білірубінглюкуронідів, що і викликає накопичення непрямого білірубіну в крові і тканинах. Відомо, що непрямий білірубін не проходить через нирковий фільтр, тому він у сечі при гемолітичній жовтя-

ниці 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 чотиріхлористим, 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 камінцями, паразитами.

Концентрація білірубину в сироватці крові *дещо зростає* під впливом таких препаратів, як фенітоїн, натрію йодат, сульфаніламід (переважно фракція кон'югованого білірубину), індометацин, саталон, тимолол, вітамін К. *Знижують* вміст білірубину аспірин, вітамін С.

Лабораторна робота № 13

Визначення білка в сечі

Якісні реакції на білок у сечі

Всі реакції на наявність білка 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 % розчину оцтової кислоти. При дослідженні лужної сечі в осад випадають фосфати.

У клінічній практиці найбільш поширене визначення білка в сечі пробами: кип'ятінням, з азотною і сульфосаліциловою кислотами, а останнім часом універсальними індикаторними смужками.

Проба кип'ятінням

У пробірку наливають 3 – 5 мл попередньо підкисленої (кількома краплями 10 % розчину оцтової кислоти) до слабокислої реакції прозорої сечі і нагрівають до кипіння (для точності результату ставлять 2 – 3 спарені проби). За наявності білка він звертається і випадає в осад. Залежно від кількості білка 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 білок у сечі, оскільки при значному підкисленні сечі він не випадає в осад при кип'ятінні. Для контролю необхідно до гарячої прозорої сечі додати рівний об'єм насиченого розчину натрію хлориду. За наявності білка в пробірці одразу утворюється характерне помутніння. *Чутливість проби становить 0,001 г/л або 0,001 % (pro mille - кількість грамів білка на 1000 мл сечі).*

Проба з азотною кислотою

На дно пробірки піпеткою вносять 1 – 2 мл 5 % розчину азотної кислоти, приготовленого на 20 – 30 % розчині натрію хлориду. Чистою піпеткою обережно нашаровують на кислоту 1 – 2 мл підкисленої і профільтрованої сечі. За наявності білка на межі двох рідин утворюється біле кільце. Якщо білка 0,033 г/л, то кільце утворюється через 2,5 – 3 хв. *Чутливість проби 0,033 г/л (0,033 %).* За відсутності білка в сечі і правильному нашаруванні на кислоту сечі на межі двох рідин утворюється темне кольорове кільце.

Проба з сульфосаліциловою кислотою

У пробірку наливають 2 – 3 мл підкисленої та профільтрованої сечі і додають по краплях 20 % розчин сульфосаліцилової кислоти (розчин кислоти зберігається в темноті). За наявності білка 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 білок, але й альбумози. При підігріванні альбумози розчиняються, а білковий осад залишається нерозчинним. *Чутливість проби становить 0,015г/л (0,015%).*

Проба з калієм залізосинеродистим

У пробірку наливають 10 мл підкисленої сечі і обережно додають по краплі 5 % розчин калію залізосинеродистого. За наявності у сечі білка від кожної краплі розчину утворюється виражений осад у вигляді пластівців.

Кількісне визначення білка в сечі

Кількісне визначення білка в сечі проводять лише після позитивних результатів якісних проб.

Визначення білка в сечі з 3 % сульфосаліциловою кислотою

Принцип методу. Інтенсивність помутніння при осадженні білка сульфосаліциловою кислотою пропорційна його концентрації.

Обладнання. Фотоелектроколориметр (КФК-2, КФК-3), пробірки, піпетки на 1 і 2 мл.

Реактиви: 1) 3 % розчин сульфосаліцилової кислоти; 2) стандартний розчин альбуміну (5 мг/мл).

Хід визначення. У пробірку вносять 0,5 мл профільтрованої сечі, додають 1,5 мл розчину сульфосаліцилової кислоти, перемішують. Через 5 хв. вимірюють екстинцію проби при довжині хвилі 590 – 650 нм (оранжевий чи червоний світлофільтр) проти контролю у кюветі товщиною робочого шару 5 мм. Контроль готують аналогічно, але замість розчину сульфосаліцилової кислоти використовують ізотонічний розчин NaCl.

Розрахунок умісту білка проводять за калібрувальним графіком, для побудови якого з концентрованого розчину альбуміну (5 мг/мл) готують наступні розведення (табл. 1).

Таблиця 1 – Розведення розчину альбуміну

№ п/п	Альбумін (5 мг/мл)	Ізотонічний розчин NaCl	Кінцева концентрація білка, мг/мл
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 із одержаних розчинів обробляють як і дослідні (0,5 мл розчину альбуміну + 1,5 мл розчину сульфосаліцилової кислоти). Вимірюють екстинцію і будують калібрувальний графік залежності екстинції від концентрації білка.

Лінійна залежність зберігається до 1 мг/мл. За більшої концентрації білка в сечі пробу необхідно розвести і провести повторне визначення, врахувавши кратність розведення сечі.

Метод з азотною кислотою (Робертса-Стольникова)

Принцип методу ґрунтується на тому, що при пробі з азотною кислотою біле кільце на межі її з сечею з'являється між 2,5 і 3-ма хв. за наявності 0,033 г/л білка. Якщо кільце утворюється раніше, то білка в такій сечі більше 0,033 г/л, і тому сечу розбавляють до тих пір, поки кільце не буде утворюватись у зазначений термін (між 2,5 і 3-хв інтервалом).

Хід визначення. Спочатку виконують пробу з азотною кислотою і нативною сечею. Якщо вміст білка в сечі перевищує 0,033 г/л, то біле кільце на межі двох рідин утворюється відразу. Тоді сечу необхідно розвести дистильованою водою у 2, 4, 8, 10, 20, 30, 50, 100 і 200 разів і т.д., і з кожним розведенням виконати пробу з азотною кислотою. В тому розведенні, в якому кільце з'явиться між 2,5 і 3-ма хв., вміст білка становить 0,033 г/л. Множенням 0,033 г/л на кратність розведення сечі знаходять вміст білка в нативній сечі, який виражають кількістю грамів білка на 1 л сечі. Наприклад, кільце з'явилося в термін між 2,5 і 3-ма хв. у пробірці з розведенням сечі у 200 разів. Отже, $0,033 \text{ г/л} \times 200 = 6,6 \text{ г/л}$ сечі.

Експрес-метод визначення білка в сечі діагностичними смужками

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

кислотного-основного індикатора під впливом білків. Діагностичну смужку необхідно занурити в свіжу сечу і не пізніше 1 хв. порівняти її забарвлення з відповідною кольоровою шкалою на тубусі. Результат виражається в г білка на 1 л сечі.

Клініко-діагностичне значення протеїнурії

Нормальні значення. У нормі не виявляється.

Протеїнурія буває преренальною (переднирковою), ренальною (нирковою) і постренальною (післянирковою).

Передниркова (преренальна) протеїнурія зумовлюється появою в плазмі крові підвищеної кількості білків, які фільтруються до каналців у кількості, що перевищує їхню реабсорбційну ємність. До такої патології належать гемоглобінурія (при гемолітичних синдромах) та міоглобінурія (внаслідок пошкодження м'язів). Тривала преренальна протеїнурія спричинює пошкодження клубочків і розвиток нефротичного синдрому із значною втратою білка.

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 діб 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 білок з малою молекулярною масою (альбумін і трансферин). Прогресування хвороби призводить до зростання протеїнурії внаслідок підвищення проникності клубочків, через які починають проходити білки з більшою молекулярною масою. При гострому гломерулонефриті в сечі виявляють від 0,1 до 1,5 % білка.

Канальцева протеїнурія спричинюється порушенням реабсорбції білків у каналцях і характеризується зростаючим виділенням із сечею білків з малою молекулярною масою, які вільно проходять через стінку клубочків (β_2 -макроглобулін, лізоцим, α_1 -мікроглобулін та ряд інших білків). 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 канальців підвищується реабсорбція води, внаслідок чого концентрація білка 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 білка.

Післяниркова протеїнурія розвивається при захворюваннях сечового міхура, уретри та уrolітіазі. Кількість білка в сечі при цьому не перевищує 1 г/л.

Ниркова протеїнурія від післяниркової відрізняється більшим умістом білка в сечі (при післянирковій він рідко перевищує 1 г/л), 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 білок до сечі домішується зі статевих органів, то протеїнурія є *несправжньою*.

Лабораторна робота № 14

Визначення креатиніну

Принцип методу. Креатинін реагує з пікриновою кислотою в лужному середовищі з утворенням забарвлених сполук.

Реактиви.

1. Пікринова кислота, насичений розчин.
2. Хлороводнева кислота, розчин 0,1 моль/л.
3. Основний стандартний розчин креатиніну концентрацією 10 ммоль/л.
4. Натрію гідроксид, розчин 2,5 моль/л.

Матеріал для дослідження. Сироватка крові, сеча. Як консерванти для сечі можна використовувати тимол і толуол.

А. Визначення вмісту креатиніну в сироватці за кольоровою реакцією Яффе (метод Поппера)

Хід визначення. Визначення креатиніну в сироватці крові: 2 мл сироватки змішують з 6 мл насиченого розчину пікринової кислоти. Через 5 хв. пробірку кип'ятять 15 – 20 с у водяній бані, потім центрифугують. До 4 мл центри-

фугату добавляють 0,2 мл розчину натрію гідроксиду 2,5 ммоль/л і ретельно перемішують. Іноді після підлучення розчин мутніє внаслідок випадання фосфатів. У цьому випадку розчин ще раз центрифугують. Потім розчин доводять до об'єму 10 мл 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 мл насиченого розчину пікринової кислоти і 0,2 мл розчину натрію гідроксиду 2,5 ммоль/л доводять до об'єму 10 мл водою.

Розрахунок проводять за калібрувальним графіком.

Нормальні значення креатиніну в сироватці крові, мкмоль/л: велика рогата худоба – 88,4-177,0; вівці – 106,0-168,0; кози – 88,4-159,0; свині – 141,0-239,0; коні – 106,0-168,0; собаки – 44,2–132,6.

Б. Визначення кількості креатиніну в сечі

Хід визначення. У мірній колбі або циліндрі місткістю 10 мл змішують 0,5 мл сечі (з добової кількості) із 3 мл розчину пікринової кислоти. Суміш ретельно струшують і додають 0,2 мл розчину натрію гідроксиду 2,5 моль/л. Витримують при кімнатній температурі протягом 10 хв. Доводять об'єм до 100 мл 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 мл розчину пікринової кислоти і 0,2 мл розчину натрію гідроксиду 2,5 моль/л доводять до об'єму 100 мл водою.

Розрахунок проводять за формулою при порівнянні з калібрувальною пробою.

Калібрувальна проба: до 0,5 мл основного калібрувального розчину додають 3 мл розчину пікринової кислоти і 0,2 мл розчину натрію гідроксиду (2,5 моль/л). Надалі проби обробляють так само, як дослідні.

$$K = C_k \cdot E_d \cdot a / E_k \cdot b,$$

де K – кількість креатиніну в добовій сечі, мкмоль; C_k – кількість креатиніну в калібрувальній пробі, 50 мкмоль/л; E_d – екстинкція дослідної проби; E_k – екстинкція калібрувальної проби; a – добова кількість сечі; b – кількість сечі, взятої для аналізу.

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

гіпертиреозі. **Зниження** рівня креатиніну 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, фенолсульфогфталейн. Знижують вміст креатиніну в сечі андрогени, анаболічні гормони, тіазидні діуретики.

Нормальні значення. Концентрація креатиніну в сечі клінічно здорових високопродуктивних глибокотільних корів становить 5,5 – 14,0 ммоль/л (в середньому $10,8 \pm 1,5$ ммоль/л), у дійних – 9,2 – 13,7 ммоль/л ($11,4 \pm 0,6$ ммоль/л).

При нефротичному синдромі вміст креатиніну в сечі зменшується у 87,5 – 95 % корів, у глибокотільних – до $7,4 \pm 0,9$; дійних – до $4,4 \pm 0,5$ ммоль/л. У корів з ознаками гепаторенального синдрому концентрація креатиніну в сечі становить 5,0 – 6,0 ммоль/л. Відношення між кількістю креатиніну в сечі і крові – концентраційний індекс (КІ) креатиніну – характеризує концентраційну функцію нирок:

$$\text{КІ} = \text{Креатинін у сечі (ммоль/л)} : \text{креатинін у крові (ммоль/л)}.$$

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 сухостійних 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 № 15

Визначення активності трансамідинази в сироватці крові уніфікованим методом

Принцип методу. Трансамідиназа каталізує перенесення амідинової групи з L-аргініну на гліцин з утворенням продуктів реакції L-орнітину та гуанідиноцтової кислоти. Фермент також прискорює реакцію перенесення амідинової групи з L-канаваніну на L-орнітин з 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 $\lambda = 490 - 500$ нм.

Реактиви.

1. Фосфатний буфер, розчин 0,14 моль/л (рН = 7,5).
2. Буферний розчин канаваніну сульфату, розчин 7,0 ммоль/л.
3. Буферний розчин орнітину гідрохлориду, розчин 7,0 ммоль/л.
4. Розчин ТХО к-ти.
5. Розчин хромогену.
6. Розчин N-бромсукциніміду концентрацією 0.1 г на 100 мл.
7. 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 мл фосфатного буфера та 1 мл сироватки крові або сечі. Вміст пробірки обережно перемішують.
2. Суміш для проведення реакції.
3. Субстратний розчин – суміш буферних розчинів канаваніну й орнітину.

Хід визначення. У центрифужні пробірки з дослідними пробами відмірюють по 0,7 мл субстратного розчину (по 0,35 мл 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 мл «забуференої» сироватки крові або сечі (0,1 мл 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 мл субстратного розчину. Реакцію припиняють додаванням 0,1 мл розчину ТХО к-ти. Вміст пробі-

рок перемішують. Осад білків відділяють центрифугуванням протягом 10 хв. при 3000 об/хв.

З надосадової рідини відбирають 0,5 мл, доводять об'єм водою до 2 мл. При проведенні кольорової реакції до 2 мл дослідної та контрольної проб додають 2 мл розчину 8-оксихіноліну і 1 мл розчину N-бромсукциніміду. Після перемішування пробірки разом зі штативом ставлять у холодильник для ефективного розвитку забарвлення.

Через 20 хв. вимірюють оптичну густина 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 ммоль або мкмоль), що утворився за 1 год. інкубації дослідної проби при 37 °С, в розрахунку на 1 л сироватки крові або сечі. Отже, для визначення активності ферменту в мкмоль/(с·л) отримані за калібрувальною кривою значення (мкмоль L-аргініну) необхідно помножити на 20000 ($2 \cdot 10^4$).

Клініко-біохімічна інтерпретація. Підвищують активність вітамін D, золото, саліцилати, амфотерицин В, ампіцилін, цепорин, гентаміцин, ізоніазид, канаміцин, фурадонін, стрептоміцин, сульфаніламід, рентгеноконтрастні речовини та інші нефротоксичні лікарські препарати.

Нормальні значення. У сироватці крові та в сечі активність трансамідази не визначається.

СПИСОК РЕКОМЕНДОВАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Иммунохимия в клинической лабораторной практике / Под ред. А.М. Уорда, Дж. Т. Уичера. – М.: Медицина, 1981 – 237 с.
2. Клиническая лабораторная диагностика в ветеринарии / И.П. Кондрахин, Н.В. Курилов, А.Т. Малахов и др. – М.: Агропромиздат, 1985. – 286с.
3. Лабораторные методы исследование в клинике. Справочник /Под ред. В.Я. Мельникова. – М.: Медицина, 1987. – 238 с.
4. Ветеринарная диспансеризация сельскохозяйственных животных. Справочник / В.И. Левченко, Н.А. Судаков, Г.Г. Харута и др.; Под ред. В.И. Левченко. – К.: Урожай, 1991. – 304 с.
5. Горячковский А.М. Справочное пособие по клинической биохимии. – Одесса: ОКФА, 1994. – 416 с.
6. С. Ангельські, З. Якубовські, М. Домінічак. Клінічна біохімія. – Сопот, 1998. – 450 с.
7. Энциклопедия клинических лабораторных тестов / Перевод с англ. под ред. В.В. Меньшикова. – М.: Лабинформ, 1997. – 960 с.
8. Лифшиц В.М., Сидельникова В.И. Биохимические анализы в клинике: Справочник. – М.: МИА, 1998. – 303 с.
9. Биохимические исследования в клинике. Ф.И. Комаров, Б.В. Коровкин, В.В. Меньшиков. – Элиста: АПП “Джангар”, 1999. – 149 с.
10. Маршал В. ДЖ. Клиническая биохимия. – Петербург.: “Невский диалект”, 2000. – 367 с.
11. Цыганенко А.Я. Жуков В.И. Мясоедов В.В. и др. Клиническая биохимия. – М.: “Триада- х”, 2002. – 497 с.
12. Ветеринарна клінічна біохімія / В.І. Шевченко, В.В. Влізло, І.П. Кондрахін та ін.; За ред В.І. Шевченко і В.Л. Галяса. – Б.Церква, 2002. – 400 с.
13. Клінічна біохімія: Навч. посіб. для студ. вищ. фармац. навч. закл. і фармац. ф-тів вищ. мед. навч. закл. III – IV рівнів акредитації / О.П. Тимошенко, Л.М. Вороніна, В.М. Кравченко та ін.; За ред. О.П. Тимошенко. – К.: ВД «Професіонал», 2005. – 288 с.
14. Біохімічний склад рідин організму та їх клініко-діагностичне значення / За ред. О.Я. Солярова. – К.: Здоров'я, 2004. – 192 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. Методические рекомендации по диагностике и общей профилактике рота-и короновиральной инфекции, способы диагностики, лечения и профилактики нарушения обмена веществ у новорожденных телят при диареях / В.П. Онуфриев, В.Г. Скибицкий, С.В. Миськевич и др. – К.: УСХА, 1990. – 48 с.

17. Методичні вказівки щодо визначення кислотно-лужного стану і корекції метаболічного ацидозу в організмі новонароджених телят / Д.О. Мельничук, Т.В. Любецька, В.А. Малько та ін. – К.: НАУ, 1997. – 12 с.

18. Методичні вказівки до виконання лабораторних робіт для студентів спеціальності ветеринарна медицина з дисципліни “Клінічна біохімія” / Д.О. Мельничук, В.А. Томчук, І.В. Калінін, – К.: НАУ, 1999. – 64 с.

19. Рекомендації для підприємств України щодо експрес-методу прогнозування імунодефіцитного стану організму новонароджених телят / Д.О. Мельничук, М.І. Цвіліховський, В.А. Грищенко та ін. – К.: НАУ, 2001. – 15 с.

20. Рекомендації для підприємств України відносно нових даних щодо механізму формування колострального імунітету у новонароджених телят та їх застосування у ветеринарній медицині / Д.О. Мельничук, М.І.Цвіліховський, Т.В. Любецька та ін. – К.: НАУ, 2001. – 11 с.

21. Фізико-хімічні, морфологічні та біохімічні дослідження крові: Методичні вказівки до лабораторних занять для студентів ВНЗ аграрного профілю за спеціальністю 7.130501 – ветеринарна медицина / М.І. Цвіліховський, І.Г. Погурський, В.О. Бондар та ін. – К.: НАУ, 2002. – 49 с.

22. Гемоглобін та його якісні і кількісні перетворення в організмі тварин: Методичні вказівки до лабораторних занять для студентів ВНЗ аграрного профілю за спеціальністю 7.130501 – ветеринарна медицина / Д.О. Мельничук, В.А. Грищенко, В.А. Томчук та ін. – К.: НАУ, 2003. – 23 с.

23. Рекомендації з терапії і профілактики шлунково-кишкових хвороб у новонароджених та молодняку тварин / М.І. Цвіліховський, В.І. Береза, В.А. Грищенко та ін. – К.: НАУ, 2004. – 39 с.

24. Патологія клітинних мембран та її корекція засобами репаративної терапії: Методичні вказівки до розділу “Патохімія клітинних мембран” дисципліни “Клінічна біохімія” для спеціальності “Ветеринарна медицина” ОКР “Магістр” / Д.О. Мельничук, В.А. Грищенко, М.І. Цвіліховський та ін. – НАУ, 2005. – 32 с.

25. Рекомендації з проведення репаративної терапії при ентеропатології телят / Д.О. Мельничук, В.А. Грищенко, М.І. Цвіліховський, В.А. Томчук, О.І. Свинаренко. – К.: НАУ, 2005. – 22 с.

1. Рекомендації з профілактики патології обміну речовин у сухостійних корів та новонароджених телят / М.І. Цвіліховський, В.А. Грищенко, В.І. Береза та ін. – К.: НАУ, 2005. – 23 с.
2. Дослідження сечі. Методичні рекомендації для студ. ф-ту ветеринарної мед. та слухачів післядипломного навчання спеціалістів ветеринарної медицини / В.І. Левченко, М.Я. Тишківський, В.В. Сахнюк та ін. – Біла Церква, 2005. – 74 с.
3. Рекомендації по застосуванню ентеросорбентів “Полісорб МП” та “Ентеросгель” для лікування гострих розладів травлення новонароджених телят / Д.О. Мельничук, В.А. Томчук, В.А. Грищенко. – К.: НАУ, 2006. – 23 с.
4. Відновлення внутрішньоклітинного метаболізму в печінці телят при ентеропатології. Науково-практичні рекомендації / Д.О. Мельничук, Л.Г. Калачник, Г.І. Калачник. – К.: НАУ, 2006. – 19 с.